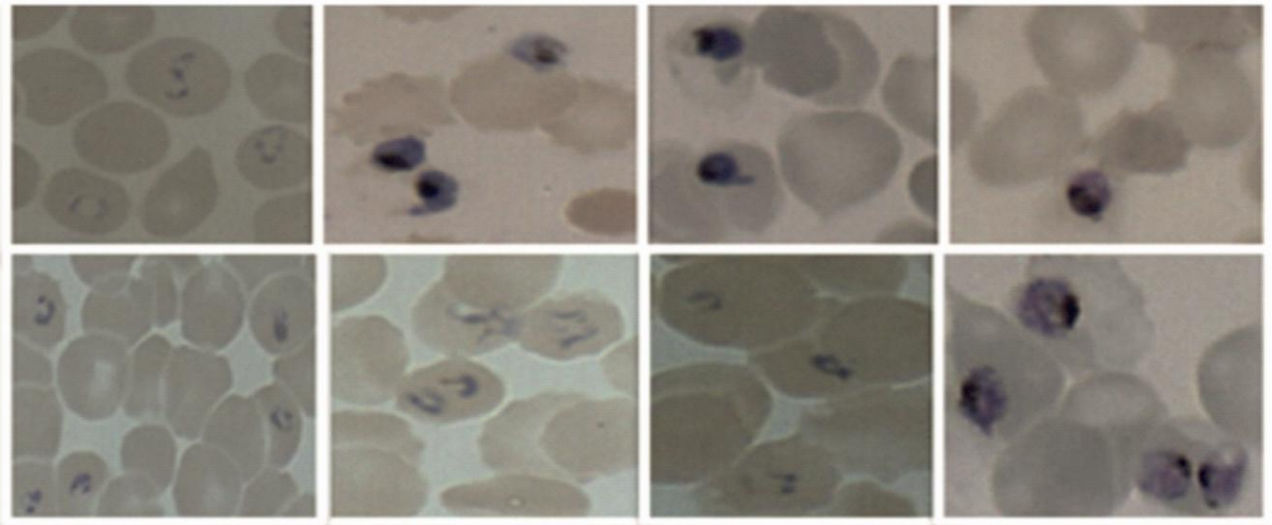




Estrés oxidativo y actividad inhibidora de Falcipaina II: Eventos relacionados con la inhibición del ciclo intra-eritrocitario del *Plasmodium falciparum* por compuestos quinoidales sintéticos.



MARLENE DURÁN LENGUA

RICARDO GAITÁN
DIRECTOR

Presentada para optar el título de Doctor en Ciencias Biomédicas. Por la Universidad de Cartagena.

Cartagena de Indias
2014

**ESTRÉS OXIDATIVO E INHIBICIÓN DE FALCIPAINA 2: EVENTOS
RELACIONADOS CON LA INHIBICIÓN DEL CICLO INTRA-ERITROCITARIO
DEL *PLASMODIUM FALCIPARUM* POR
COMPUESTOS QUINOIDALES SINTÉTICOS.**

Tesis como requisito parcial para obtener el Título de Doctor en Ciencias
Biomédicas

MARLENE DURÁN LENGUA

COMITÉ TUTORIAL

**RICARDO GAITÁN
DIRECTOR**

**NIRADIZ REYES
LUIS FRANCO
ASESORES**



Cartagena de Indias

2014

NOTA DE APROBACIÓN DEL JURADO

PRESIDENTE DEL JURADO

JURADO

JURADO

JURADO

La Universidad de Cartagena ni el jurado examinador, se hacen responsables de los conceptos emitidos en el presente trabajo.

CARTAGENA DE INDIAS, 2014

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPITULO I.	5
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 EPIDEMIOLOGÍA	5
1.2 COMPUESTOS QUINOIDALES	7
1.3 GENERALIDADES DEL GENERO <i>Plasmodium spp</i>	9
CAPITULO II.	11
2.1 INTERACCIÓN CÉLULA HUESPED- PARÁSITO.	11
2.1.1 Remodelación de la membrana eritocitaria por <i>Plasmodium spp</i>	12
2.2 CICLO DE VIDA DE <i>Plasmodium spp</i>	14
2.3 FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS.	15
2.3.1 Derivados quinolínicos	16
2.3.2 Fármacos relacionados con el metabolismo del ácido fólico.	17
2.3.3 Derivados de Artemisina	17
2.3.4 Derivados naftoquinonico: Atovaquona.	18
CAPITULO III.	20
3 PROTEASAS GENERALIDADES.	20
3.1 INHIBIDORES DE PROTEASAS	21
3.2 PROTEASAS COMO BLANCO TERAPÉUTICO	22
3.2.1 Proteasas como blanco terapéutico en malaria.....	22
3.3 PROTEASAS DE <i>Plasmodium spp</i>	23
3.3.1 Subtilisinas.	23
3.3.2 Proteasa romboidal.	24
3.3.3 Proteasas de cisteina.....	24
3.4 PROTEASAS INVOLUCRADAS EN EL CATABOLISMO INTRAERITROCITARIO.	24
3.5 PROTEASAS EN EL CICLO INTRAERITROCITARIO DE <i>Plasmodium spp</i> ..	27
3.5.1 Digestión de la hemoglobina por <i>Plasmodium spp</i> : blanco farmacológico.	28
CAPITULO IV.	31
4 ESTRÉS OXIDATIVO EN EL DISEÑO DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS.	31

4.1	ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA Y ESTRÉS OXIDATIVO	31
4.2	DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE LA CÉLULA HUESPED.....	32
4.3	OXIDACIÓN Y BIOMOLÉCULAS.....	33
4.3.1	Modificación de proteínas.....	33
4.3.1.1	Oxidación directa de proteínas: carbonilación	34
4.3.1.2	Oxidación de lípidos de membrana.....	35
4.4	ESTRÉS OXIDATIVO EN ERITROCITOS INFECTADOS POR <i>Plasmodium spp.</i>	36
4.5	DEFENSAS ANTIOXIDANTES DEL ERITROCITO.....	37
4.6	ESTRÉS OXIDATIVO EN GLÓBULOS ROJOS ALTERADOS GENÉTICAMENTE.....	38
4.7	ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>Plasmodium spp.</i>	39
4.7.1	Formación de especies reactivas de oxígeno en glóbulo rojo infectado.....	40
4.8	SISTEMAS ANTIOXIDANTES DE <i>Plasmodium Spp</i>	42
4.8.1	Superoxido dismutasa (SOD) de <i>Plasmodium spp</i>	42
4.8.2	Sistema tioredoxina en <i>Plasmodium falciparum</i>	44
4.9	FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	45
CAPITULO V.....		47
5	HIPOTESIS	47
CAPITULO VI.....		48
6	OBJETIVOS.....	48
6.1	OBJETIVO GENERAL	48
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
CAPITULO VII.....		49
7	METODOLOGÍA.....	49
7.1	EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE LAS MOLÉCULAS QUINOIDALES.....	50
7.2	EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INHIBICIÓN DEL CICLO INTRAERITROCITICO DE <i>Plasmodium falciparum</i>	51
7.3	INHIBICIÓN DE PROTEASA.....	53
7.4	EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS PROTEÍNAS DEL PARÁSITO Y MEMBRANAS DEL ERITROCITO.....	55
7.5	INHIBICIÓN DE LA BIOCRISTALIZACIÓN DEL HEMO (FORMACIÓN DE B- HEMATINA).....	56

CAPITULO VIII.....	57
8 RESULTADOS	57
8.1 ACTIVIDAD ANTIPLASMODIUM.....	58
8.2 INHIBICIÓN DE PROTEASAS	60
8.3 ESTRÉS OXIDATIVO	63
8.4 INHIBICIÓN DE LA BIOCRISTALIZACIÓN DEL GRUPO HEMO	64
CAPITULO IX.	66
9 DISCUSIÓN	66
CAPITULO X.	74
10 CONCLUSIONES	74
CAPITULO XI.....	75
11 PERSPECTIVAS	75
APENDICE.	77
BIBLIOGRAFIA.....	79
ANEXOS.....	97

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Zonas endémicas de malaria, en el mundo	06
Figura 2. Invasión, remodelación y transporte de proteínas cruciales sintetizadas en organelas apicomplexa. (Marti, Baum et al. 2005).	12
Figura 3. Knob. Interacción entre las proteínas del parásito y las proteínas de la membrana del eritrocito y estructura del Knob (Maier, Cooke et al. 2009).	14
Figura 4. Ciclo de vida del Plasmodium sp. (Menard, 2005)	15
Figura 5. Fármacos antimalarico. Representantes de los diferentes antimalaricos usados en clínica. (http://www.drugbank.ca).	18
Figura 6. Modelos de salida del merozoíto de la célula huésped involucrando fusión de las membranas (parásito y glóbulo rojo).	25
Figura 7. Digestion de la hemoglobina en la vacuola digestiva del parásito (Grellier, Maroziené et al.).	29
Figure 8. Defensas antioxidantes del eritrocito. La G6PD tiene un papel central en la defensa antioxidante del eritrocito. G6PD suministra el NADPH para la cascada antioxidante en el eritrocito. (Mason, Bautista et al. 2007)	38
Figura 9. Formación de especies reactivas de oxígeno en el Plasmodium falciparum. Adaptado de Kumar et al 2007.	41
Figura 10. Inhibición de Fp 2. Utilizando seis concentraciones diferentes por compuesto. Cada punto fue evaluado por triplicado en 2 experimentos independientes. Valores de CI_{50} (media \pm SD) e índice de correlación R^2 .	61
Figura 11. Efecto de los derivados quinoidales más activos, sobre la morfología de la vacuola digestiva, a las concentraciones de 0.1 y 1 μ M en cepas 3D7 En orden descendente: compuestos 2, 4, 6, y 8. A y B corresponden a los cultivos de cepa 3D7 y Dd2 sin tratamiento.	62
Figure 12 Correlación entre actividad antiplasmodium de derivados quinoidales frente a valores de IC_{50} de actividad inhibidora de Falcipaina 2.	63
Figura 13. Western blot de A: proteínas de membrana del parásito. B: en proteínas de eritrocitos tratados. C: proteínas de membranas de eritrocitos parasitados y tratados con valores de IC_{50} de los compuestos quinoidales. 2-Hidroxi-1,4-naphthoquinonas (2, 5 y 8). 4,5 furanonaftoquinonas (3, 6, 9); 4,9 furanonaftoquinonas (4, 7, 10) y (c) control no tratado.	64
Figure 14. % de inhibición de la biocristalización del grupo hemo. Linea azul resultados del % de inhibición de cloroquina, línea roja, inhibición de biocristalización de compuestos quinoidales (Compuesto 2)	65

LISTA DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1 Identificación y estructura de los compuestos quinoidales evaluados	49
Tabla 2 Citotoxicidad de compuestos quinoidales en células mononucleares y eritrocitos de sangre periférica.	58
Tabla 3. Actividad antimalárica de compuestos quinoidales expresada en valores de CI_{50} en μM , Citotoxicidad evaluada en fibroblastos IBR3G e índice de selectividad	59
Tabla 4. Inhibidores de proteasas.	60

RESUMEN

Debido a la resistencia y a la variedad de mecanismos desarrollados por el *Plasmodium* y la falta de una vacuna efectiva, existe la necesidad de una búsqueda continua de nuevos compuestos, que además de ser activos sobre blancos biológicos particulares, inhibiendo el crecimiento del parásito, actúen a través de nuevos mecanismos o combinación de ellos, a fin de contar con otras alternativas terapéuticas, o sustancias que por sus propiedades, puedan servir como punto de partida para el desarrollo de compuestos más activos. Un número importante de moléculas han sido estudiadas con este propósito, y se hayó que los compuestos quinoidales, presentan potencial farmacológico. Perteneciente a este tipo de compuestos se encuentra la atovaquona, la cual posee efectos antimaláricos y actividad antitoxoplasma. Otros compuestos con estructuras similares han mostrado actividad antibacteriana y anticancerígena.

En este trabajo se evaluó la actividad antiplasmodium de un grupo de moléculas quinoidales, las cuales se obtuvieron sintéticamente por el Grupo de investigación de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena.

El estudio de la actividad antimalarica, de estos compuestos se hizo con base en ensayos fundamentados en microfluorometría, mediante el cual se determina la inhibición del crecimiento por la determinación del ácido desoxirribonucleico(DNA) Luego de confirmada la actividad antiplasmodium, se procedió a caracterizar algunos posibles mecanismos de acción que estuvieran relacionados con el efecto antiplasmodium, entre estos se investigó la capacidad de inhibición de la biocristalización del grupo hemo, inhibición mediada por el estrés oxidativo tanto en las proteínas del parásito como en la membrana de la célula hospedera y por último se caracterizó la posible inhibición de proteasas las cuales incluyeron proteasas de cisteína, de serina y metaloproteasas, luego qe se obtuvieron resultados prometedores como inhibidores de proteasas de cisteína y serina, se

procedió a evaluar una enzima importante en la bioquímica del parásito, la Falcipaina 2 (Fp2), la cual juega un papel fundamental en el desarrollo y propagación del parásito de la malaria. Los resultados mostraron citotoxicidad con valores de CC_{50} en el rango de 0,83-76,00 μM . En células mononucleares realizada en células mononucleares de sangre periférica estuvo en el orden de 80%. Con respecto a la actividad hemolítica, los compuestos causaron hemólisis con valores cercanos al 30%, ambos ensayos fueron evaluados a las concentraciones correspondientes al valor de las CI_{50} . Los compuestos quinoidales mostraron actividad antimalárica en 2 cepas de *Plasmodium falciparum*: Dd2 y 3D7, resistentes y sensibles a Cloroquina respectivamente. Los valores de CI_{50} oscilaron entre 0,2 y 12,0 μM , y algunos de los compuestos mostraron un índice de selectividad superior a 50. Los compuestos causaron carbonilación en las proteínas del parásito, proteínas de membrana tanto en los eritrocitos infectados con la cepa seleccionada *P. falciparum* (Dd2), como en los no infectados, tomando este efecto como uno de los mecanismos por los cuales estos compuestos pudieran ejercer el efecto antimalárico. Los compuestos inhibieron, falcipaina 2, pero no mostraron inhibición en la biocrystalización del grupo hemo. En esta investigación se concluye que los compuestos quinoidales además de inhibir el desarrollo intraeritrocitario de *Plasmodium falciparum* podrían actuar por más de un mecanismo de acción.

ABSTRACT

Due to the resistance and variety of mechanisms developed by Plasmodium, and the lack of an effective vaccine, there is a need for a continued search for new compounds, besides being active on particular biological targets, inhibiting parasite growth, act through new mechanisms or combination thereof, to have other therapeutic alternatives, or substances by their properties can serve as pharmacophore for the development of more active compounds. A number of molecules have been studied for this purpose, finding that compounds quinoidales, have revealed pharmaceutical potential. Atovaquone is included in this class of compounds, which has antimalarial effects and anti-toxoplasma activity. Other compounds with similar structures have shown antibacterial and anticancer activity. In this work was evaluated the antiplasmodial activity of a group of molecules quinoidales, which were synthetically obtained by the group of natural products at the University of Cartagena. Previously a virtual search of biological activity of these molecules was done, using bioinformatics tools available on the web.

The study of the antimalarial activity of these compounds was based microfluorometry. After he confirmed the antimalarial activity, we proceeded to characterize some possible mechanisms of action related with antiplasmodium effect. Including the capacity biocristallización inhibition of heme, inhibition mediated by oxidative stress both parasite and host cell membranes, and finally the possibility of a significant inhibition in parasite enzyme falcipain 2 (Fp 2) was performed, which plays an important role in the development and spread of malaria parasite.

The results showed cytotoxicity CC_{50} in the range of 0.83 to 76 μM , viability performed in peripheral blood mononuclear cells was in the order of 80%. With respect to the hemolytic activity, compounds caused hemolysis with values close to 30%, both assay were evaluated at value of IC_{50} . The quinoidales compounds

showed antimalarial activity in 2 strains of *Plasmodium falciparum* Dd2 and 3D7, a resistant and sensitive chloroquine, respectively. The IC₅₀ values were from 0.2 to 12 mM, and some of the compounds showed a selectivity index of greater than 50. Compounds caused carbonylation parasite proteins, membrane proteins erythrocytes in both infected with *P. falciparum* strain selected (Dd2) and uninfected, taking this effect as one of the mechanisms by which these compounds, could exert antimalarial effect. The compounds inhibited, falcipain 2, but showed no inhibition in heme biocrystalización. This research concludes that quinoidales compounds also inhibit the development of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic act by more than one mechanism of action.

CAPITULO I.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

La malaria es una enfermedad infecciosa, causada por protozoarios unicelulares. La infección se inicia por la picadura de un mosquito hembra del genero Anopheles. La enfermedad se caracteriza por fiebre, escalofríos, sudoración y malestar general. La malaria es causada en el hombre por 6 especies de Plasmodium: *vivax*, *ovale*, *malariae*, *knowlesii*, *cynomolgi* (Shingadia 2014) y *falciparum*, siendo este último el causante de malaria severa (Crawley and Nahlen 2004, Walker, Nadjm *et al.* 2010).

Esta enfermedad presenta altos índices de mortalidad y morbilidad en los países más pobres del planeta, y en países subtropicales figura 1. Sin embargo los patrones de transmisión varían dentro de un mismo país, dependiendo de altitud, pluviosidad, factores sociales y medioambientales (Crawley and Nahlen 2004).

Más de 300 a 500 millones de personas en todo el mundo están infectados con parásitos del genero *Plasmodium*, y 1,5 a 2,7 millones de personas al año corren el riesgo de adquirir la enfermedad; la mayoría de ellos niños los cuales pueden morir a causa de la infección. La malaria también conocida como paludismo es endémica en más de 90 países en los que viven 2400 millones de personas, lo que representa el 40% de la población mundial. Aproximadamente el 90% de las muertes por malaria ocurren en África (Garcia 2010).

El aumento de la mortalidad está vinculado a la creciente incidencia de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (Stratton, O'Neill *et al.* 2008, Walker, Nadjm *et al.* 2010). En Colombia esta enfermedad también representa un

problema grave, donde muchos de los habitantes residen en zonas rurales donde ocurre la transmisión de este parásito (Jiménez, Snounou *et al.* 2010, Mandal 2014).

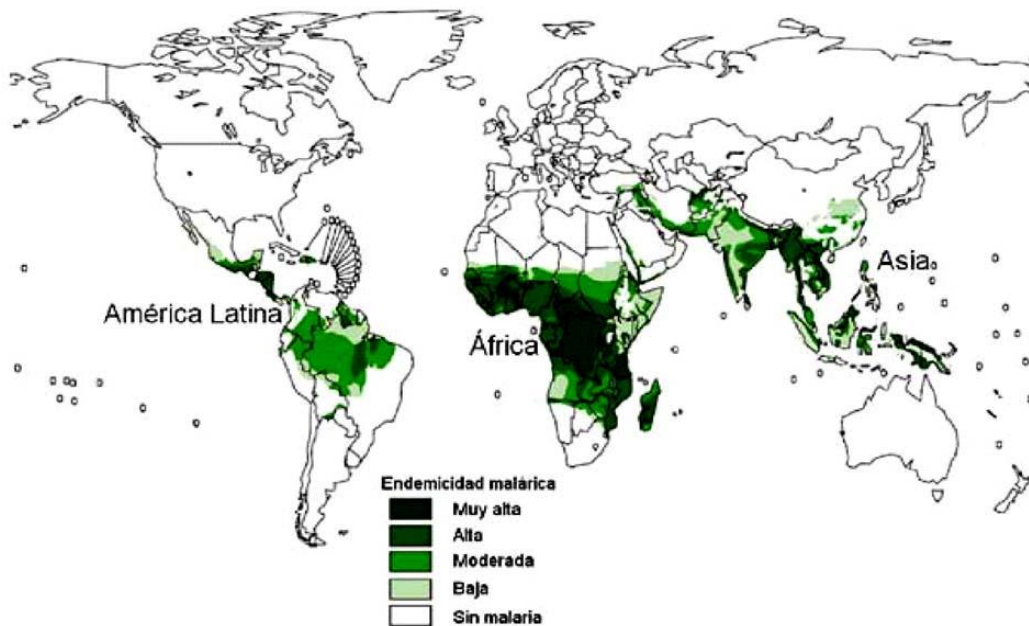


Figura 1. Zonas endémicas de malaria, en el mundo (Mansi, Dickson *et al.* 2007)

El período más significativo en la historia de la malaria nació en la conferencia de la Organización Mundial de la Salud (WHO), realizada en Kampala Uganda en 1950, cuyo objetivo era la erradicación de la malaria en América del Sur, India y África, principalmente a través del uso del dicloro difenil tricloroetano DDT (Winstanley, Ward *et al.* 2004). El control de la malaria incluye el control del vector, el control de la larva, la protección personal, y un tratamiento preventivo de grupos poblacionales como embarazadas y niños menores de 5 años (Schellenberg, Menendez *et al.* 2005).

Las limitaciones de la terapia antimalárica señalan la necesidad de nuevos fármacos con actividad contra este parásito, un blanco potencial para esta actividad son las proteasas del *Plasmodium falciparum* (Rosenthal 1998).

1.2 COMPUESTOS QUINOIDALES

El interés en estas moléculas nace gracias a estudios previos realizados por el Grupo de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena. En instancias previas se realizó una búsqueda de la actividad biológica de estas moléculas, utilizando herramientas disponibles en la web. Teniendo en cuenta que estudios previos, con extractos de plantas de la familia bignonacea mostraron actividad antiplasmodium, con estos resultados y evaluando la composición de los extractos se llegó a la conclusión que los componentes mayoritarios eran moléculas con características estructurales propias del grupo quinoidal.

Las quinonas son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, los cuales se han obtenido de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos. El grupo de investigación de productos naturales ha obtenido de fuentes naturales (bignoniáceas) y por síntesis química, compuestos quinoides diferenciados en el número y tipo de sustituyentes en el núcleo base. Los compuestos con base quinoides han sido estudiados *in vivo*, *in vitro* e *in silico* con el fin de evaluar y caracterizar efectos biológicos, entre los que se destacan anticancerígenos, antiparasitarios y citotóxicos atribuidos a estos compuestos.

Un total de 30 compuestos quinoidales sintetizados por el Grupo de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena, incluidos los nueve compuestos evaluados en este trabajo, fueron sometidos a una revisión sistemática virtual, a fin de conocer las tendencias en cuanto a actividad biológica, blancos moleculares y mecanismos de acción reportados para este tipo de compuestos (Durán Lengua, Gaitán Ibarra *et al.* 2013). En muchas investigaciones los compuestos quinoidales muestran como característica generalizada su toxicidad, por lo tanto uno de los ensayos realizados a nivel experimental, consistió en la evaluación de la citotoxicidad de los compuestos seleccionados en esta investigación. Estos estudios fueron realizados en tres tipos de células eucariotas.

Las naftoquinonas son pigmentos naturales, que tienen como característica estructural poseer dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 y con menor frecuencia en 1,2 ó 1,3 en el anillo del naftaleno, de donde deriva su nombre común. En la naturaleza se presentan con grupos hidroxilo y/o metilo como sustituyentes, además de encontrarse en forma libre o condensada con diversos monosacáridos. La distribución de las naftoquinonas es amplia, ya que se han aislado de plantas, hongos, bacterias, e inclusive de animales. Sin embargo, se encuentran en mayor proporción en plantas superiores de determinadas familias de Angiospermas como: Ebenaceae, Droseraceae, Bignoniaceae, Verbenaceae, Plumbaginaceae, Juglandaceae, Boraginaceae, entre otras.

Las naftoquinonas han demostrado poseer diferentes actividades biológicas entre las que se cuentan, antibacteriana, antiparasitaria, antifungico y anticancerígeno. Debido a ello las naftoquinonas han sido sujeto de estudio por diversos grupos de investigación. En el grupo de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena, se realizó una investigación previa, en la cual se evaluó la actividad antiplasmodium, de extractos de plantas cuyos compuestos mayoritarios son compuestos quinoidales, obteniéndose resultados prometedores, fue por esto que se procedió a realizar una búsqueda, en diferentes bases de datos que mostraran reportes, acerca de la estructura y funcionabilidad biológica de estos compuestos.

Con conocimiento acerca de las numerosas actividades biológicas de los compuestos quinoidales, en el grupo se procedió a realizar algunos procedimientos, con fines a la obtención de compuestos sintéticos. De los cuales fueron seleccionados 9 compuestos, a los cuales se les avaluó su citotoxicidad, su actividad antiplasmodium y por último incursionar en su posible mecanismo de acción, relacionada con su actividad antiplasmodium.

1.3 GENERALIDADES DEL GENERO *Plasmodium* spp

Protozoarios del genero *Plasmodium*, pertenece al filo apicomplexa, clase esporozoa, subclase coccidia, familia plasmodiidae, especie (*vivax*, *malariae*, *ovale falciparum knowlesi* y *cynomolgi*) (Smith, Walliker *et al.* 2002, White, Pukrittayakamee *et al.* 2014)

El merozoito es la forma invasiva, tiene forma ovoide (elipsoidal) y mide 1.5 μm de longitud. El extremo más puntiagudo contiene el complejo apical el cual consta de organelos secretores denominados micronemas, roptrias y gránulos densos como también un anillo polar el cual se encarga de la organización de los microtúbulos (Farrow, Green *et al.* 2011). En el extremo más amplio se encuentra el núcleo, el apicoplasto y una mitocondria.

Con la finalidad de conocer las características genómicas del parásito, en 1998 se inició el proyecto genoma del *Plasmodium falciparum*, con la secuenciación del cromosoma 2 y termina la secuenciación completa en el año 2002 (Gardner, Hall *et al.* 2002). De este proyecto se determinó que el parásito cuenta con 23 megabases de genoma nuclear, distribuidos en 14 cromosomas los cuales codifican 5.300 genes. El 65% de los genes son únicos en el parásito y no muestran homología con otros organismos conocidos (Gardner, Shallom *et al.* 2002, White, Pukrittayakamee *et al.* 2014). Aproximadamente el 80% del genoma del *Plasmodium* es rico en las bases nitrogenadas adenina y timina (Stratton, O'Neill *et al.* 2008), la mayoría de genes se concentran en la región subtelomérica de los cromosomas, posee además 2 moléculas de ADN extracromosómicos, una de 6 kb de origen mitocondrial y una de 35 kb de origen plastidico (Vaidya, Akella *et al.* 1989).

El genoma mitocondrial es una molécula de ADN lineal, y presenta múltiples repeticiones en tanda. El apicoplasto, un orgánulo de origen plastidico, posee genes que codifican proteínas específicas de rutas metabólicas esenciales.

Ambos orgánulos necesitan proteínas que son sintetizadas en el núcleo y posteriormente son dirigidas a los orgánulos usando una secuencia péptida bipartita, la cual posee un péptido señal (Hawthorne, Trenholme *et al.* 2004) que compromete la proteína con el sistema de endomembranas del apicoplasto, y un péptido tránsito, el cual introduce la proteína hasta el interior del apicoplasto (Bowman, Lawson *et al.* 1999, Lim and McFadden 2010). Núcleo, mitocondria y apicoplasto codifican rARNs. La mitocondria codifica proteínas como la citocromooxidasa I y el citocromo b. En el genoma se codifica tRNA, proteínas ribosomales y ARN polimerasa (McConkey, Rogers *et al.* 1997).

El genoma del parásito codifica pocas enzimas y transportadores, sin embargo posee una gran cantidad de genes involucrados en la evasión de la respuesta inmune e interacción con la célula huésped (Gardner, Hall *et al.* 2002). El genoma del parásito también codifica proteínas, que luego son dirigidas al citoplasma, citoesqueleto y la membrana citoplasmática de la célula huésped (Bowman, Lawson *et al.* 1999).

CAPITULO II.

2.1 INTERACCIÓN CÉLULA HUESPED- PARÁSITO.

parásito exporta aproximadamente 400 proteínas (incluyendo kinasas, lipasas, adhesinas, proteasas y proteínas similares a chaperonas) al citoplasma y membrana de la célula huésped (Tilley, Dixon *et al.* 2011). La invasión subsecuente de merozoitos a la célula hospedera, reorienta los orgánulos secretorios apicales, llamados micronemas, roptrias, gránulos denso y mononemas (Bannister and Mitchell 2009), sobre la membrana del eritrocito, conduciendo hacia la unión estable con la célula huésped. Esta interacción genera una onda de deformación en la membrana del eritrocito conduciendo a una unión estable parásito-célula huésped Figura 2. (Dvorak, Miller *et al.* 1975, Marti, Baum *et al.* 2005).

Posterior a este proceso ocurre una invaginación de la membrana eritrocitaria, estableciendo de esta manera el estado intracelular de anillo dentro de una vacuola parasitofora al interior del eritrocito (Bannister, Hopkins *et al.* 2000). Sin embargo, las proteínas de mayor importancia en la membrana eritrocitaria (banda 3, glicofirina A y proteínas del citoesqueleto) no se han detectado en la membrana de la vacuola parasitofora (Ward, Miller *et al.* 1993). En la vacuola se detecta una balsa resistente a detergente, la cual es reclutada por la vacuola parasitofora (Lauer, VanWye *et al.* 2000).

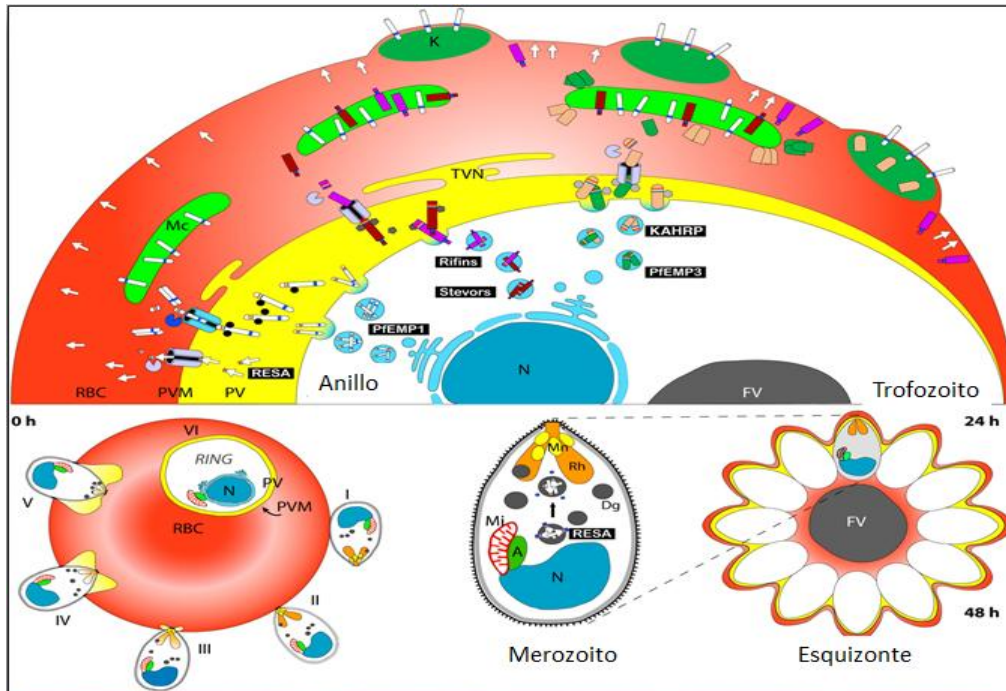


Figura 2. Invasión, remodelación y transporte de proteínas cruciales sintetizadas en organelas apicomplexa. (Martí, Baum et al. 2005).

Durante el desarrollo intraeritrocitario el parásito secreta proteínas, las cuales son transportadas hasta la membrana de la célula huésped; la mejor caracterizada de estas es la proteína de membrana eritrocitaria 1 (pfEMP1), relacionada con la virulencia del parásito, la malaria cerebral y placentaria, las proteínas de la familia stevor y rifin (Hiller, Bhattacharjee et al. 2004, Haldar and Mohandas 2007). Estas proteínas median una profunda remodelación del glóbulo rojo infectado (Goldberg and Cowman 2010) disminuyendo la deformabilidad y flexibilidad del mismo (Glenister, Coppel et al. 2002).

2.1.1 Remodelación de la membrana eritocitaria por *Plasmodium* spp

El parásito aumenta su virulencia gracias a las adhesinas presentes en la superficie del eritrocito infectado, permitiendo a los glóbulos rojos adherirse a las paredes de vasos y capilares sanguíneos evitando de esta manera su paso a través del bazo (Tilley, Dixon et al. 2011). La más distinguida de las adhesinas es

la *pfEMP1*, la cual forma agrupaciones en la superficie de la membrana del glóbulo rojo infectado, formando una estructura puntiforme llamada “knobs”. El parásito ha desarrollado vías exclusivas para el tráfico y exportación de proteínas dentro del eritrocito. Muchas de las proteínas exportadas llevan una secuencia señal pentamérica, llamada elemento de exportación del *plasmodium* (Hiller, Bhattacharjee *et al.* 2004)

Los “knobs” presentan *PfEMP1* en una conformación que facilita la adhesión de los eritrocitos infectados a las paredes de los vasos sanguíneos a través de la unión del dominio extracelular de *PfEMP1* a las moléculas ICAM-1, CD31, CD36, CSA, glucosaminoglycanos sobre la superficie de las células endoteliales (Rowe, Claessens *et al.* 2009). En el estadio intraeritrocitario temprano o anillo, el parásito induce el desarrollo de una estructura membranosa en el eritrocito, esta incluye una red tubulovesicular, la cual está interconectada a la membrana de la vacuola parasitófora (MVP) con una estructura parecida a una vaina en la membrana interna del glóbulo rojo infectado llamada hendidura de Maurer (Haldar and Mohandas 2007).

Varias proteínas derivadas del parásito, como la Proteína 1 de unión a la espectrina, que es una proteína rica en histidina asociada a la membrana y antígeno 1 expresada en el estado de anillo, se localizan en esta estructura. (Hawthorne, Trenholme *et al.* 2004). Durante el estadio de trofozoíto, el parásito ocupa el 40% del volumen de la célula huésped, es capaz de transformar la membrana de este con cientos de Knob, los cuales están asociados a proteína rica en histidina (KAPRH) y receptores de superficie derivadas del parásito como, proteína de membrana eritrocitaria *PfEMP1* (Su, Heatwole *et al.* 1995) figura 3. El antígeno de superficie del eritrocito infectado con estadio de anillo (RESA) y proteína 3 de membrana eritrocitaria (*PfEMP3*), están asociados con el citoesqueleto subyacente de la membrana del glóbulo rojo infectado (Kyes, Rowe *et al.* 1999).

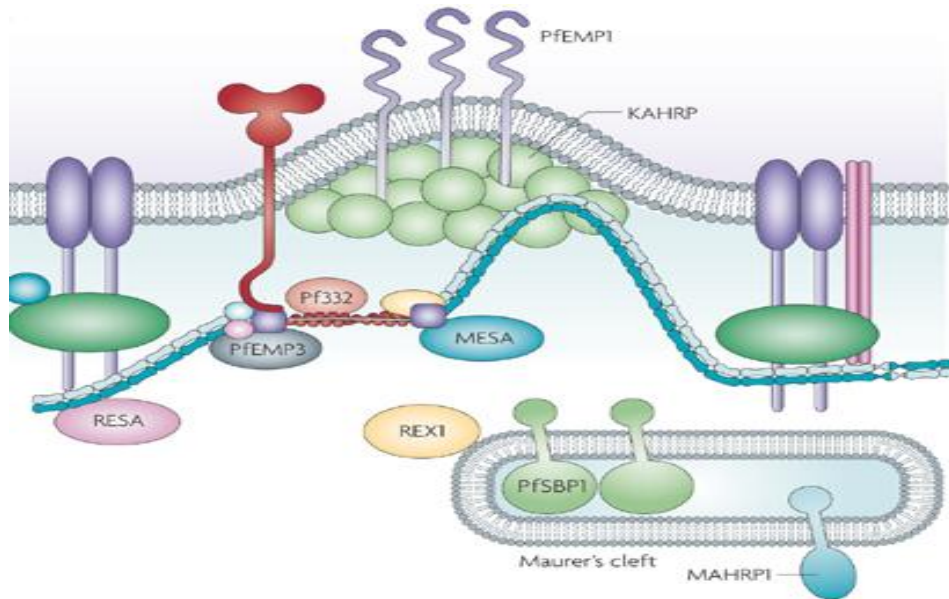


Figura 3. Knob. Interacción entre las proteínas del parásito y las proteínas de la membrana del eritrocito y estructura del Knob (Maier, Cooke et al. 2009).

Es importante resaltar que además de las proteínas exportadas hasta la membrana del eritrocito, para ensamblar el knob, el parásito también exporta otras proteínas relacionadas con la virulencia, entre las que se encuentran proteínas stevor y rifin, proteínas asociadas a membranas y proteínas transmembrana asociadas a las hendiduras de Maurer, figura 3 (Sam-Yellowe, Florens et al. 2004).

2.2 CICLO DE VIDA DE *Plasmodium spp*

El ciclo de vida del plasmodium es complejo. Comienza con la picadura de un mosquito hembra del género Anopheles. Durante su alimentación, inocula los esporozoitos que viajan al hígado para luego multiplicarse en el hepatocito produciendo esquizontes que maduran y liberan miles de merozoitos al torrente sanguíneo. Una vez en el interior del glóbulo rojo sufre varios ciclos de división asexual, hasta que se rompe el eritrocito y libera nuevos merozoitos capaces de iniciar un nuevo ciclo de invasión y multiplicación en el interior del eritrocito. El número de merozoitos puede alcanzar 10^7 por mL de sangre. Durante esta fase

del ciclo de vida, algunos merozoitos pueden diferenciarse en gametocitos, los cuales pueden ser ingeridos por un mosquito del género *Anopheles* hembra y fertilizarlos para formar zigotos que migran a lo largo de las paredes del intestino del mosquito, hasta formar ooquistes figura 4 (Farrow, Green *et al.* 2011, Biryukov and Stoute 2014).

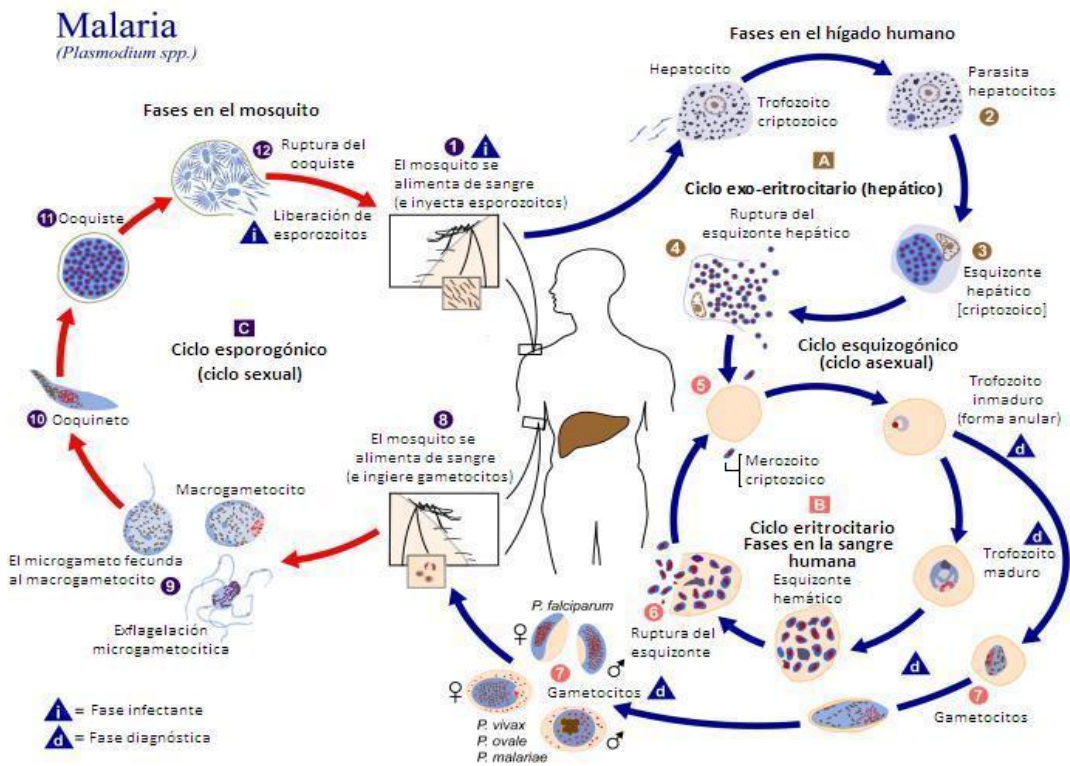


Figura 4. Ciclo de vida del *Plasmodium sp.* (Menard, 2005)

2.3 FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS.

Algunos blancos terapéuticos para la malaria se han ubicado en la vacuola digestiva donde se lleva a cabo la degradación de la hemoglobina, y la destoxificación del grupo hemo. Otros blancos corresponden a macromoléculas, como el DNA, fosfolípidos y proteínas. Existen blancos en estudio relacionados con señalización, tráfico y transporte de fármacos (Olliaro and Yuthavong 1999). La vacuola digestiva, un organelo con pH menor de 5, es donde ocurre la digestión

de la hemoglobina la cual es importante, porque aporta los nutrientes necesarios para la supervivencia del parásito y la destoxicación del grupo hemo; tóxico para el parásito, específicamente para las membranas biológicas y las enzimas del parásito (Gluzman, Francis *et al.* 1994).

Entre los blancos farmacológicos para el tratamiento de la malaria se están estudiando las proteasas. El tratamiento genético o interrupción de algunos de los genes codificadores de las mismas o su inhibición química, han generado efectos inhibitorios o letales en el desarrollo del parásito, en estudios realizados en el ciclo asexual del *Plasmodium falciparum* (Rosenthal 2002). La primer proteasa de cisteína de *P. falciparum* fue clonada en 1992 y la llamaron Falcipaina 1 (Rosenthal 1998). Esta proteasa de cisteína está involucrada en la degradación de hemoglobina; su inhibición específica, estudios de localización y actividad en la enzima nativa y recombinante, han reportado bloqueos en la digestión en la vacuola digestiva, liberación de merozoito, e invasión a la célula huésped (Greenbaum, Baruch *et al.* 2002).

Entre los fármacos de uso actual en el tratamiento de la malaria se encuentran: Derivados quinolónicos, endoperóxidos, artemisina, sulfamida y pirimetamina, son fármacos prototipo dentro de los cuales algunos actúan a nivel del metabolismo del ácido fólico; la atovaquona, la cual hace parte del grupo de las quinonas (Gamo 2014) actúa inhibiendo la cadena transportadora de electrones.

2.3.1 Derivados quinolónicos

Cloroquina, quinina, quinidina, amodiaquina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina y primaquina, las 4-aminoquinolinas interfieren con la destoxicación de la hematina libre (ferroprotoporfirina IX) generada durante la degradación de la hemoglobina en la vacuola digestiva. Adicionalmente la hematina es degradada por la reacción con peróxido de hidrogeno, el cual es generado por la oxidación espontanea de la hematina, desde el estado Fe^{2+} hasta el estado Fe^{3+}

interfiriendo en el proceso de conversión del grupo hemo intermediario tóxico, generado durante la degradación de la hemoglobina en hemozoína no tóxica o pigmento malárico figura 5. (Coronado, Nadovich *et al.* 2014). Está demostrado que estos compuestos, interfieren con la ruta de degradación de la hemoglobina, uniéndose a la ferriprotoporfirina IX; además ejercen una acción secundaria que involucra la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos en el parásito (Carranza-Rodríguez, Mateos-Rodríguez *et al.* 2010, Skinner-Adams, Stack *et al.* 2010). La primaquina actúa sobre formas intrahepáticas y además posee acción gametocida.

2.3.2 Fármacos relacionados con el metabolismo del ácido fólico.

Los medicamentos que interfieren con el metabolismo del ácido fólico como la pirimetamina y las sulfonamidas, son compuestos que inhiben la dihidropteroato sintasa. La pirimetamina junto con el cicloguanilo son inhibidores de la *Dihidrofolato reductasa*, una enzima responsable de la regeneración del cofactor (tetrahidrofolato) en estado reducido. La *Dihidrofolato reductasa* se encuentra asociada a la *Timidilato sintasa*, una enzima esencial para la síntesis celular de timidilato (Bzik, Li *et al.* 1987).

2.3.3 Derivados de Artemisina

Son agente alquilante, derivados de la planta *Artemisia annua* usado como antipirético en la farmacopea china (Sibley, Hyde *et al.* 2001). Sus derivados sintéticos como Artemeter Artesunato y Arteeter son lactonas sesquiterpénicas que actúan en la vacuola alimenticia del parásito, interfiriendo en la conversión del hemo en hemozoína, pero a diferencia de los derivados quinolínicos que obstaculizan la biocrystalización, su actividad biológica es dependiente de la ruptura del enlace peróxido, tras la interacción con el Fe II del grupo hemo en el interior de la vacuola digestiva, generándose radicales libres con capacidad de alquilar el grupo hemo, y otras proteínas del parásito (Borstnik, Paik *et al.* 2002).

Los derivados de la artemisinina producen metabolitos reactivos, como resultado de la interacción de su puente peróxido con el hierro del grupo hemo (Olliario 2001).

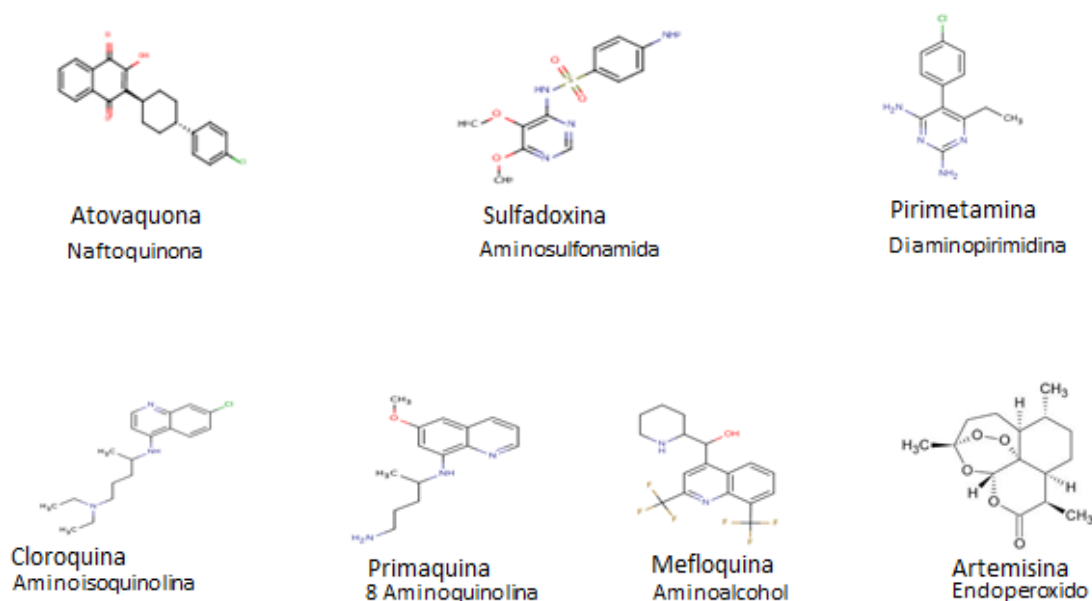


Figura 5. Fármacos antimalarico. Representantes de los diferentes antimalaricos usados en clínica. (<http://www.drugbank.ca>).

2.3.4 Derivados naftoquinonico: Atovaquona.

Pertenece al grupo de las quinonas. Esta actúa inhibiendo el citocromo bc1 por interacción del anillo de naftoquinona con la cadena lateral del citocromo, estableciendo múltiples interacciones de naturaleza no polar (Birth, Kao *et al.* 2014).

Con respecto a su síntesis, probablemente la mayoría de la quinonas provienen de la vía Acetato-mevalonato, particularmente las elaboradas por hongos, pero la extensión en la cual el ácido shikímico se encuentra involucrado es todavía un asunto por aclarar, sin embargo, este parece ser un importante intermediario en la formación de quinonas en plantas superiores (Thomson 2012). Para algunas

naftoquinonas provenientes de los microorganismos se ha comprobado su origen acetato-mevalonato (mompáina, flaviolina), mientras que en los vegetales superiores se forman a partir del ácido shikímico (7-metiljuglona) (Bruneton and Barton 1991).

La malaria es una de las enfermedades para la cual, no existe hoy día el fármaco óptimo. La rápida propagación de la resistencia hacia los fármacos corrientes, la falta de una vacuna efectiva contra esta enfermedad que puede ser mortal en algunas ocasiones, motiva el estudio por la búsqueda de nuevas moléculas activas. La síntesis, se constituye en gran ayuda para encontrar alternativas más eficaces. Los remedios tradicionales siempre han sido una fuente de importantes agentes antimaláricos y continúan suministrando tratamientos efectivos, no solo cuando los farmacéuticos no están disponibles sino también cuando la enfermedad es altamente resistente a los medicamentos comúnmente prescritos.

Con el ánimo de mostrar algunas bases para el desarrollo de nuevos antimaláricos, un grupo importante de compuestos quinoidales, sintetizados por el Grupo de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena, incluidos los nueve compuestos evaluados en este trabajo, fueron sometidos a una revisión sistemática virtual, a fin de conocer las tendencias en cuanto a actividad biológica, blancos moleculares y mecanismos de acción reportados para este tipo de compuestos (Durán Lengua, Gaitán Ibarra *et al.* 2013).

CAPITULO III.

3 PROTEASAS GENERALIDADES.

Las proteasas cortan secuencias largas de aminoácidos en segmentos más pequeños. Este proceso es esencial en la síntesis de proteínas (Shen and Chou 2009), controlando su composición, tamaño, forma, recambio y por último su destrucción (Seife 1997). Las proteasas representan el 2% del genoma humano, y del 1 - 5 % en organismos infecciosos (Puente, Sánchez *et al.* 2003). Las proteasas juegan un rol central en la activación, síntesis y recambio de proteínas, y tienen un papel regulatorio en la concepción, nacimiento, digestión, crecimiento, maduración, envejecimiento e incluso la muerte de los organismos (Qin, Srinivasula *et al.* 1999)

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, 1984) recomendó el uso del término *peptidasa* para designar al subgrupo de las hidrolasas que escinden uniones peptídicas (péptido-hidrolasas, subclase EC. 3.4). Las peptidasas comprenden dos grandes grupos de enzimas: las *endopeptidasas* y las *exopeptidasas*. Las exopeptidasas actúan sobre los extremos de la cadena polipeptídica; las que actúan sobre el extremo N-terminal pueden liberar un único residuo aminoacídico (Aminopeptidasa) o un di o tripéptido (Di o Tripeptidasa), las que actúan sobre el extremo C-terminal pueden liberar un único aminoácido (Carboxipeptidasa) o un dipéptido peptidil (dipeptidasa). Las endopeptidasas hidrolizan uniones internas en las cadenas polipeptídicas (López-Otín and Bond 2008).

Las peptidasas o proteasas abarcan un amplio rango de enzimas hidrolíticas, se encuentran en la naturaleza y sus sustratos son las proteínas o peptidos; todas producen la hidrólisis de enlaces péptidicos por ataque nucleofílicos, sin embargo,

existen variaciones en su modo de acción y sobre estas bases son clasificadas (Scott and Taggart 2010).

De acuerdo a su mecanismo catalítico, las proteasas son clasificadas en seis tipos a saber: Cistein-, Aspártil-, Glutánil-, Serin-, Metalo- y Treonin-proteasa. (Shen and Chou 2009). Proteasas de aspartil-, glutamil- y metalo utilizan una molécula de agua para desestabilizar el enlace péptidico del sustrato, mientras que proteasas de cisteína, serina y treonina utilizan estos aminoácidos como nucleófilos en su sitio activo (López-Otín and Bond 2008). Las proteasas actúan dividiendo proteínas en fragmentos pequeños ejerciendo cortes, en sitios específicos de una determinada secuencia de aminoácidos (Liang and Li 2007).

3.1 INHIBIDORES DE PROTEASAS

Los inhibidores de proteasas pueden ser clasificados en 4 grupos de acuerdo a su mecanismo de inhibición (Turk 2006); Los Inhibidores canónicos, donde se incluyen *serpinas* (Inhibidores de serin proteasa), bloquean el sitio activo de su proteasa blanco a través de unión de una manera parecida a como lo hace la proteasa con el sustrato blanco en el sitio catalítico. En contraste los inhibidores similares a *cistatinas* (Inhibidores de cisteín-proteasas) y algunos inhibidores de trombinas, usan un mecanismo exosito, la cual se une a una región adyacente al sitio activo previniendo de esta manera que el sustrato tenga acceso a su sitio catalítico. Un tercer grupo de inhibidores de proteasas las TIMPs (Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas), usan un mecanismo intermediario basados en la combinación canónica y exosito. Un cuarto mecanismo donde el inhibidor se une a un sitio alostérico, diferente y alejado del sitio activo como los Inhibidores de caspasas, enzimas que intervienen en la apoptosis. (Turk 2006, López-Otín and Bond 2008).

3.2 PROTEASAS COMO BLANCO TERAPÉUTICO.

Muchas proteínas y proteasas son controladas a nivel transcripcional y sólo se expresan cuando son requeridas (Yan and Boyd 2006). Debido a su actividad hidrolítica e irreversible estas enzimas deben ser estrictamente controladas. Las proteasas son reguladas *in vivo* por varios mecanismos: Regulación en los genes de expresión; activación de zimógenos inactivos; bloqueo de inhibidores endógenos; ubicación en compartimientos específicos como lisosomas, mitocondrias (Ra and Parks 2007) y modificaciones postraduccionales tales como glicosilación; unión a metales; formación de puentes disulfuro S-S; proteólisis y; degradación (López-Otín and Bond 2008).

A pesar de los mecanismos de control, la pérdida de control proteolítico se observa en un gran número de enfermedades. De hecho, se ha demostrado que la proteólisis sustenta diversos procesos patológicos y esto ha permitido que surjan como blancos terapéuticos (Turk 2006).

3.2.1 Proteasas como blanco terapéutico en malaria

La globina debe ser degradada para ser utilizados como fuente de aminoácidos para la síntesis de proteínas por parte del parásito, la inhibición de este proceso resultará letal para el parásito. Se han identificado una serie de proteasas específicas implicadas en la degradación de la globina como son las Plasmepsinas (aspartil proteasas), Falcipainas (proteasa de cisteína), Falcilisina (metaloproteasa) y una Histoaspartato proteasa. Los inhibidores de estas enzimas constituyen potenciales blancos antimaláricos. (Rosenthal 2004)

Los eritrocitos contienen altas concentraciones de hemoglobina, sistemas transportadores de iones y solutos, además de un citoesqueleto y una membrana deformable, lo cual refleja la función especializada de esta célula para el transporte de oxígeno y para atravesar los finos capilares (Haldar and Mohandas

2007). La entrada del parásito a la célula es un proceso dinámico, lo que demanda una interacción entre las proteínas del eritrocitos y las proteínas superficiales del parásito, en unión de varias proteasas (Dvorak, Miller *et al.* 1975).

3.3 PROTEASAS DE *Plasmodium spp*

Décadas de investigación han logrado definir el rol de las proteasas en los diferentes estadios del parásito de la malaria, el cual pertenece a los apicomplexas, y juegan un papel importante en tres aspectos relevantes: Invasión a la célula huésped, catabolismo y ruptura de la célula huésped. Este parásito se caracteriza por poseer gránulos secretores llamados: roptrias, micronemas, y gránulos densos, los cuales contienen proteínas que son secretadas facilitando la motilidad, adhesión a la célula huésped y remodelación de la misma (Farrow, Green *et al.* 2011). El proceso de invasión ocurre en un corto período de tiempo; estas formas extracelulares no sobreviven por largos períodos de tiempo fuera de la célula, una unión es mediada por múltiples receptores proteicos, esto crea una invaginación, arrastrando al parásito hacia el interior (Blackman 2004)

En *Plasmodium spp*, las proteínas de superficie del merozoíto (MSP1), el antígeno de membrana apical 1(AMA1), las proteínas del cuello de la roptria (RPN) y el antígeno con repeticiones de serina (SERA), juegan roles importantes en la invasión. Muchas de estas proteínas son procesadas proteolíticamente durante el tráfico y llegada a la superficie del parásito. (Farrow, Green *et al.* 2011)

3.3.1 Subtilisinas.

Subtilisinas pertenecen a la clase de enzima proteasa de serina. Está presente en los géneros de la familia apicomplexa. *Plasmodium falciparum* posee tres subtilisinas, pero solo dos son reconocidas por su papel en el ciclo de vida

intraeritrocitario *PfSUB1* y *PfSUB2* (Withers-Martinez, Jean *et al.* 2004). La *PfSUB1* tiene un papel importante en la salida de la célula huésped y la invasión.

3.3.2 Proteasa romboidal.

Es una serina proteasa que se encuentra en la membrana interna en organismos eucariotas y procariotas (Urban and Freeman 2002). Esta proteína fue identificada en *Plasmodium falciparum* y participa en el proceso de adhesión *PfROM1* y *PfROM4*; la primera corta una serie de sustrato con dominio transmembrana y está involucrada en la fase de invasión del parásito, mientras *PfROM4* corta en sitios de unión entre el eritrocito y adhesinas (Baker, Wijetilaka *et al.* 2006)

3.3.3 Proteasas de cisteína.

La inhibición de las proteasa de cisteína bloquea la invasión del parásito. Se han identificado pocas proteasas candidatos a blanco farmacológico en *Plasmodium spp.* Se ha identificado la Falcipaina 1; esta proteasa está implicada en la invasión del eritrocito. También existen en el parásito otras falcipainas que están involucradas en la degradación de la hemoglobina Fp 2 (Greenbaum, Baruch *et al.* 2002).

3.4 PROTEASAS INVOLUCRADAS EN EL CATABOLISMO INTRAERITROCITARIO.

En el interior de la vacuola digestiva existen cisteín y aspartil-proteasas, las cuales degradan la hemoglobina hasta sus productos finales que son los aminoácidos. Estos son utilizados para el desarrollo del parásito y la regulación osmótica de la célula hospedera (Farrow, Green *et al.* 2011).

Las plasmepsinas constituyen una familia de aspartil-proteasa, constituida por cuatro miembros: Plasmepsina I, II, IV e histo-aspartil-proteasa. La plasmepsina I y II inician la degradación de la hemoglobina, mientras que plasmepsin IV y la histoaspartil-proteasa participan en la degradación de los péptidos generados por las dos primeras aspartil-proteasas (Dame, Yowell *et al.* 2003). Cuando los genes de plasmepsina, cistein-proteasas, falcipaina 2, 2', 3 y dipeptidil-aminopeptidasa 1 (DPAP1) son interrumpidos se producen defectos en el crecimiento del parásito (Singh, Sijwali *et al.* 2006)

Proteasas involucradas en la salida del parásito de la célula huésped.

No está claro el mecanismo por el cual las proteasas regulan la salida del parásito. Un modelo propone la degradación de la membrana parasitófora seguido de la ruptura de la membrana eritrocitaria. Un segundo modelo propone un proceso contrario donde ocurre la degradación inicial de la membrana eritrocitaria y posterior salida de los merozoítos de la vacuola parasitófora figura 6 (Blackman 2008).

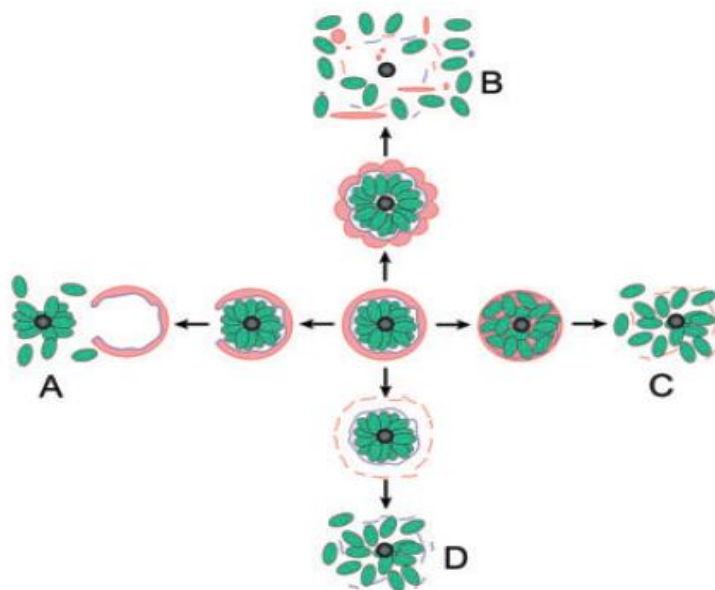


Figura 6. Modelos de salida del merozoíto de la célula huésped involucrando fusión de las membranas (parásito y glóbulo rojo).

Recientemente fue demostrado la ruptura de la membrana parasitófora seguida de una ruptura explosiva de la membrana eritrocitaria lo cual facilitaba la diseminación de los merozoítos procedentes de la célula huésped (Gilson and Crabb 2009). Esta serie de eventos involucran la desestabilización de ambas membranas y del citoesqueleto de la célula huésped. Un estudio en *P. falciparum* cultivado *in vitro* fue tratado con una mezcla de leupeptina, quimostatina y pepstatina, e inhibidores de proteasa de serina, cisteína, y aspártica, lo cual produjo la acumulación de esquizontes maduros en el medio de cultivo bloqueando la liberación de los merozoítos (Lyon and Haynes 1986).

Existen evidencias que demuestran que la Plasmepsina II, una proteasa aspartica que actua a pH neutro degradando proteínas del citoesqueleto como la espectrina, proteína 4.1 y actina, se ha detectado en el citoplasma de eritrocitos parasitados con estadio de esquizonte maduro (Le Bonniec, Deregnaucourt *et al.* 1999).

Se ha demostrado que cuando el parásito se cultiva en presencia de inhibidores de proteasas como el compuesto L-trans-epoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)-butano (E 64), se forman agrupaciones de merozoítos circundados por una membrana parasitófora intacta. Este hecho demuestra que el parásito requiere la actividad de la cistein-proteasa a fin de cumplir con la liberación y posterior invasión de la célula huésped (Soni, Dhawan *et al.* 2005).

El parásito de la malaria también posee una proteína llamada antígeno rico en serina (SERA), el cual se encuentra de forma abundante en la vacuola parasitófora. A esta familia de proteínas pertenecen varios miembros, entre los que se destacan SERA 5 y SERA 6, los cuales no pueden ser interrumpidos ya que son indispensables en el ciclo de vida del parásito (McCoubrie, Miller *et al.* 2007)

En el proceso natural que media la salida del parásito, se requieren aproximadamente 10 miembros pertenecientes a esta familia, en SERA 5 se

realiza un corte en el extremo N-terminal seguido de un segundo corte en el extremo C-terminal (Smith, Walliker *et al.* 2002), quedando un fragmento central llamado P56, que posteriormente es procesado para formar el P50, el cual se acumula en los sobrenadantes de los cultivos del parásito, en contraste los fragmentos N y C terminal llamados P47 y P18 respectivamente permanecen asociados por un puente disulfuro unidos a la superficie del merozoíto liberado (Blackman 2008).

Otros estudios han demostrado que el procesamiento de SERA 5, es mediado por otra proteasa semejante a subtilisina la *PF*SUB1, la cual está asociada a la membrana del esquizonte (Smith, Walliker *et al.* 2002).

3.5 PROTEASAS EN EL CICLO INTRAERITROCITARIO DE *Plasmodium spp*

Muchas enzimas proteolíticas juegan un rol importante en el ciclo eritrocitario del *Plasmodium falciparum* causante de la malaria severa. Durante el ciclo reproductivo de la fase asexual, el parásito degrada hemoglobina, este proceso degradativo de la hemoglobina involucra proteasas de varias clases incluyendo cisteín-, aspartil- y metaloproteasas (Fear, Komarnytsky *et al.* 2007, Coronado, Nadovich *et al.* 2014). Estudios han demostrado que inhibidores de la cisteín-proteasa como Peptidil fluorometil cetona (Rosenthal 2002), Vinyl sulfona e Inhibidores tipo aldehído (Lee, Fridman *et al.* 2004) bloquean el crecimiento del parásito cultivado *in vitro* y protege parcial o completamente de malaria letal a ratones infectados. Recientemente ha llamado la atención la aspártil-proteasa como blanco antimalárico, más específicamente plasmepsina (Ersmark, Samuelsson *et al.* 2006).

Loa estudios han mostrado que la actividad de la cisteín-proteasa se requiere para la degradación de hemoglobina por el *Plasmodium falciparum* y fue identificada una cisteín-proteasa de trofozoíto, (Rosenthal 1998), la cual tiene propiedades

similares a la cisteín-proteasa lisosomal *cathepsina L* (Subramanian, Hardt *et al.* 2009).

Las limitaciones de la terapia antimalárica señalan la necesidad de nuevos fármacos con actividad contra este parásito, un blanco potencial para esta actividad son las proteasas del *Plasmodium falciparum* (Rosenthal 1998).

La ruptura del eritrocito en el estadio de esquizonte maduro y la subsecuente invasión a un nuevo eritrocito por los merozoítos libres, requiere de las proteasas del parásito. Posiblemente para romper el citoesqueleto del eritrocito (Rosenthal 1998), un número de proteínas del parásito son procesadas durante la finalización del estadio de esquizonte y liberación del merozoíto. Un ejemplo es el procesamiento de la proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP1), que es inhibida por un inhibidor de serin-proteasa (Blackman 2000) presumiblemente para facilitar una serie de eventos complejos que involucran la ruptura e invasión del eritrocito.

3.5.1 Digestión de la hemoglobina por *Plasmodium* spp: blanco farmacológico.

La digestión de la hemoglobina en el parásito de la malaria se lleva a cabo en la vacuola digestiva acidófila con pH de 5.2 e involucra la actividad de endopeptidasas incluyendo aspártil-proteasas (Plasmepsina I, II y IV Histoaspártil-proteasas), tres cisteín-proteasas (Falcipaina 2, 2' y 3) una metaloproteasa (Facilisina) Fig 7.

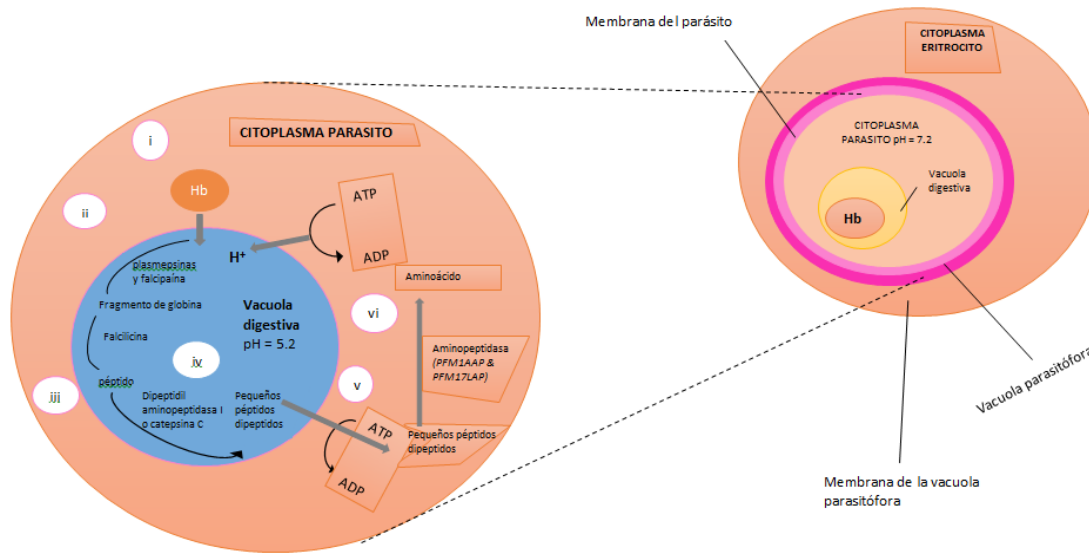


Figure 7. Digestion de la hemoglobina en la vacuola digestiva del parásito (Grellier, Maroziené *et al.*).

La acción combinada de estas enzimas, degrada la hemoglobina en pequeños péptidos y éstos son reducidos a dipéptidos por *dipeptidil aminopeptidasa I* o *catepsina C*, y estos pequeños péptidos son degradados hasta aminoácidos. Aún no está claro si el compartimiento específico donde ocurre la liberación de los aminoácidos libres, se cree es en el interior de la vacuola digestiva del parásito (Skinner-Adams, Stack *et al.* 2010)

El estadio intraeritrocitario de la malaria conlleva una serie de eventos que involucran rutas metabólicas específicas. Una vía esencial y de particular interés en el descubrimiento de fármacos es la digestión de la hemoglobina (Ersmark, Feierberg *et al.* 2004, Ersmark, Samuelsson *et al.* 2006). El parásito de la malaria degrada del 75-80% (Coronado, Nadovich *et al.* 2014), de la hemoglobina del huésped en un proceso cuyo resultado son aminoácidos libres (Loria, Miller *et al.* 1999), los cuales son utilizados por el parásito en una variedad de procesos críticos, que incluyen la síntesis de proteínas (Rosenthal 2002) y el mantenimiento de la presión osmótica en el interior del glóbulo rojo, previniendo la lisis prematura del eritrocito (Lew, Macdonald *et al.* 2004). El parásito de la malaria tiene la capacidad de tomar algunos aminoácidos del medio, sin embargo también es

capaz de sintetizar asparagina, glutamina, glicina, prolina, aspartato y glutamato (Payne and Loomis 2006). Muchos estudios se han enfocado en las enzimas de la vacuola digestiva del parásito más específicamente en falcipainas y plasmepsinas (Jiang, Prigge *et al.* 2001).

CAPITULO IV.

4 ESTRÉS OXIDATIVO EN EL DISEÑO DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS.

El estrés oxidativo es un mecanismo importante para la destrucción de parásitos intracelulares, la mayoría de ellos tienen mecanismos que previenen el estrés oxidativo. Así, el *Plasmodium* contiene tres enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutasa (SOD), Glutación Peroxidasa (GPx), y Peroxiredoxin Reductasa Tiol-dependiente (Turrens 2004). Cabe anotar que no solo el parásito sufre estrés oxidativo, la célula huésped también muestra alteraciones oxidativas cuando está infectada por plasmodium. Esto se ha demostrado por cambios en la fluidez de la membrana del eritrocito, probablemente por alteración de la composición lipídica de la membrana y entrecruzamiento de proteínas, (Omodeo-Salè, Motti *et al.* 2003), y el aumento en niveles celulares de especies reactivas del oxígeno (Ashley, McGready *et al.* 2006).

4.1 ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA Y ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo ha estado asociado a la patología y a la eliminación del parásito de la malaria del huésped. La patología en la infección por malaria es considerada como una consecuencia de la respuesta inmune al parásito de la malaria en circulación, por lo tanto el balance entre especies reactivas de oxígeno (EROS) (Ashley, McGready *et al.* 2006) intermediarios reactivos de nitrógeno y la eliminación del parásito es de gran importancia en el resultado final de la parasitosis (Legorreta-Herrera, Retana-Ugalde *et al.* 2010).

En la infección por malaria ocurre un reclutamiento masivo de monocitos y neutrófilos, produciendo un incremento en los niveles de EROS. Sin embargo el estrés oxidativo durante la infección por Plasmodium, es benéfico para el paciente

en la eliminación del parásito, en su estadio intraeritrocitario; esto ha sido demostrado *in vivo* e *in vitro* (Becker, Tilley *et al.* 2004). Se ha demostrado que compuestos oxidantes de estructura diversa son capaces de matar el parásito (Wainwright and Amaral 2005). De otro lado, en cultivos continuos del parásito se demostró que este crecía bien a bajas concentraciones de oxígeno, y que moría a altas concentraciones del mismo por estrés oxidativo (Trager and Jensen 1976). También se ha demostrado el papel que juega el estrés oxidativo en la patogenia y eliminación del parásito, y en algunos desordenes genéticos como la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), anemia de células falciformes y talasemias, los cuales son comunes en áreas tropicales donde la malaria es endémica, y se cree que protege de manera relativa a los individuos portadores de estos desordenes (Postma, Zuidema *et al.* 1996, Ayi, Turrini *et al.* 2004).

Alteraciones en la estructura de la hemoglobina, número de cadenas de globina o deficiencia de la enzima G6PD, hacen al glóbulo rojo más sensible al estrés oxidativo, creando de esta manera un ambiente desfavorable para el desarrollo intraeritrocitario del parásito (Orjih, Chevli *et al.* 1985).

4.2 DEFENSAS ANTIOXIDANTES DE LA CÉLULA HUESPED.

El estado redox de una célula es mediada por la relación de piridin-nucleótidos reducidos y oxidados [NAD (NADPH/NAD)], glutatión reducido/glutatión disulfuro (GSH/GSSG) y tioredoxin reducido/tioredoxin disulfuro[Trx(SH₂)/Trx(S)₂] (Müller 2004). Estas relaciones están involucradas con los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno (Ashley, McGready *et al.* 2006), al igual que la actividad de muchas enzimas involucradas en funciones antioxidantes. Las cuatro principales enzimas antioxidantes son el superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y peroxirredoxina (Kawazu, Komaki-Yasuda *et al.* 2008) y compuestos antioxidantes no enzimáticos que dependen del estado redox de los

nucleótidos de piridina, así como también los tioles como glutatión y tioredoxina (Becker, Tilley *et al.* 2004)

La primera línea de defensa antioxidante es la superóxido dismutasa (SODs), una familia de metaloproteasa que catalizan la dismutación de anión superóxido para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fridovich 1995). El H_2O_2 necesita ser reducido hasta agua y oxígeno para prevenir la oxidación de otros componentes celulares, esta reacción es catalizada por una variedad de peroxidases, las cuales incluyen catalasa, hemoperoxidasa, glutatión dependiente de peroxidasa (GSH-Px) y peroxiredoxinas (Wood, Schröder *et al.* 2003).

4.3 OXIDACIÓN Y BIOMOLÉCULAS.

El ADN, proteínas y lípidos son atacados por el radical hidroxilo dando lugar a una variedad de productos, que son generados por reacciones con las bases nitrogenadas y azúcar desoxirribosa en el caso del ADN, el radical hidroxilo puede adicionarse a la guanina hasta producir *8-hidroxi-2-deoxiguanosina*, atacar residuos de azúcar causando rupturas del esqueleto, actuar sobre las proteínas histonas y conducir a la formación de enlaces cruzados que interfieren con el plegamiento de la cromatina, y por lo tanto con la transcripción y la reparación, mutaciones y expresión de genes aberrantes (Burton and Jauniaux 2011). La 8-OHdG (8-Oxo-2'-deoxyguanosine) es una molécula útil como marcador de daño oxidativo en el material genético y se ha postulado como marcador de estrés oxidativo. A nivel de proteínas, suelen causar alteraciones, e inactivación de las mismas. En los lípidos ocurre la peroxidación lipídica.

4.3.1 Modificación de proteínas.

Las proteínas poseen diversos grupos susceptibles a la oxidación, los cuales son modificados al exponerse a las especies reactivas del oxígeno (Ashley, McGready

et al. 2006). La oxidación de proteínas puede ser irreversible o reversible, esta última constituye una forma de activar o desactivar proteínas que tienen como función una regulación redox, la formación de puente disulfuros entre grupos tioles de cisteínas. La glutationilación y la S- nitrosilación también constituyen una forma de oxidación reversible (Díaz-Acosta and Membrillo-Hernández 2006).

La oxidación irreversible se da por cuatro mecanismos: 1. Carbonilación, 2. Ruptura de enlaces peptídicos, 3. Nitración y 4. Formación de enlaces proteína-proteína. Estas son ocasionadas por reacción de proteínas con ROS, las cuales se producen por radiaciones ionizantes o por oxidación catalizada por un metal (OCM). Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación, y la oxidación de estas conduce a la modificación de las mismas con consecuencias como son la pérdida de actividad catalítica, modificación en aminoácidos, formación de grupos *carbonilos*, cambios en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes intra e interproteicos, formación de puentes disulfuros y mayor susceptibilidad a la proteólisis (Cabiscol, Tamarit *et al.* 2010)

4.3.1.1 Oxidación directa de proteínas: carbonilación

Los aminoácidos son un blanco para daño oxidativo, la oxidación directa sobre las cadenas laterales se evidencia por la formación de grupos carbonilos (Aldehídos y cetonas). Los aminoácidos más vulnerables son prolina, arginina, lisina y treonina (Dalle-Donne, Rossi *et al.* 2003). Estos aminoácidos son los más sensibles a ser oxidados por reacciones catalizada por metales OCM. Los productos generados por la carbonilación son estables y para su detección puede usarse ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) o Western Blotting, siendo este último el método más usado (Myatt 2010). Los principales residuos carbonilados formados a partir de la prolina son 2-pirrolidona, arginina y prolina dan como resultado semialdehído glutámico, lisina semialdehído aminoadipico, y treonina ácido 2-amino-3-cetobutírico.

Los grupos carbonilos en las proteínas oxidadas se generan por cuatro reacciones principales. Una es la oxidación directa de proteínas, siendo el semialdehído glutámico el producto mayoritario en esta reacción y el semialdehído aminoadípico el que se forma en menor cantidad (Requena, Levine *et al.* 2003).

La segunda reacción generadora de grupos carbonilos es la ruptura de cadenas polipeptídica por la ruta de la α -amidación o la oxidación de residuos de ácido glutámico, dando lugar a la formación de péptidos en los que el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado α -cetoacilo. Las dos reacciones restantes, consisten en reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilos previamente formados por reacciones directas con ROS, como ocurre en la reacción de Michael donde con el grupo amino de la lisina, el imidazol de la histidina, el grupo sulfidrilo de la cisteína los cuales reaccionan con malondialdehído 4-hidroxi-2- nonenal y 2- propenal ambos productos de la peroxidación lipídica. Por reacción de cetoaminas cetoaldehidos y deoxiosonas, productos de la reacción de azúcares reductores o sus productos de oxidación con los grupos aminos de los residuos de lisina glicación y glicoxidación (Dalle-Donne, Rossi *et al.* 2003).

4.3.1.2 Oxidación de lípidos de membrana.

Todas las células están rodeadas por una membrana celular que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene enzimas, canales, receptores y antígenos que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y otros agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la cual funciona como una barrera de permeabilidad selectiva. Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y por lo tanto, son vulnerables al ataque de radicales libres, los cuales traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo (HO^\cdot) que sustrae un hidrógeno de la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado. Este último reacciona

con oxígeno para formar peróxidos cíclicos y radicales hidroperóxidos, que propagan esta reacción en cadena, se forman igualmente radicales alcoólicos lipofílicos. La peroxidación lipídica puede seguir propagándose en presencia de metales de transición (Mn^{+}) existentes en el plasma, actuando como catalizadores oxidativos. El radical hidroxilo puede actuar sobre los ácidos grasos poliinsaturados de membrana, sustrayendo un átomo de hidrógeno de éstos, iniciando un proceso de oxidación lipídica formándose el peróxido lipídico y hidroperóxido lipídico (Marnett 1999).

4.4 ESTRÉS OXIDATIVO EN ERITROCITOS INFECTADOS POR *Plasmodium spp.*

El estrés oxidativo es responsable de cambios fisicoquímicos en la membrana eritrocitaria en infecciones por *Plasmodium* (Das and Nanda 1999) Las células eucariotas, debido al estado metabólico normal son expuestas al estrés oxidativo, por lo tanto se encuentran dotadas con sistemas antioxidantes que le permiten hacer frente a estas especies reactivas, formadas durante el metabolismo (Das and Nanda 1999). El parásito de la malaria es vulnerable al estrés oxidativo durante su estadio de vida intraeritrocitaria (Becker, Tilley *et al.* 2004). El parásito vive en un ambiente prooxidante el cual está dado por la presencia de oxígeno y hierro prerrequisitos claves para la formación de ROS vía reacción de fenton.

La hemoglobina representa la principal fuente de aminoácidos para los parásitos del género *Plasmodium*, pero su degradación en la vacuola digestiva ácida genera la producción del grupo hemo o ferroprotoporfirina IX (FP IX) libre, la cual es tóxica, ya que reacciona con oxígeno y genera EROS (Ashley, McGready *et al.* 2006). Esta combinación es letal para los esquizontes intraeritrocitarios, al igual que para las células del huésped (Ferreira, Balla *et al.* 2008). El grupo hemo de la hemoglobina en la vacuola digestiva es conducida a una oxidación espontánea de Fe^{+2} a Fe^{+3} y la formación de anión superóxido. Esta combinación de manera

inevitable conduce a la formación de peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo ambos intermediarios tóxicos y reactivos (Fridovich 1997, Siow and Sarna 2011).

4.5 DEFENSAS ANTIOXIDANTES DEL ERITROCITO.

El eritrocito maduro carece de núcleo y mitocondrias, no cuenta con una maquinaria que le permita obtener energía y sintetizar proteínas como el resto de células, es por esto que utiliza rutas metabólicas alternativas para mantener niveles de ATP y reductores necesarios para llevar a cabo sus funciones vitales, obteniendo su energía de la degradación de la glucosa por la ruta de la glicolisis anaerobia (Acosta Sánchez, Núñez *et al.* 2003).

La enzima G6PD, interviene en la ruta de las pentosas, convirtiendo la glucosa 6 fosfato (G6P) proveniente de la glicolisis anaerobia (Hawthorne, Trenholme *et al.*) en 6 fosfogluconato, resultando NADPH en la reducción a partir de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP). La coenzima NADPH es la donante de electrones fundamental para un número importante de reacciones enzimáticas. Algunas de estas reacciones, por ejemplo la catalizada por la enzima glutatión reductasa (Ashley, McGready *et al.* 2006), es importante en la protección de la célula contra el estrés oxidativo (Anderson 1996, Méndez, Linares *et al.* 2011).

Las reacciones más importantes relacionadas con la oxidación de NADPH, son las realizadas con el glutatión. Los eritrocitos contienen concentraciones relativamente altas (2mM) de glutatión reducido (tripéptido: g-glutamilcisteinilglicina) GSH, este protege al eritrocito de agentes oxidantes como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, los cuales son productos normales de la oxidación de la hemoglobina figura 8 (Winterbourn 1985).

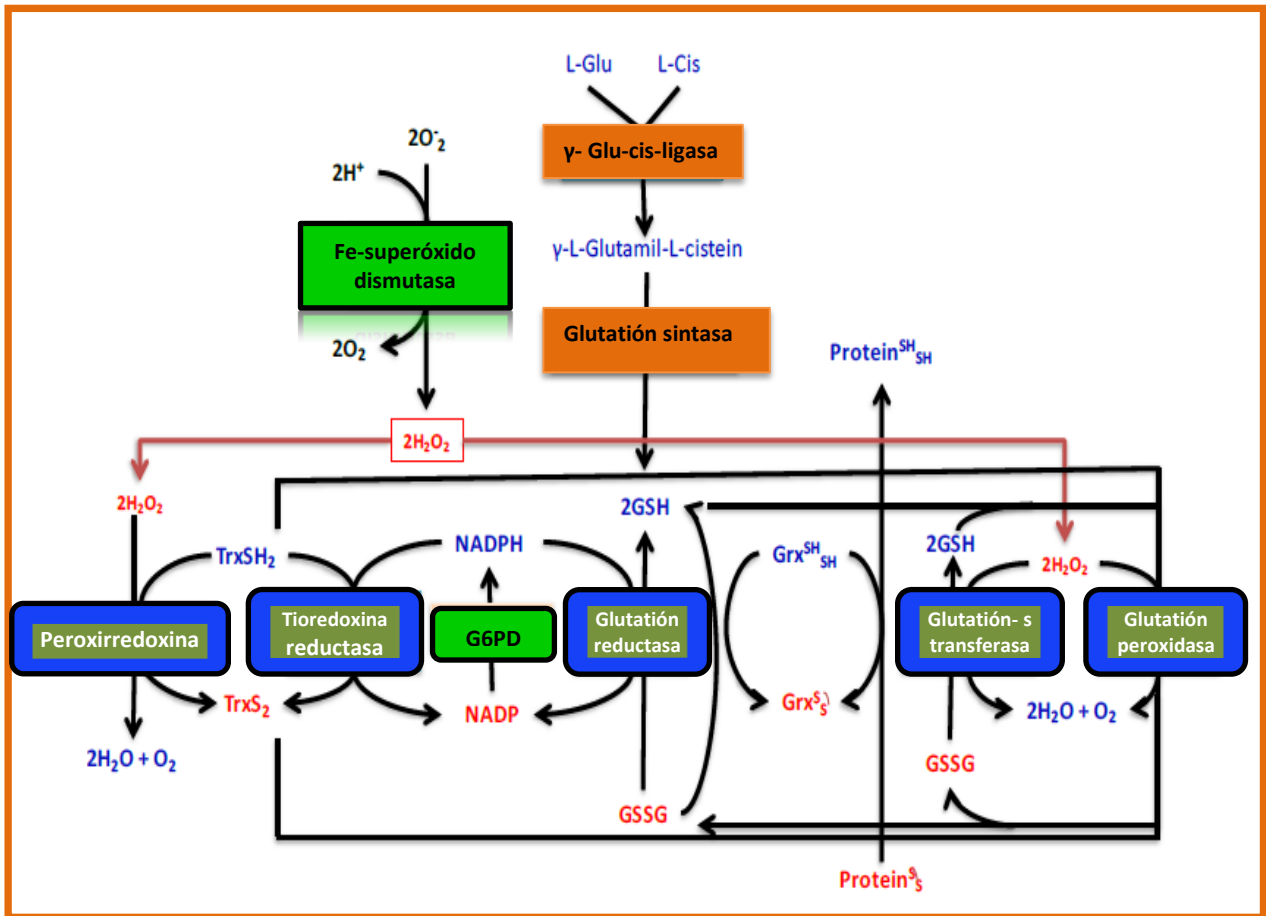


Figura 8. Defensas antioxidantes del eritrocito. La G6PD tiene un papel central en la defensa antioxidante del eritrocito. G6PD suministra el NADPH para la cascada antioxidante en el eritrocito. (Mason, Bautista et al. 2007)

4.6 ESTRÉS OXIDATIVO EN GLÓBULOS ROJOS ALTERADOS GENÉTICAMENTE.

Con respecto a la talasemia que resulta de un desbalance en la producción de las cadenas de globina, esta conduce a la generación de radicales libres debido a la inestabilidad de estas, seguida de la degradación de las mismas con producción de hemicromos, hemo libre y hierro molecular (Shinar and Rachmilewitz 1990).

Las células con agregados de hemicromos a su membrana y banda 3 son más susceptibles al complemento fijándose a los anticuerpos antibanda 3, favoreciendo

así la fagocitosis y remoción de células parasitadas (Hebbel and Miller 1984) y por tanto disminuyendo la parasitemia.

Las células falciformes y células de individuos con talasemia, presentan un espectro de anormalidades en la membrana y cambios bioquímicos en las reacciones redox, lo cual involucra grupos tioles de proteínas, alteraciones lipídicas, agregados de hemicromos y banda 3-inmunoglobulina, deformabilidad deficiente y perturbación en el equilibrio homeostático (Advani, Rubin *et al.* 1992).

Alteraciones genéticas en los glóbulos rojos como deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, talasemia y anemia de células falciformes inducen un efecto protector contra la malaria (Akide-Ndunge, Tambini *et al.* 2009). Estas patologías imponen un estrés oxidativo adicional a la célula hospedera y al parásito, induciendo a una remoción temprana de glóbulos rojos parasitados por fagocitos del huésped (Ayi, Turrini *et al.* 2004).

4.7 ESTRÉS OXIDATIVO EN *Plasmodium spp*

La respiración mitocondrial en células eucariotas juega un papel importante en el metabolismo energético y es la fuente principal en la generación de ATP, mediado por procesos como la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones. La cadena transportadora de electrones se ubica en la membrana interna mitocondrial y está conformada por cuatro complejos acoplados energéticamente (Complejo I, complejo II, complejo III y complejo IV), los cuales funcionan como bombas protónicas de óxido-reducción (Siow and Sarna 2011). El complejo I, denominado NADH deshidrogenasa ha sido aislado a partir de *Plasmodium falciparum* y *P. berghei*. El complejo II Succinato Deshidrogenasa, en *Plasmodium falciparum* se compone de dos subunidades, una flavoproteína y una proteína hierro-sulfuro. La reacción enzimática que cataliza este complejo requiere de succinato y coenzima Q (CoQ) para su máxima actividad. El complejo III

ubiquinona-citocromo-c oxidoreductasa, llamado también complejo citocromo bc1 o citocromo C reductasa, se ha evidenciado en *Plasmodium falciparum* y *P. yoelii*. El complejo IV o citocromo oxidasa cataliza la oxidación de citocromo c reducido y es sensible a cianuro y otros venenos; en el *Plasmodium* spp el complejo IV es insensible a cianuro. Se conoce un sistema de oxidasa alternativo presente en la mitocondria de *Plasmodium* (Uyemura, Luo *et al.* 2000).

4.7.1 Formación de especies reactivas de oxígeno en glóbulo rojo infectado

El parásito de la malaria es expuesto al estrés oxidativo a lo largo de su ciclo de vida. El principal contribuyente de este estrés es la respuesta inmune del huésped, y el ambiente rico en oxígeno del eritrocito donde reside el parásito durante varios estadios de su ciclo biológico. Por último, la liberación de hierro y su metabolismo durante la degradación de la hemoglobina en el ciclo intraeritrocitario del mismo, siendo este último el principal causante de estrés oxidativo en el parásito (Loria, Miller *et al.* 1999).

Cuando el parásito entra al eritrocito del huésped toma la hemoglobina y la degrada en sus dos componentes: La globina, que es metabolizada en la vacuola digestiva y es degradada hasta aminoácidos libres los cuales son usados por el parásito para su desarrollo (Radfar, Diez *et al.* 2008) y el grupo hemo -FP IX- (ferroprotoporfirina IX) y adicionalmente, este conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno figura 9. Gran parte del grupo hemo en el interior de la vacuola digestiva es posteriormente cristalizado hasta formar hemozoina o pigmento malárico (Zhang, Krugliak *et al.* 1999). Una parte del hemo no es biocristalizado y genera hierro libre, el cual cataliza la formación de agentes oxidantes como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Hempelmann, Motta *et al.* 2003). Luego de liberada la globina, el hemo es biocristalizado en un 90% hasta formar hemozoina no tóxica o pigmento malárico (Egan, Combrinck *et al.* 2002). Otras rutas alternativas para degradar la ferroprotoporfirina IX incluye la reacción con glutatión (GSH) y la unión a proteínas (Campanale, Nickel *et al.* 2003). Sin embargo, si se escapa un porcentaje mínimo (0.5 %) de FP IX al

proceso de detoxificación, este puede causar daño a la membrana del parásito, inhibir las enzimas del mismo y lisar el eritrocito huésped (Becker, Tilley *et al.*

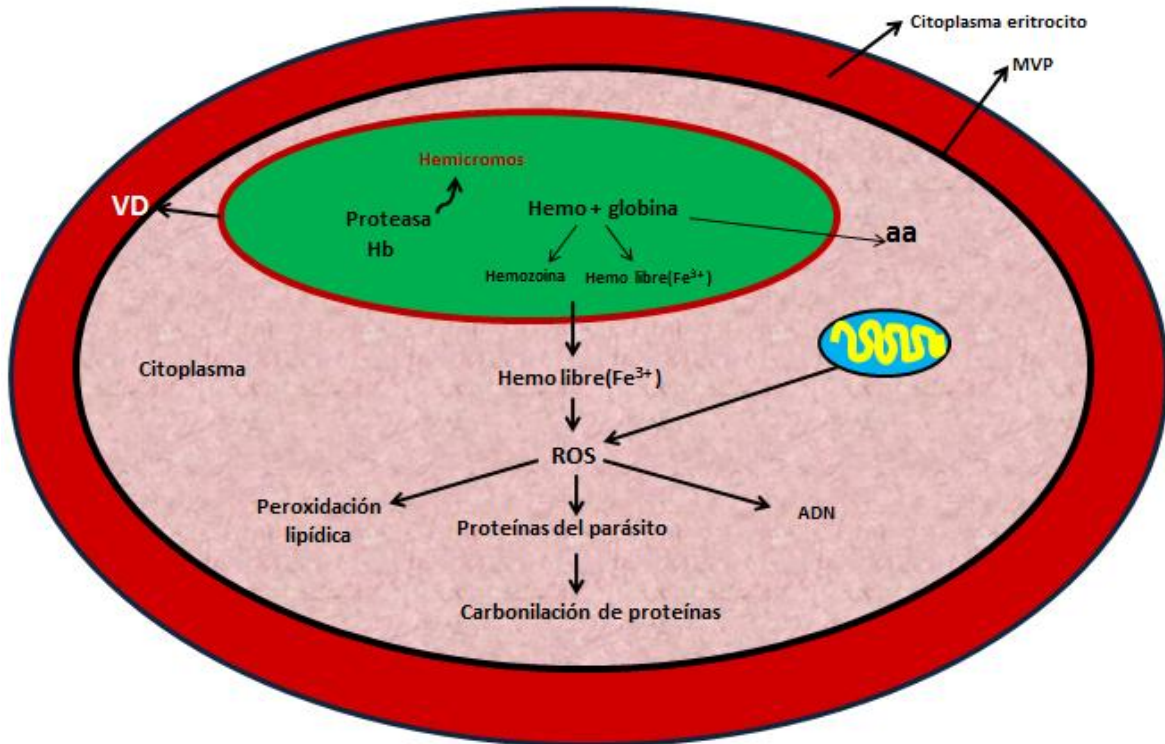


Figura 9. Formación de especies reactivas de oxígeno en el *Plasmodium falciparum*. Adaptado de Kumar *et al* 2007.

Otro producto de la degradación de la hemoglobina son los hemicromos, restos de hemoglobina desnaturada, estos hemicromos se unen a proteínas integrales de membrana y del citoesqueleto formando puentes disulfuro, un 10 % de uniones no son realizados al azar y forman agregados de detergentes insolubles, conformados predominantemente por hemicromos y proteína de membrana banda 3 (Canal anionico). La formación de estos agregados, ocurre en glóbulos rojos normales expuestos al estrés oxidativo. Este proceso se da en mayor proporción en células alteradas genéticamente.(Browne, Shalev *et al.* 1998) talasemias (Shinar and Rachmilewitz 1990).

El parásito de la malaria mantiene el equilibrio redox, con un arsenal de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular, siendo la más importante el tripeptido glutati6n (GSH) al igual que enzimas antioxidantes.(Campanale, Nickel *et al.* 2003).

4.8 SISTEMAS ANTIOXIDANTES DE *Plasmodium Spp*

El parásito causante de la malaria en su ciclo intraeritrocitario en el huésped vertebrado genera grandes cantidades de EROS, los cuales causan daños en las macromoléculas del parásito (Kawazu, Komaki-Yasuda *et al.* 2008). Es por ello que el parásito cuenta con sistemas antioxidantes, los cuales tienen un papel de vital importancia durante su desarrollo en la célula huésped, tales defensas pueden ser blancos potenciales en el control de la malaria (Krauth-Siegel, Bauer *et al.* 2005). De otro lado, el parásito utiliza el GSH sintetizado por la célula huésped para la eliminación de especies reactivas del oxígeno, esto se ha demostrado por un incremento en la actividad de la vía hexosa monofosfato en eritrocitos infectados, (Ginsburg and Atamna 1994, Olszewski and Llinás 2011), incrementándose de esta manera el NADPH en el eritrocito.

El parásito también posee *Glutamato deshidrogenasa* e *Isocitrato deshidrogenasa*, los cuales producen NADPH (Olszewski and Llinás 2011). El parásito también adopta enzimas antioxidantes del eritrocito, como la SOD y catalasa, encargadas de reducir el H₂O₂ producido durante la digestión de la hemoglobina (Ginsburg and Atamna 1994).

4.8.1 Superoxido dismutasa (SOD) de *Plasmodium spp*

El *Plasmodium spp* cuenta con una FeSOD 1 citoplasmática, y una MnSOD 2 mitocondrial (Müller 2004). El gen SOD1 se expresa durante el estado intraeritrocitario del *Plasmodium falciparum*. También se han encontrado genes

relacionados en *P. ovale*, *P. vivax* y *P. malariae* al igual que en otros apicomplexas. Existen evidencias de que el *Plasmodium falciparum* toma grandes cantidades de Cu/Zn SOD del eritrocito, ya que su actividad disminuye cuando se encuentra parasitado (Postma, Zuidema *et al.* 1996).

Sistema Glutación En *Plasmodium Spp*

El sistema glutatión (GSH) se encuentra en todos los tipos celulares y juega un papel importante en las defensas antioxidantes a través del mantenimiento en estado reducido de los grupos sulfhídricos de las proteínas, el glutatión reduce los grupos sulfhídricos de las cisteínas que forman las proteínas, y la reducción de H₂O₂ y lipoperoxidos (Andricopulo, Akoachere *et al.* 2006). El GSH es un sustrato de la glutatión S transferasa (GSTs) y de la glutatión peroxidasa (GPxs). El glutatión oxidado (GSSH) es reducido a GSH por la enzima glutatión reductasa (Ashley, McGready *et al.*) usando NADPH como donador de electrones (Campanale, Nickel *et al.* 2003). La estructura tridimensional de glutatión reductasa (*PfGR*) ya ha sido resuelta y sus inhibidores están siendo sometidos a estudios para el desarrollo de nuevos fármacos antimaláricos (Buchholz, Mwongela Mailu *et al.* 2007). *Plasmodium falciparum* tiene una isoenzima de Glutatión S transferasa (GST) y su similitud con secuencias de GST de otros organismos es muy baja; menor del 37%. (Becker, Tilley *et al.* 2004).

En el parásito, esta enzima tiene actividad de peroxidasa la estructura cristalizada de *PfGSTs* no pertenece a ninguna clase de GST conocida, así que representa una estructura novedosa convirtiéndola en un blanco para el diseño de nuevos antimaláricos (Hiller, Fritz-Wolf *et al.* 2009). En el *Plasmodium falciparum* aún no se ha caracterizado un glutatión peroxidasa (GPx) genuino (Kawazu, Komaki-Yasuda *et al.* 2008).

4.8.2 Sistema tioredoxina en *Plasmodium falciparum*

P. falciparum posee una serie de proteínas que pertenecen a la familia de las tioredoxinas, las cuales se caracterizan por tener un sitio activo específico con un plegamiento característico en su estructura. Esta familia incluye tioredoxina (Trx) glutaredoxina y otras proteínas parecidas a tioredoxinas (Müller 2004). Estas proteínas interactúan con una variedad de proteínas que mantienen el estado redox en equilibrio como peroxidases y proteínas de bajo peso molecular dependientes de tioles. Las peroxiredoxinas son enzimas antioxidantes. Su función biológica es la reducción de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos a expensas de un reductor que es el GSH o peroxiredoxina. En *P. falciparum* se han encontrado genes que codifican cinco peroxiredoxinas y proteínas parecidas a tioredoxinas (Andricopulo, Akoachere et al. 2006). En *P. falciparum* se ha hallado una tioredoxin peroxidasa, dependiente de flavina, que reduce tioredoxina por medio de un par cisteín – cisteína ubicada cerca del extremo C terminal de la enzima (Gilberger, Walter et al. 1997). En el parásito, ésta Prx juega un papel importante en el mantenimiento del estado redox, y estudios con genes knock-out mostraron que es esencial para la supervivencia del parásito durante su fase intraeritrocitaria (Krnajski, Gilberger et al. 2001). Aun no se ha caracterizado la estructura de PfTrx, sin embargo algunos inhibidores están siendo estudiados, con el propósito de desarrollar algún fármaco con actividad antimalárica que actúe inhibiendo esta enzima (Becker, Tilley et al. 2004, Andricopulo, Akoachere et al. 2006).

Las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) están ausentes en el *Plasmodium falciparum*, por lo tanto las proteínas del sistema peroxiredoxina son las responsables de la destoxicación de los peróxidos. Además se han encontrado cuatro peroxiredoxinas que actúan en diferentes compartimientos subcelulares del parásito PfPrx-1, PfPrx-2 son 2-Cys peroxiredoxinas típicas, 1-CysPrx (Jortzik, Fritz-Wolf et al. 2010) y una proteína antioxidante (AOP)(Andricopulo, Akoachere et al. 2006, Jortzik, Fritz-Wolf et al. 2010).

4.9 FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Algunos antimaláricos, tales como la cloroquina, artemisininas, peróxidos antimaláricos, antraquinonas y xantonas ejercen su actividad en parte por incremento del estrés oxidativo en el glóbulo rojo parasitado (Fitch 2004), mientras otros compuestos pueden actuar inhibiendo los sistemas de defensa del parásito al actuar sobre objetivos específicos como la glutatión reductasa (Buchholz, Schirmer *et al.* 2008).

Atovaquona, un potente antimalárico actúa inhibiendo el complejo mitocondrial bc1, uno de los mecanismos propuestos es que las quinonas, grupo al que pertenece este fármaco antimalárico, sufre una reducción dependiente de enzimas con una reducción de subsecuente ciclos de oxidoreducción, de sus radicales aniónicos y formación de ROS. Esta reacción es catalizada por flavoenzimas-electrotransferasa como citocromo P450, NADPH reductasa (Grellier, Maroziené *et al.* 2010). Entendiendo el mecanismo de acción del estrés oxidativo, este podría conducir al desarrollo de nuevos fármacos y un concepto nuevo de tratamiento. La 1,4 naftoquinona, (plumbagina, menadiona y derivados del ácido hexanóico) son importantes inhibidores de glutatión y toiredoxin reductasa, responsables de prevenir el daño oxidativo en el parásito y en la célula huésped (Feng, Guantai *et al.* 2011). El parásito de la malaria es un organismo microaerófilo, altamente susceptible al estrés oxidativo. Sus defensas antioxidantes son consideradas de vital importancia durante su ciclo de vida. Tales defensas son consideradas como un punto crucial en el desarrollo de nuevos compuestos antimaláricos (Kawazu, Komaki-Yasuda *et al.* 2008).

En este sentido es interesante notar que un número de drogas de uso clínico en la actualidad ejercen su actividad en parte por un incremento del estrés oxidativo en el parásito, por ejemplo, la cloroquina funciona previniendo la destoxificación de la FP IX, previniendo la formación del pigmento malárico (Hemozoina). Esta actividad puede ser aumentada por agotamiento del glutatión GSH (Becker, Tilley *et al.*

2004). La cloroquina actúa por su unión a la FP IX. La depleción de GSH puede disminuir de forma significativa esta detoxificación. Las reacciones redox de los metabolitos de la primaquina ejercen un importante estrés oxidativo. La artemisina y endoperóxidos antimaláricos actúan alquilando el grupo hemo y algunas proteínas del parásito. La inhibición de enzimas antioxidantes como glutatión reductasa, glutatión S transferasa y activadores de procesos redox como antraquinonas y xantonas, probablemente interfieren con la formación de hemozoina (Becker, Tilley *et al.* 2004).

CAPITULO V.

5 HIPOTESIS

El estrés oxidativo y la inhibición de la falcipaina 2, bloquean el crecimiento durante el ciclo intraeritrocitario del *Plasmodium falciparum*.

CAPITULO VI.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimalárica *in vitro* de una serie de quinonas sintéticas y proponer posibles blancos biológicos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Establecer las concentraciones de trabajo para los compuestos quinoidales evaluando la actividad citotóxica en fibroblastos y hematíes.

Evaluar *in vitro* la actividad antimalárica de los compuestos quinoidales, como inhibidores del ciclo intraeritrocitario del *Plasmodium falciparum*, utilizando 2 cepas de *Plasmodium falciparum*.

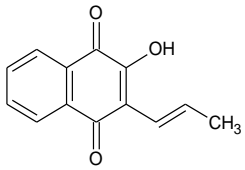
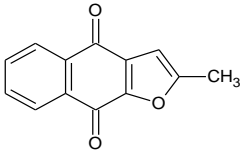
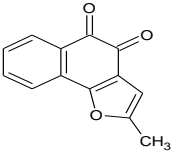
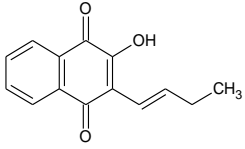
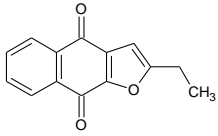
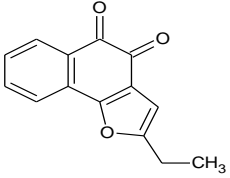
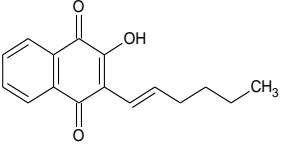
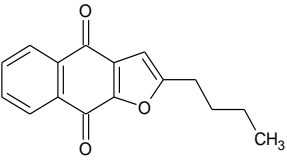
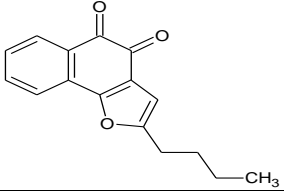
Evaluar y caracterizar los posibles blancos biológicos involucrados en la actividad antiparasitaria de los compuestos quinoidales.

CAPITULO VII.

7 METODOLOGÍA

En este trabajo se evaluó la actividad antiplasmodium de 9 compuestos quinoidales, sintetizados por el Grupo de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena, de los cuales tres son naftoquinonas intermediarias y seis furanonaftoquinonas isómeras como productos finales (tres furanonaftoquinonas lineales y tres furanonaftoquinonas angulares), la síntesis y la elucidación estructural formaron parte de un trabajo de maestría recientemente sustentado (Piermatey-Ditta 2012) tabla 1.

Tabla 1. Identificación y estructura de los compuestos quinoidales evaluados.

		
(2) 2-hidroxi-3-(1-propenil - 1,4)-naftoquinona	(3) 2-metilfurano-naftoquinona	(4) 2-metil-ortho-furano naftoquinona
		
(5) 2-hidroxi-3-(1-butil)-1,4- naftoquinona	(6) 2-etilfurano- naftoquinona	(7) 2-etil-orto-furano naftoquinona
		
(8) 2-hidroxi-3-(1-hexyl)-1,4- naftoquinona	(9) 2-butilfurano- naftoquinona	(10) 2-butil-ortho-furano naftoquinona
() No de identificación de cada compuesto sintetizado.		

7.1 EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE LAS MOLÉCULAS QUINOIDALES.

Los efectos tóxicos contra células de mamíferos se determinaron en la línea celular fibroblastos (IBR3G), las cuales fueron donadas por la Dra Julia Lorenzo de la Universidad Autonoma de Barcelona. Esta determinación se realizó mediante el uso de sales de formazan EZ4U y la solución stock de los compuestos, fue hecha en DMSO. La línea celular (IBR3G) se cultivó en el medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% en atmosfera de CO₂ al 5% a una temperatura de 37⁰ C. Seguidamente, 100 µL de la suspensión de fibroblastos (5 x 10³ cells/mL) se dispensaron en placa de 96 pozos. Estas células se incubaron por 24 horas en las condiciones antes citadas, las cuales alcanzaron una confluencia del 60-80%. La línea celular de fibroblastos (IBR3G) fue expuesta a varias concentraciones de los compuestos quinoidales. Después de la incubación de 24 horas se adicionó el compuesto EZ4U (0,2 mg/mL) y se incubó por 3 horas a 37⁰ C, y la absorbancia se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda 490 y 620 nm (longitud de onda de referencia). El control positivo se hizo por triplicado y consistió en el cultivo de fibroblastos sin tratamiento y DMSO al 0,02%, mientras que control negativo fue realizado con 50 µL de etanol absoluto.

La citotoxicidad también fue evaluada en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante exclusión del colorante azul de tripano (Conkling, Greenberg *et al.* 1988). La sangre heparinizada (de donantes saludables y no fumadores, previo consentimiento informado) se recogió, y los linfocitos de sangre periférica se aislaron por centrifugación diferencial en un gradiente de densidad de Ficoll-histopaque, siguiendo los procedimientos estándares de (Martínez, Reyes *et al.* 2007). Entonces, las células mononucleares de sangre periférica, se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U ml⁻¹ de penicilina, 100 mg ml⁻¹ de estreptomina a continuación, las células (1x10⁶), se expusieron a los valores de CI₅₀ de cada compuesto por 48 horas a 37⁰C bajo 5% de CO₂, y monitoreado con exclusión del colorante azul tripano (Huang, Wu *et al.* 2005). El 100% de viabilidad estuvo

representado por las células no tratadas, y el control negativo por células tratadas con etanol absoluto.

La actividad hemolítica de las quinonas, se evaluó mediante la liberación de hemoglobina en células rojas humanas (Krugliak and Ginsburg 2006). Los glóbulos rojos frescos previamente lavados se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 y se sembraron 1×10^6 células/pocillo en placas de 96 pocillos, los cuales fueron sometidos a las IC_{50} de los compuestos y solución de DMSO al 0,2% como control negativo, seguido de incubación por 24 horas a $37^{\circ}C$ en atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de la incubación, la preparación se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos, y la absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 540 nm (Goyal, Singh *et al.* 2012). Los experimentos se realizaron por triplicado. El control de hemólisis, se realizó con saponina al 0,2% en PBS y el porcentaje de liberación fue calculado con la siguiente ecuación.

$\% \text{ hemólisis} = (\text{Abs muestra} / \text{Abs control}) \times 100.$

7.2 EVALUACIÓN IN VITRO DE LA INHIBICIÓN DEL CICLO INTRAERITROCITICO DE *Plasmodium falciparum*

Para este estudio se usaron las cepas Dd2 de *Plasmodium falciparum* (clona MR A-150) y 3D7 (clona MRA-102). Para el cultivo del parásito, los eritrocitos de cualquier grupo sanguíneo, se extrajeron en tubos vacutainer con el anticoagulante fosfato-citrato-dextrosa y posteriormente fueron lavados (Radfar, Méndez *et al.* 2009). El cultivo se realizó en medio estándar RPMI 1640, suplementado con albúmax al 0,5%, Hipoxantina 100 μM , HEPES y bicarbonato de sodio 2,5 mM.

Cada cultivo fue iniciado mezclando eritrocitos infectados y no infectados, hasta alcanzar un hematocrito del 1%, e incubados en atmósfera de CO_2 al 5 % a una temperatura de $37^{\circ}C$. El crecimiento progresivo del cultivo y evaluación

alteraciones en la vacuola digestiva y estadio de cada cultivo, fue determinado por microscopía, en extendidos sanguíneos teñidos con el colorante de giemsa.

La selectividad de los compuestos se evaluó mediante el índice de selectividad, el cual se obtiene por la relación del valor de CC_{50} (concentración citotóxica 50) en los fibroblastos y IC_{50} correspondiente a la actividad antimalárica. ($SI = CC_{50}$ fibroblastos/ CI_{50} antimalárico) (Cos, Vlietinck *et al.* 2006).

La actividad antimalárica se realizó con cultivos sincrónicos de *Plasmodium falciparum*, la evaluación del crecimiento del parásito fue determinada por fluorimetría, luego de ser tratados con diferentes concentraciones de los compuestos (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 100,0; μ M), para este fin se utilizó el fluoróforo Pico Green invitrogen Inc (P7589), el cual fue preparado según las instrucciones del fabricante en buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). El ensayo consistió en adicionar 100 μ L de medio de cultivo con una densidad del parásitos al 1% y hematocrito de 2%, en presencia de 100 μ L de la solución de cada compuesto y cultivados durante 48 horas en atmósfera de CO_2 al 5% a una temperatura de 37⁰C. (Moneriz, Marín-García *et al.* 2009). Luego del periodo de incubación las placas fueron centrifugadas a 10.000 rpm, el sobrenadante se descartó y se lavó el sedimento y se trató con saponina al 0,2% en PBS. Luego, el pellet se lavó con PBS hasta que quedó incoloro y por último se resuspendió en PBS y se adiciona el fluoróforo picogreen. Se incubó 45 minutos a 37⁰C. Transcurrido este periodo, se realizó la lectura de fluorescencia a 485 nm de excitación y 528 nm de emisión. Las unidades de fluorescencia fueron calculadas por sustracción del control negativo (fluorescencia de eritrocitos no infectados). El porcentaje de supervivencia se determinó, como fue descrito por (Moneriz, Marín-García *et al.* 2009).

$$\% \text{ Supervivencia} = (Fp - Fcn) / (Fcp - Fcn) \times 100$$

Fcn: Control negativo de fluorescencia; Fp fluorescencia de muestra parasitada tratada; Fcp: Control positivo de fluorescencia.

El control positivo se realizó con cultivos tratados con cloroquina, utilizando ambas cepas (sensible y resistente a este fármaco).

7.3 INHIBICIÓN DE PROTEASA.

Los ensayos generales que permitieron evaluar esta actividad (papaína y subtilisina) se realizaron *in vitro* utilizando un sustrato péptidico marcado con un fluoróforo (EnzChek® Protease Assay Kit-E33758; Invitrogen). Estos ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, 50 µL de dilución de las proteasas fueron tratadas con los compuestos a diferentes concentraciones, por 10 minutos, después de este tiempo se adicionaron 50 µL de la solución de trabajo con el sustrato (1,57 mg in 50% DMSO, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8). La intensidad de la fluorescencia fue medida a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 528 nm de emisión.

La evaluación de los compuestos frente a Fp 2 se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional San Martín (UNSAM), la profalcipaina 2, fue donada por el Dr Juan Carlos Cazzulo director del instituto. La metodología se realizó siguiendo los protocolos (Sarduy, Muñoz et al. 2012). Para lo cual, se realizaron varios procesos, iniciando con la *renaturalización/activación de Profalcipaina 2 (proFp2)*. Las muestras de proFp2 se incubaron durante 45 minutos en DTT 10 mmol/L en el tampón de renaturalización (Tris-HCl 100mmol/L, EDTA 1mmol/L, glicerol 30%, L-arginina 250mmol/L, GSH 1mmol/l, GSSG 1mmol/l, pH 9,) (Sijwali, Brinen et al. 2001) y se mantuvo 24 horas a 4°C. Con el objetivo de seguir el proceso de renaturalización/ activación cada 3 horas se tomaron muestras de esta solución a las que se les evaluó la actividad utilizando el sustrato benziloxycarbonyl-leucyl-arginyl-7-amino-4-methyl coumarin Z-LR-AMC. Posteriormente, esta solución se concentró por ultrafiltración a 4°C, mediante el empleo de una membrana con límite de exclusión de 10 kDa.

Los ensayos de actividad de Fp2 se realizaron según lo descrito previamente (Rosenthal, Olson et al. 1996) utilizando el sustrato fluorogénico Z-LR-AMC (excitación=355nm; emisión=460nm). Los ensayos se desarrollaron en un espectrofluorímetro (Thermo Spectronic Amico Bowman Series 2; sensibilidad 450mV). El ensayo se realizó en tampón NaAc 100mM, DTT 10mM, pH 5,5 en un volumen final de 200 μ L. En todos los casos, la enzima se preincubó por 5 minutos a temperatura ambiente con el tampón antes descrito luego se adicionaron los restantes componentes de la mezcla. Las lecturas se realizaron a intervalos de 10 segundos durante 3 minutos. Para el cálculo de la actividad enzimática ($\mu\text{mol}_{\text{AMC}}/\text{min} \cdot \mu\text{L}_{\text{ENZ}}$), fueron utilizadas las pendientes obtenidas de la zona lineal de la curva típica, expresadas como unidades de fluorescencia arbitraria (UFA) en el tiempo.

La Fp2 (concentración final en la mezcla de 0,041 μ M) se incubó durante 5 minutos en tampón de actividad (NaAc 100mM, DTT 10mM, pH 5,5). A la mezcla se adicionaron los compuestos quinoidales a varias concentraciones (20,0-400,0 μ M) y se incubó por otros 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó el sustrato fluorescente, L-ZR-AMC 1 μ L a concentración de 10,0 μ M, para iniciar la reacción. En todos los casos, el volumen final de la mezcla de reacción fue 200,0 μ L. Las lecturas se realizaron cada 10 segundos, precedidas por 5 segundos de agitación (excitación=355nm; emisión=460nm). Los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyeron controles positivos y negativos. Control negativo correspondiente al 100% de actividad de la enzima y un control positivo transepoxy succinyl-l-leucylamido-(4 guanidino) butane (E 64) a concentración de 10,0 μ M, las mediciones se realizaron cinéticamente. El valor de CI_{50} se determinó mediante el ajuste de los valores de actividad residual en función de la concentración total de compuesto adicionada al ensayo, con el empleo del programa sigma plot versión 10,0. La actividad inhibidora se expresó como porcentaje de Inhibición y se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = 100 \cdot \left(\frac{dF/dt_{\text{Control}} - F_0/F_{\text{comp}} \cdot dF/dt_{\text{comp}}}{dF/dt_{\text{control}}} \right)$$

Donde dF/dt_{control} : pendiente obtenida para el control sin compuesto (100% act).

dF/dt_{comp} : pendiente obtenida en presencia de compuesto.

F_o/F_{comp} : Factor de apagamiento del compuesto sobre la fluorescencia.

Los ensayos se realizaron empleando un espectrofluorímetro de placa DTX 880 (Beckman Coulter, USA).

7.4 EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS PROTEÍNAS DEL PARÁSITO Y MEMBRANAS DEL ERITROCITO.

Se seleccionó la cepa Dd2 de *P. falciparum* para este ensayo. La evaluación del estrés oxidativo se realizó en tres (3) etapas: la primera fase consistió en la sincronización del cultivo y la obtención de un extracto crudo de proteínas del parásito utilizando los protocolos propuestos por Moneriz *et al* 2011. Las proteínas del parásito se obtuvieron a partir de un cultivo sincrónico, en estado de anillo el cual se incubó con las concentraciones correspondientes a los valores de CI_{50} de los compuestos quinoidales, por 24 horas a 37° C bajo atmosfera de CO₂ al 5% (Moneriz, Marín-García *et al.* 2011). Para la obtención de las proteínas de membrana de los glóbulos rojos, estos se lisaron con solución de saponina al 0,2%, y se centrifugó a 320 x g por 5 minutos, el pellet correspondió al parásito intacto. Las membranas eritrocitarias remanentes en el sobrenadante se obtuvieron por centrifugación, 15000 rpm por 30 minutos. El pellet del parásito y membranas eritrocitaria, se lavaron con PBS hasta que estuvo incoloro, y se resuspendió en un buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, CHAPS 3%), y homogenizados con un mini agitador por 10 minutos a 4°C, seguido por 4 ciclos de congelación a -20°C y descongelación a 37°C. Los homogenizados se centrifugaron a 20.000 x g por 15 minutos y el sobrenadante correspondiente al total de proteínas del parásito fue cuantificado por el método de Bradford (Kamali, Marín-García *et al.* 2012; Radfar, Diez *et al.* 2008).

Luego de la extracción y cuantificación de las proteínas, la segunda fase consistió en derivatizar las proteínas carboniladas con dinitro fenil hidracina (DNPH), para luego ser detectadas mediante Western Blot. Luego de la derivatización, se realizó la electroforesis de proteínas y transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Esta fue sometida a incubación con un anticuerpo policlonal de conejo 1:4000 (Anti-DNPH SIGMA, 1.0–1.7 mg/mL⁻¹) posteriormente se realizó una segunda incubación con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo 1:5000 (Amersham Biosciences). Por último, se realizó el revelado de las proteínas oxidadas en las películas por quimioluminiscencia. Como control se utilizaron proteínas del parásito obtenidas de un cultivo sin tratamiento y proteínas de membranas de eritrocito sin tratamiento. La metodología fue realizada de acuerdo a los protocolos descritos por (Méndez, Hernández *et al.* 2010, Pasini, Lutz *et al.* 2010).

7.5 INHIBICIÓN DE LA BIOCRISTALIZACIÓN DEL HEMO (FORMACIÓN DE B-HEMATINA).

La inhibición de la formación de hemozoina fue determinada según el protocolo descrito por Parapini (2000), para lo cual se preparó una solución de hemo 8 mM disuelto en DMSO y se dispensó 50 µL en cada pozo y 100 µL de cada compuesto a diferentes concentraciones (0,1; 1,0; 10,0; 100,0 µM). La formación de β-hematina es iniciada por la adición de 100 µL de buffer acetato a una concentración de 8 M y pH 5. La placa se incubó por 48 horas a 37°C y luego se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, la placa se lavó dos veces con DMSO y el precipitado se disolvió con NaOH 0,1 N; la absorbancia se determinó a una longitud de onda de 405 nm.

Los resultados fueron expresados como porcentajes de inhibición de la formación de β-hematina, y la CI₅₀ se determinaron a partir del porcentaje obtenido (ver su concentración), utilizando el programa Sigma plot 10,0 (Parapini, Basilico *et al.* 2000). Como control positivo se utilizó cloroquina y DMSO como control negativo.

CAPITULO VIII.

8 RESULTADOS

Las moléculas evaluadas en las bases de datos corresponden a tres 2-hidroxi-1,4 naftoquinonas, tres 4,5 furanonaftoquinonas y tres 4,9 furanonaftoquinonas. La citotoxicidad fue evaluada en 3 tipos de células eucariotas: Fibroblastos, células mononucleares de sangre periférica y eritrocitos. Los compuestos quinoidales evaluados mostraron toxicidad variable en fibroblastos IBR3G, mostrando CI_{50} entre 0,83 y 76,0 μ M, los resultados se encuentran en la tabla 2.

La viabilidad en células mononucleares de sangre periférica al igual que actividad hemolítica se realizó a concentraciones correspondientes a los valores de CI_{50} de cada compuesto. La exposición por 48 horas en células mononucleares de sangre periférica evidenció una viabilidad >90%, con excepción del compuesto 9 la cual fue de 81%. Anexo 3. Con respecto a la actividad hemolítica, la liberación de hemoglobina evaluada a la concentración de CI_{50} fue inferior al 30%. Los compuestos evaluados, mostraron baja citotoxicidad, evidenciando esta como su actividad hemolítica. Con respecto a otro estudio donde muestran que compuestos quinoidales, estos son altamente tóxicos y producen hemólisis *in vivo* (Munday, Smith *et al.* 1995) Anexo 3.

Tabla 2. Citotoxicidad de compuestos quinoidales en células mononucleares y eritrocitos de sangre periférica.

ID	% Viabilidad en Células mononucleares de Sangre periférica	% de hemólisis en eritrocitos humanos
2	93,3 ± 1,51	23,4 ± 4,5
3	92,3 ± 0,72	21,4 ± 1,0
4	94,0 ± 1,0	21,4 ± 1,7
5	93,7 ± 0,64	22,8 ± 5,8
6	94,0 ± 1,52	24,6 ± 2,3
7	93,0 ± 2,06	29,9 ± 1,5
8	93,3 ± 2,06	18,6 ± 0,6
9	81,7 ± 3,0	23,6 ± 0,6
10	93,0 ± 0.1	35,0 ± 1,2

Promedio ± SD

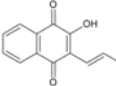
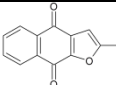
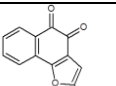
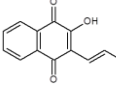
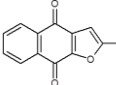
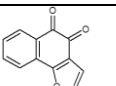
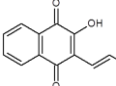
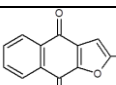
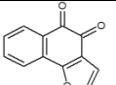
SD: Desviación estandar.

8.1 ACTIVIDAD ANTIPLASMODIUM

La actividad antiplasmodium, de los compuestos quinoidales evaluados en este trabajo 2-hidroxi-1,4 naftoquinonas, 4,5 furanonaftoquinonas y 4,9 furanonaftoquinonas, inhibieron el crecimiento del parásito *in vitro*, con valores de CI_{50} comprendidas entre 0,20-12,0 μM , tabla 1 mostrada por los compuestos 8 y 7 respectivamente, mientras que la cepa 3D7 la CI_{50} estuvo entre 0,4 y 3,7 μM ,

valores correspondientes a los compuestos 6 y 9 respectivamente. Mostrando mejores resultados para la cepa 3D7. Tabla 3.

Tabla 3. Actividad antimalárica de compuestos quinoidales expresada en valores de CI_{50} en μM , Citotoxicidad evaluada en fibroblastos IBR3G e índice de selectividad.

ID	estructura	Dd2	3D7	IBR3G	SI	SI 3D7
		$CI_{50}(\mu M)$	$CI_{50}(\mu M)$	$CI_{50}(\mu M)$	Dd2	
2		$1,6 \pm 0,06$	$1,2 \pm 1,0$	$59,7 \pm 1,5$	37,3	49,7
3		$1,2 \pm 1,1$	$1,5 \pm 1,4$	$56,6 \pm 7,8$	47,2	37,7
4		$3,1 \pm 1,4$	$3,3 \pm 0,3$	$5,6 \pm 2,4$	1,8	1,9
5		$4,0 \pm 1,5$	$2,3 \pm 0,6$	$76 \pm 1,39$	19	33
6		$1,8 \pm 1,5$	$0,4 \pm 0,06$	$9,4 \pm 0,8$	5,3	23,5
7		$11,3 \pm 1,2$	$2,1 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,9$	0,25	1,4
8		$0,22 \pm 0,02$	$2,1 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,3$	26,8	2,45
9		$3,4 \pm 2,2$	$3,8 \pm 0,3$	$0,83 \pm 0,2$	0,24	0,22
10		$2,2 \pm 1,0$	$1,9 \pm 1,3$	$7,4 \pm 2,6$	3,4	3,9

Media \pm DS de valores en μM de IC_{50} .

8.2 INHIBICIÓN DE PROTEASAS

La inhibición de proteasas y Fp2 por los compuestos en estudio, mostraron discreta inhibición de las proteasas papaína y subtilisina, los compuestos 2, 5, 6 y 8 inhibieron papaína. El compuesto 6 inhibió ambas enzimas, mientras que el compuesto 3 inhibió subtilisina. Los compuestos fueron inactivos frente a metaloproteasas. Tabla 4.

Tabla 4 Efecto de compuestos quinoidales sobre la actividad de cisteína y serina proteasas.

Enzima	Enzima mU.mL ⁻¹	Compuestos quinoidales				
		2	3	5	6	8
Papaína	20,0	17,9±1,7	NI	23,3 ± 5,1	5,9 ± 0,81	3,3±1,9
Subtlisina						
A	0,4	NI	5,3±1,16	NI	30,1±1,28	NI

Valores μM IC_{50} (media \pm SD) obtenidos de tres experimentos ($n=3$). 20 y 0.4 mU/mL⁻¹ corresponden a los límites de detección de cisteína y serina proteasa respectivamente. En esta tabla solo se muestran los compuestos que mostraron inhibición de alguna proteasa.

Los compuestos quinoidales inhibieron falcipaina 2 recombinante. Los compuestos 2, 6, 4 y 8, inhibieron Fp 2, sin embargo el compuesto que mostró mayor inhibición fue el compuesto 2 con una CI_{50} de 0,068 μM figura 10. La concentración de la enzima en los ensayos fue de 42 nM. La cual fue determinada mediante titulación con un inhibidor de la enzima Fp2, el compuesto E64.

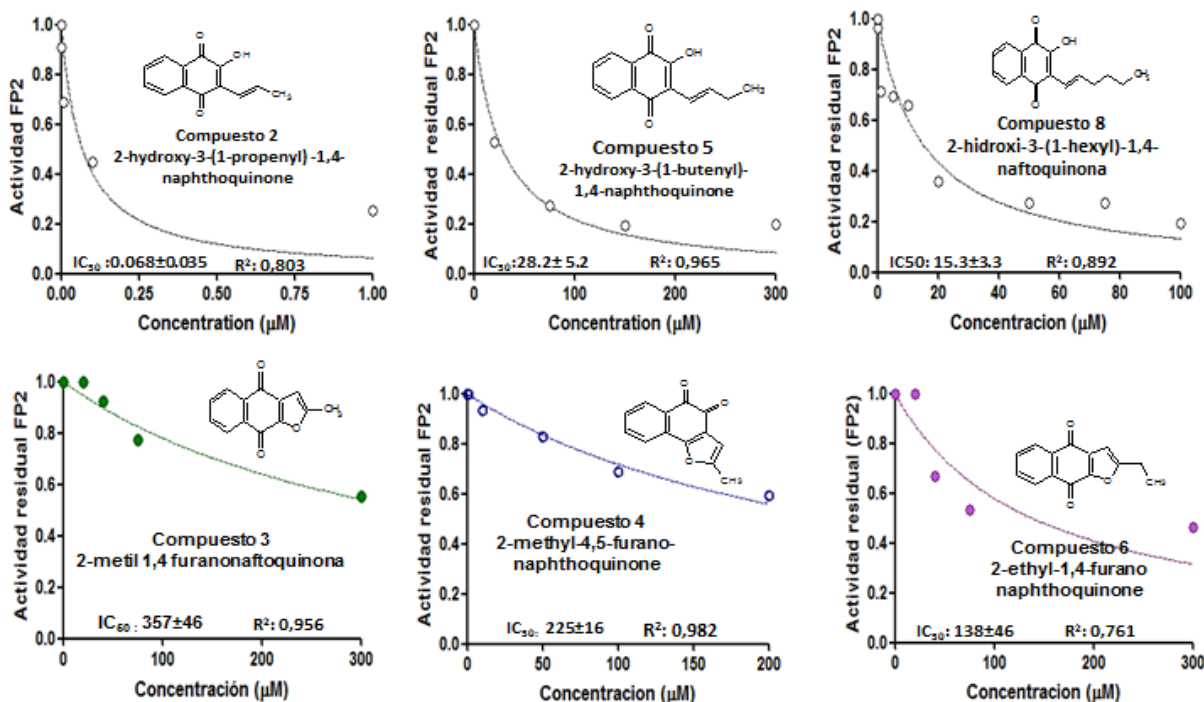


Figura 10. Inhibición de Fp 2. Utilizando seis concentraciones diferentes por compuesto. Cada punto fue evaluado por triplicado en 2 experimentos independientes. Valores de CI_{50} (media \pm SD) e índice de correlación R^2 .

La monitorización del desarrollo parasitario, al igual que alteraciones morfológicas se observaron microscópicamente, en extendidos teñidos con el colorante de giemsa figura 11. En el cultivo tratado con el compuesto 2 a las 48 horas de incubación, se observó alteración en el desarrollo del parásito, evidenciado por alteraciones que pudieran estar relacionadas con degradación de hemoglobina en la vacuola digestiva del parásito. También se observó, que la mayoría de la población parasitaria estaba conformada por trofozoítos; y en algunos casos esquizontes con pocos nucleos picnotocos, esto se observó a las 48 horas de incubación.

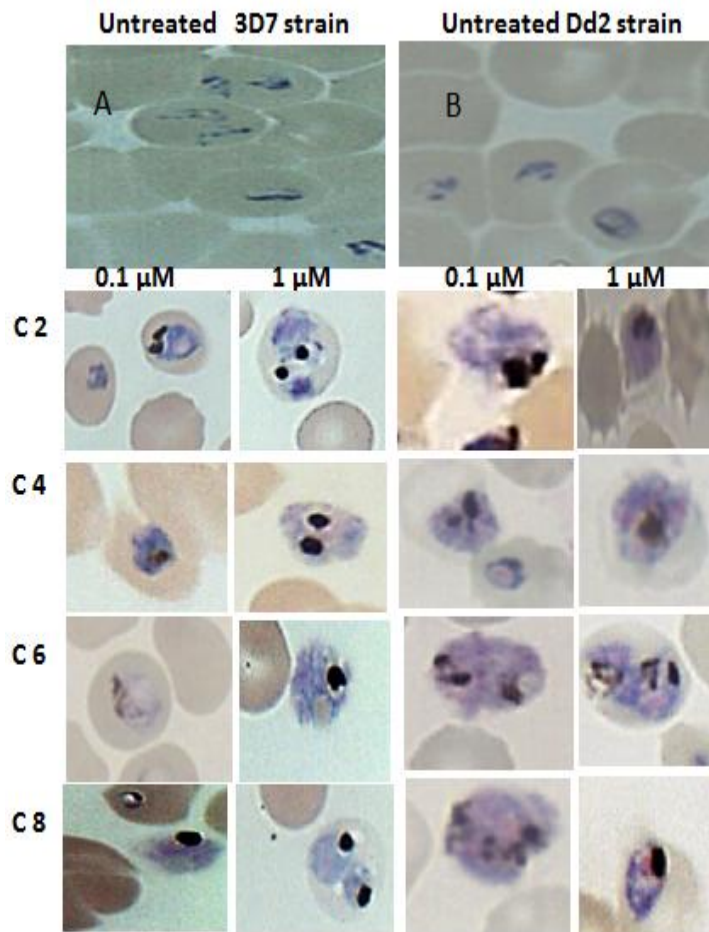


Figura 11. Efecto de los derivados quinoidales más activos, sobre la morfología de la vacuola digestiva, a las concentraciones de 0.1 y 1 μM en cepas 3D7 En orden descendente: compuestos 2, 4, 6, y 8. A y B corresponden a los cultivos de cepa 3D7 y Dd2 sin tratamiento.

Sin embargo estas alteraciones morfológica, observadas en parásitos tal como se evidencia en la figura 11 no es mostrada por la totalidad de los compuestos, donde se constata que, la actividad antiplasmodium observada no está relacionada de manera directa con alteración metabólicas que llevan a la degradación de hemoglobina, o que tuvieran una relación específica, relacionada con degradación de las cadena de globina y la obtención de aminoácidos para su desarrollo, donde la participación de la proteasa de cisteína Falcipaina 2 tiene un papel relevante en la nutrición del parásito. Figura 12.

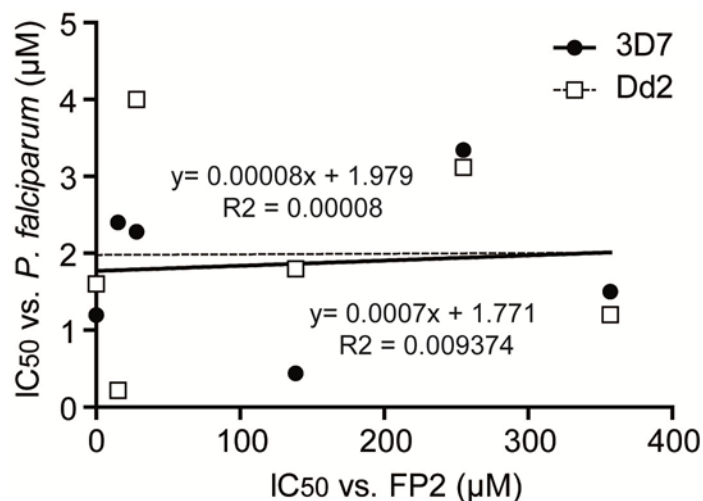


Figura 12. Correlación entre actividad antiplasmodium de derivados quinoidales frente a valores de IC₅₀ de actividad inhibidora de Falcipaina 2.

La falta de correlación entre la actividad inhibidora de FP2 y la actividad antiplasmodial de derivados de naftoquinona. Curva cruzada entre los valores de IC₅₀ contra FP2 y los valores de IC₅₀ contra 3D7 (círculos negros) y Dd2 (cuadrados blancos) *Plasmodium falciparum*, estos resultados nos confirman que la actividad antiplasmodium que llevan a cabo estos compuestos pudiera estar relacionada con la capacidad de actuar sobre mas de un blanco molecular.

8.3 ESTRÉS OXIDATIVO

La evaluación del estrés oxidativo en proteínas del parásito cepa Dd2 de *Plasmodium falciparum* y en proteínas de membrana del eritrocito, reveló que los compuestos quinoidales causaron oxidación de las proteínas aisladas de membrana del parásito luego de la exposición del cultivo por 24 horas a los valores de CI₅₀. Las proteínas oxidadas del parásito, estaban dentro del rango de 25-250 KDa mientras que en el control sin tratamiento el patrón de proteínas oxidadas se observó en el rango de 37-250 kDa. La determinación del estrés oxidativo también fue evaluado en las proteínas de membranas de eritrocitos

infectados y no infectados en presencia de los compuestos, estos resultados muestran carbonilación de proteínas de membrana eritrocitaria en ambos casos, esto nos llevó a pensar que la oxidación en la proteínas de membrana del eritrocito juega un papel importante en el desarrollo del parásito a nivel del ciclo intraeritrocitario *in vitro* figura 12.

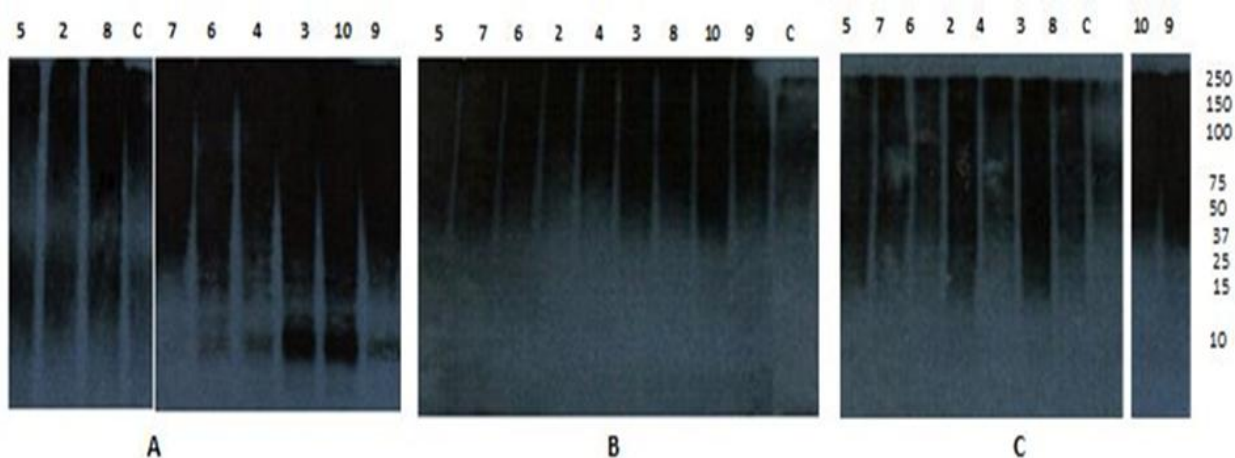


Figura 13. Western blot de A: proteínas de membrana del parásito. B: en proteínas de eritrocitos tratados. C: proteínas de membranas de eritrocitos parasitados y tratados con valores de IC_{50} de los compuestos quinoidales. 2-Hidroxi-1,4-naphthoquinonas (2, 5 y 8). 4,5 furanonaftoquinonas (3, 6, 9); 4,9 furanonaftoquinonas (4, 7, 10) y (c) control no tratado.

8.4 INHIBICIÓN DE LA BIOCRISTALIZACIÓN DEL GRUPO HEMO

La determinación de *inhibición de la biocristalización* del hemo fue negativa en los compuestos evaluados. Los compuestos quinoides 2 alquil sustituidos no inhibieron la formación de β -hematina. La figura 13, corresponde a la representación gráfica del resultado arrojado por el compuesto 2 y el control de cloroquina.

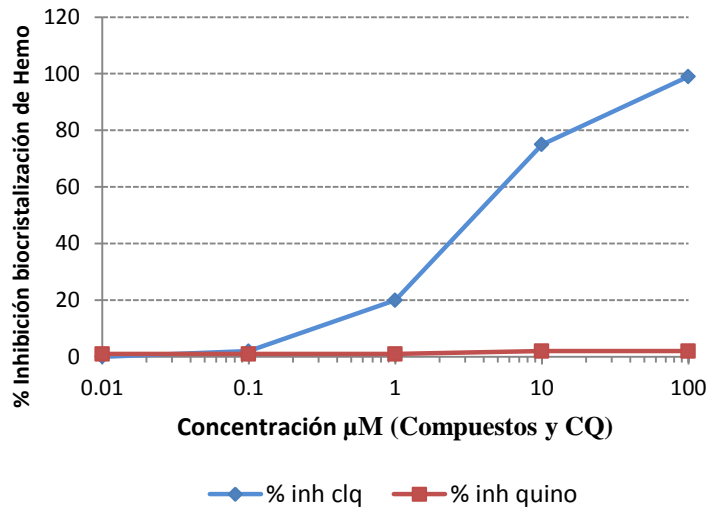


Figura 14. % de inhibición de la biocrystalización del grupo hemo. Línea azul resultados del % de inhibición de cloroquina, línea roja, inhibición de biocrystalización de compuestos quinoidales (Compuesto 2)

Los resultados obtenidos en este estudio revelan que los compuestos evaluados no inhiben la formación de β -hematina, mecanismo demostrado ampliamente por la cloroquina, comportamiento acorde con el presentado por la atovaquona, compuesto quinoidal utilizado en el tratamiento de la malaria, que tampoco inhibe la formación de β -hematina.

CAPITULO IX.

9 DISCUSIÓN

Los compuestos evaluados en este trabajo fueron estudiados principalmente en su actividad biológica mediante herramientas virtuales (bases de datos libres en la web) entre las que se examinó en que bioensayos habían sido estudiadas, se hizo una amplia revisión bibliográfica de cada compuesto estudiado. Se ha observado un gran interés sobre estos compuestos, debido a su potencial uso como fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades. Sus actividades citostáticas y antimicrobianas emergen debido a su capacidad de actuar como inhibidores potentes de la cadena de transporte electrónico, como desacopladores de la fosforilación oxidativa, como agentes intercaladores en la hélice doble del DNA, como agentes de alquilación reductiva de biomoléculas, y como productores de radicales libres de oxígeno (por ciclo redox).

De los 30 compuestos quinooidales, sometidos a la interfaz gráfica, 24 están registradas y codificadas en las bases de datos consultadas, de las cuales 12 tienen reportados bioensayos con actividad biológica. Durante el proceso con cada molécula, se obtuvo un amplio número de compuestos similares, con reportes de bioensayos realizados a cada molécula en particular, hecho que permitió correlacionar características estructurales con la actividad biológica reportada para cada grupo en estudio. Esta búsqueda determinó que alguno de los compuestos evaluados, presentaban varios tipos de actividad biológica incluida la actividad antimalárica, antibacteriana, tripanocida, anticancerígena, anti-inflamatoria entre otras. Anexo 1. Basados en esta revisión fueron seleccionados 9 compuestos, los cuales no tenían reporte de actividad biológica realizada, hasta el momento de terminada este escreenen, y con resultados previo de actividad antiplasmodium

para estos compuesto, lo mas importante era realizar su actividad antiplasmodium, con una previa evaluación de su actividad citototóxica en células eucariotas.

Los 9 compuestos seleccionados evaluados en esta investigación, mostraron baja citotoxicidad, evidenciando esta como su actividad hemolítica, porcentaje de viabilidad en células mononucleares de sangre periférica y citotoxicidad en fibroblastos.

En fibroblastos, la viabilidad en células mononucleares de sangre periférica, y la actividad hemolítica, muestran una moderada toxicidad de estos compuestos. El índice de selectividad, se observaron variaciones con rangos que incluyen valores menores de 1 para compuestos de baja selectividad, como el compuesto 7 y 9 en ambas cepas, hasta 49,7 para el compuesto 2 en la cepa 3D7 y 47,2 para el compuesto 3 en la cepa Dd2. Tabla 3. Estos resultados, nos muestran la toxicidad obtenida esta investigación esta acorde con la reportada en la literatura. Con respecto a otro estudio donde muestran que compuestos quinoidales, estos son altamente tóxicos y producen hemólisis *in vivo* (Munday, Smith *et al.* 1995).

Referente a la actividad antimalárica, realizada en cepas Dd2 y 3D7 resistentes y sensibles a cloroquina respectivamente, ambas cepas mostraron sensibilidad variable a los compuestos quinoidales evaluados. La IC₅₀ estuvo en el rango de 0,2-12,0µM mostrados por el compuesto 8 y 7 respectivamente en la cepa Dd2, mientras que la IC₅₀ de la cepa 3D7 estuvo entre 0,4 y 3,8 µM; valores correspondientes a los compuestos 6 y 9 respectivamente. Mostrando mejores resultados en la cepa 3D7 tabla 3.

La Atovaquona, una hidroxinaftoquinona usada en tratamiento de la malaria producida por *Plasmodium falciparum* y neumonía por Pneumocistis, actúa sobre el complejo III de la cadena transportadora de electrones (ubiquinona citocromo c oxidoreductasa) o complejo bc1, *P. falciparum*, resultó ser 1000 veces más sensible a Atovaquona, que Antimicina A y mixotyazol inhibidores del complejo III

mitocondrial en *Plasmodium falciparum* (Thierbach and Reichenbach 1981, Fry and Pudney 1992). Los compuestos evaluados en este trabajo son quinonas sintéticas, las cuales inhibieron el crecimiento del parásito *in vitro*.

Una característica de los compuestos quinoidales es su capacidad de producir EROS, por lo cual se contempla la posibilidad del estrés oxidativo como mecanismo inhibitor del desarrollo del parásito mediada por oxidación de las proteínas del parásito, sino también en las proteínas de membranas de la célula huésped, las cuales intervienen en la invasión y desarrollo intraeritrocitario del parásito. Las quinonas podrían inhibir las enzimas digestivas del parásito (Falcipaina 2, por oxidación de aminoácidos del sitio activo) y de esta manera contribuir al efecto antiplasmodium observado en estos compuestos.

La inhibición de proteínas prototipo papaína, subtilisina y termolisina, nos biodirigió hacia la evaluación la Fp2, una cistein-proteasa que interviene en el proceso de degradación de la hemoglobina. Estos compuestos no fueron activos frente a termolisina.

Los compuestos con los sustituyentes alquílicos de menor longitud parecen ser los más activos, y con respecto al número de anillo, las naftoquinonas fueron más activas que las furanonaftoquinonas, lo que sugiere que el efecto inhibitor está más relacionado con los compuestos de bajo peso molecular. Parece ser que la actividad estuviera mas relacionada con el anillo quinoidal, sin embargo vale la pena transformar estas quinonas en lo que respecta a los sustituyentes, en aras de disminuir su toxicidad y potenciar su actividad biológica.

Este resultado está de acuerdo con los informes previos que indican la actividad inhibitoria a escala micromolar de derivados naftoquinona sobre diferentes enzimas de protozoos parasitarios (Nishikawa, Carr *et al.* 1995, Morin, Besset *et al.* 2008, Pieretti, Haanstra *et al.* 2013). En cuanto a la actividad antiparasitaria, inhibidores de la proteasa de cisteína altamente potentes tales como L-trans-

epoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)-butano (E-64) y leupeptina también muestran sólo modesta actividad contra cepas de *P. falciparum* Dd2, con valores de IC₅₀ en el rango micromolar (Liu, Istvan *et al.* 2006, Parikh, Liu *et al.* 2006, Moura, Dame *et al.* 2009), tendencia observada en este trabajo para las naftoquinonas sintéticas. Trabajos previos (de Rezende, Fumagalli *et al.* 2013, Pieretti, Haanstra *et al.* 2013) han mostrado que compuestos sintéticos tipo quinoidales, causan incremento en la carbonilación de proteínas en *P. falciparum*, mecanismos que apuntan a múltiples objetivos previamente descritos para derivados naftoquinónicos, incluyendo inhibición del complejo citocromo bc1, generación de EROS, alquilación de biomoléculas y depleción de glutatión (de Rezende, Fumagalli *et al.* 2013, Pieretti, Haanstra *et al.* 2013).

Nuestros resultados evidencian que la actividad antiplasmodium, pudiera tener una relación con la inhibición de Falcipaina 2, por los compuestos quinoidales evaluados, tal como se observa en la figura 12, donde el coeficiente de determinación para los compuesto 3, 4 y 5, cuyos valores de R² son superiores a 0,9 a excepción de los compuesto 2, 6 y 8 cuyos índice de correlación estan en el orden de 0,8; para los compuestos 2 y 8, mientras que para el compuesto 6 fue de 0,7; en general existe un buen ajuste en los resultados.

La capacidad de oxidación de las proteínas del parásito mediante la carbonilación de las mismas, evidenció que estos compuestos oxidan las proteínas del parásito y es posible que este sea uno de los mecanismos a través de los cuales se inhiba el desarrollo del parásito en su fase intraeritrocitaria. Muchas quinonas obtenidas de varias fuentes han mostrado actividad antiplasmodial (Induli, Gebru *et al.* 2013, Ntie-Kang, Onguene *et al.* 2014).

El crecimiento del parásito en presencia de los compuestos se detuvo en el estadio de trofozoito Anexo 2. Esto posiblemente por la incapacidad de obtener aminoácidos libres para su desarrollo y crecimiento, lo cual ocurrió por inhibición de algunas proteasas responsables de degradar la hemoglobina, o condujeron a

un procesamiento inadecuado de proteínas que interviene en los procesos de liberación e invasión a nuevas células hospederas. Proponemos que estos compuestos actúan a través de más de un mecanismo de acción, posiblemente estrés oxidativo, afectando las proteínas de membrana las cuales fueron incapaces de permitir un nuevo ciclo de invasión. Nosotros creemos que la oxidación causada por estos compuestos a enzimas proteolíticas, pudieran estar colaborando en la inactivación de las mismas y en su incapacidad de llevar a cabo procesos vitales en el parásito.

Los estudios determinaron que los compuestos quinoidales oxidan las proteínas del parásito al igual que las proteínas de membranas del eritrocito. Algunos estudios apuntan hacia el hecho que el estrés oxidativo influye en la disminución de la supervivencia del parásito, y que los compuestos quinoidales inhibieron el crecimiento del parásito gracias a la formación de especies reactivas de oxígeno (Grellier, Sarlauskas *et al.* 2001). En este trabajo se demostró que los compuestos quinoidales causan carbonilación de las proteínas aisladas de membrana del *Plasmodium falciparum* cepa Dd2, luego de la exposición del cultivo del parásito durante 24 horas a los valores de CI_{50} . Las proteínas oxidadas se observaron dentro del rango de 25-250 kDa comparadas con el control sin tratamiento, en el cual el patrón de oxidación se encuentra en el rango de 37-250 kDa. El compuesto 7 mostró la mayor CI_{50} 12,0 μ M, comparando la actividad antiplasmodium en la cepa Dd2, y el patrón de oxidación, de este compuesto se observó en el rango de 37-250 KDa, indicando este comportamiento que, la extensión en el rango de oxidación estaría directamente relacionado con la actividad antiparasitaria mostrada por estos compuestos figura 13.

Cabe anotar que además de la diferencia en extensión de los patrones de oxidación, entre las proteínas del parásito, eritrocitos parasitados y no parasitados, se observa una menor intensidad en los patrones de oxidación de aquellas proteínas tratadas por 24 horas con la IC_{50} de los compuestos, pero que no estuvieron cultivadas con el parásito. Esto nos llevó a pensar que una moderada

oxidación previa, previene la invasión y crecimiento del parásito. Uno de nuestros propósitos futuro es determinar de manera experimental cuanto influye en el crecimiento del parásito *in vitro* cultivado en eritrocitos previamente tratados por los compuestos quinoidales y correlacionar el grado de oxidación y el tiempo de pretratamiento con los compuestos que inhiban el desarrollo del parásito.

La oxidación de las proteínas de membrana de eritrocitos no parasitados expuestos a valores de IC₅₀ de los compuestos quinoidales, aunque es una oxidación homogénea, es importante resaltar que los patrones de oxidación que se muestran están comprendidos entre 37-200 KDa, comportamiento similar presentado por el patrón de oxidación sin tratamiento.

El aumento de la resistencia a los fármacos antimaláricos mostrado por el parásito de la malaria, la falta de una vacuna 100% efectiva, fallas en los programas de control de vectores, cambios climáticos y el aumento en la movilización, son factores que favorecen la incidencia de malaria en países no sólo del tercer mundo sino también del primer mundo. La malaria ha sido catalogada como un problema de salud pública, hecho que indiscutiblemente ha conducido a que un sinnúmero de investigaciones que conllevan a la búsqueda de nuevos compuestos o fármacos, capaces de detener el crecimiento del parásito. Debido a que se conoce la secuencia completa del genoma del *Plasmodium* sp, y la existencia de herramientas y métodos de análisis que permiten conocer el metabolismo y funcionamiento de cada proteína en el parásito, ha surgido una avalancha de investigaciones que tienden a ubicar y dilucidar sitios, organelas o alguna función particular, que permita proponer nuevos compuestos, modificación de los ya existentes nuevos blancos moleculares y mecanismos de acción novedosos, cuya única finalidad sea erradicar de manera permanente la malaria, o en el mejor de los casos evitar el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte del parásito y contar con nuevas alternativas terapéuticas.

La búsqueda de compuestos que afecten la supervivencia del parásito por acción sobre procesos de oxidación-reducción, ha sido demostrado recientemente (Cheema, Prakash *et al.* 2014). Procesos relacionados que interfieren con la degradación de la hemoglobina a través de la inhibición de enzimas proteolíticas del parásito como las plasmepsinas o falcipainas, son blancos atractivos como alternativas terapéuticas en la lucha contra la malaria.

El estrés oxidativo también fue evaluado en las proteínas de membranas de eritrocitos infectados y no infectados en presencia de los compuestos, estos resultados mostraron carbonilación de proteínas de membrana eritrocitaria en ambos casos (infectados y no infectados), esto nos llevó a pensar que la oxidación de las proteínas de membrana del eritrocito jugó un papel importante en la inhibición del desarrollo del parásito a nivel del ciclo intraeritrocitario. Anexo 3.

El estrés oxidativo es responsable de cambios fisicoquímicos en la membrana eritrocitaria como ocurre en infecciones por *plasmodio* (Das and Nanda 1999), y está relacionado con la patología y eliminación del parásito de la circulación (Legorreta-Herrera, Retana-Ugalde *et al.* 2010). El parásito de la malaria es vulnerable al estrés oxidativo durante su estadio de vida intraeritrocitaria (Becker, Tilley *et al.* 2004). Las células falciformes, células talasémicas, y deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, presentan un espectro de anormalidades en la membrana, cambios bioquímicos en las reacciones redox, involucrando grupos tioles de proteínas, alteraciones lipídicas, agregados de hemicromos y banda 3, inmunoglobulina, deformabilidad deficiente, perturbación en el equilibrio homeostático (Advani, Rubin *et al.* 1992). Estas alteraciones inducen un efecto protector contra la malaria (Akide-Ndunge, Tambini *et al.* 2009). Por lo anteriormente expuesto, proponemos la oxidación de las proteínas de las membranas del eritrocito como coadyuvante en el efecto antimalárico *in vitro* que ejercen las quinonas sobre el crecimiento de *Plasmodium falciparum*. Este efecto fue determinado mediante la evaluación de proteínas oxidadas obtenidas del parásito cepa Dd2, proteínas de membrana del glóbulo rojo parasitado, y proteínas

de membrana de eritrocitos no parasitados incubados en presencia de las CI_{50} de los compuestos quinoidales estudiados.

Los compuestos quinoidales no inhibieron la biocristalización de la β -hematina resultado comparable con el efecto de la atovaquona, efecto mostrado ampliamente por la cloroquina. Sin embargo los resultado en este estudio, están en desacuerdo con los resultados obtenidos en una investigación realizada por (León, Domínguez *et al.* 2008), donde compuestos quinoidales muestran inhibición en el proceso de biocristalización del grupo hemo (León, Domínguez *et al.* 2008).

CAPITULO X.

10 CONCLUSIONES

Los resultados encontrados muestran que los compuestos quinoidales presentan inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. falciparum* tanto en cepas sensibles como resistentes a cloroquina, lo cual indica que su acción antimalárica involucra mecanismos de acción diferentes a los reportados para uno de los fármacos de primera elección y para el cual ya existe resistencia parasitaria.

Los compuestos quinoidales tipo furanonaftoquinona lineal resultaron ser los más activos, contra el parásito empleado en los ensayos, lo que podría estar acorde con una mayor densidad electrónica producto de una mayor conjugación del sistema de electrones π .

Los compuestos quinoides evaluados pudieran estar inhibiendo el desarrollo del parásito utilizando más de una diana biológica, si tenemos en cuenta que algunos compuestos fueron capaces de inhibir aunque en menor extensión enzimas diferentes a Fp2, además de su efecto inductor de estrés oxidativo por carbonilación de proteínas.

Los resultados evidenciaron que los compuestos evaluados no interfieren en la biocristalización de la β -hematina.

CAPITULO XI.

11 PERSPECTIVAS

El aumento de la resistencia a los fármacos antimaláricos de primer orden, mostrado por el parásito de la malaria, la falta de una vacuna 100% efectiva, fallas en los programas de control de vectores, cambios climáticos, aumento en la movilización, son factores que favorecen la incidencia de malaria en países no sólo del tercer mundo sino también los del primer mundo. La malaria ha sido catalogada como un problema de salud pública, hecho que indiscutiblemente ha conducido a que un sinnúmero de investigaciones que conllevan a la búsqueda de nuevos compuestos o fármacos capaces de detener el crecimiento del parásito.

La búsqueda de compuestos que afecten la supervivencia del parásito por acción sobre procesos de oxidación reducción, ha sido demostrado recientemente. Procesos relacionados que interfieren con la degradación de la hemoglobina a través de la inhibición de enzimas proteolíticas del parásito como las plasmepsinas o falcipainas, son blancos atractivos como alternativas terapéuticas en la lucha contra la malaria. Entre las ideas que se tejen alrededor de estos compuestos están la de caracterizar el tipo de inhibición llevado a cabo por estos compuestos.

Teniendo en cuenta que nuestros compuestos poseen en su estructura el anillo quinoidal, al igual que compuesto antimalárico atovaquona, y esta última inhibe el citocromo bc₁, es posible que las moléculas evaluadas presenten el mismo mecanismo de acción, por lo tanto se pudiera explorar el mecanismo reportado.

Las observaciones realizadas en los compuestos quinoidales de inhibición de subtilisina, las cuales intervienen en la liberación e invasión de los merozoitos a nuevas células, se contempla la posibilidad de investigar la inhibición de

subtilisinas específicas del parásito como posible mecanismo que, interviene en la inhibición del crecimiento del parásito.

También existe la posibilidad de realizar estudios *in vivo*, y evaluar la cinética de los compuestos quinoidales sintetizados.

Buscaremos corroborar nuestra hipótesis, que sostiene que una oxidación previa pudiera disminuir el desarrollo del parásito. Para lo cual realizaremos cultivos del parásito en eritrocitos, previamente oxidados por los compuestos en estudio y de esta manera corroborar, que una pre-oxidación, evitará la invasión del parásito a la célula hospedera, disminuyendo de esta forma el crecimiento del parásito.

Nuestro propósito es seguir investigando, y en lo posible realizar acercamientos *in vivo*, para lo cual se hace necesario modificar los compuestos a fin de mejorar su solubilidad en medio acuoso ya que estos compuestos son poco solubles en solventes acuosos.

APENDICE.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMA-1	Antígeno apical de membrana
AU	Unidades arbitrarias
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNPB	Dinitrofenil hidracina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fp 2	Falcipaina 2
FP IX	Ferropotoporfirina IX
G6P	Glucosa 6 fosfato
G6PD	Glucosa 6 fosfatos deshidrogenasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH/GSSG	Glutación reducido/Glutación oxidado
Hb	Hemoglobina
HRP2	Proteína 2 rica en histidina
HO-	Radical hidroxilo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IRBC	Glóbulos rojos infectados
IBR3G	Línea celular de fibroblastos
KDa	Kilodalton
ME	Membrana eritrocítica.
MSP	Proteínas de superficie del merozoito.
MVP	Membrana de la vacuola parasitófora
NADPH/NAD	Nicotin adenin dinucleotido reducido/ Nicotin adenin oxidado
OCM	Oxidación catalizada por metal
PBS	Buffer fosfato salino

PfEMP	Proteína de membrana del eritrocito de Plasmodium falciparum
PfSUB	Subtilisina de Plasmodium falciparum
PG	PicoGreen®
PV	Vacuola parasitóloga
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad
EROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio-dodecyl-sulfato
SERA	Proteasa rica en antígenos de serina
SOD	Superóxido dismutasa
TE	Tris-EDTA
VD	Vacuola digestiva
WBC	Glóbulos blancos

BIBLIOGRAFIA.

- Acosta Sánchez, T., D. P. Núñez and M. Suárez Luengo (2003). "Anemia hemolítica por deficiencia de G6PD y estrés oxidativo." *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* **22**(3): 186-191.
- Advani, R., E. Rubin, N. Mohandas and S. Schrier (1992). "Oxidative red blood cell membrane injury in the pathophysiology of severe mouse beta-thalassemia." *Blood* **79**(4): 1064-1067.
- Akanmori, B. D., J. A. Kurtzhals, B. Q. Goka, V. Adabayeri, M. F. Ofori, F. K. Nkrumah, C. Behr and L. Hviid (2000). "Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of *Plasmodium falciparum* malaria." *Eur Cytokine Netw* **11**(1): 113-118.
- Akide-Ndunge, O. B., E. Tambini, G. Giribaldi, P. J. McMillan, S. Müller, P. Arese and F. Turrini (2009). "Co-ordinated stage-dependent enhancement of *Plasmodium falciparum* antioxidant enzymes and heat shock protein expression in parasites growing in oxidatively stressed or G6PD-deficient red blood cells." *Malar J* **8**: 113.
- Anderson, M. E. (1996). "Glutathione and glutathione delivery compounds." *Advances in pharmacology* **38**: 65-78.
- Andricopulo, A., M. Akoachere, R. Krogh, C. Nickel, M. McLeish, G. Kenyon, L. Arscott, C. Williams, E. Davioud-Charvet and K. Becker (2006). "Specific inhibitors of *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase as potential antimalarial agents." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **16**(8): 2283-2292.
- Ashley, E., R. McGready, S. Proux and F. Nosten (2006). "Malaria." *Travel Medicine and Infectious Disease* **4**(3-4): 159-173.
- Ayi, K., F. Turrini, A. Piga and P. Arese (2004). "Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait." *Blood* **104**(10): 3364-3371.

Baker, R. P., R. Wijetilaka and S. Urban (2006). "Two Plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria." *PLoS pathogens* **2**(10): e113.

Bannister, L., J. Hopkins, R. Fowler, S. Krishna and G. Mitchell (2000). "A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium falciparum Asexual Blood Stages." *Parasitology Today* **16**(10): 427-433.

Bannister, L. and G. Mitchell (2009). "The malaria merozoite, forty years on." *Parasitology* **136**(12): 1435-1444.

Becker, K., L. Tilley, J. L. Vennerstrom, D. Roberts, S. Rogerson and H. Ginsburg (2004). "Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions." *International journal for parasitology* **34**(2): 163-189.

Birth, D., W. C. Kao and C. Hunte (2014). "Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action." *Nat Commun* **5**: 4029.

Biryukov, S. and J. A. Stoute (2014). "Complement activation in malaria: friend or foe?" *Trends in Molecular Medicine* **20**(5): 293-301.

Blackman, M. J. (2000). "Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite function and potential as chemotherapeutic targets." *Current drug targets* **1**(1): 59-83.

Blackman, M. J. (2004). "Proteases in host cell invasion by the malaria parasite." *Cellular microbiology* **6**(10): 893-903.

Blackman, M. J. (2008). "Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade." *Cellular microbiology* **10**(10): 1925-1934.

Borstnik, K., I. Paik, T. A. Shapiro and G. H. Posner (2002). "Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds." *International journal for parasitology* **32**(13): 1661-1667.

Boudin, C., I. Sheick, B. Chumpitazi, L. Pazart, B. Hogh, F. Peyron, P. Deloron, S. Picot and P. Ambroise-Thomas (1994). "The multifactorial and multistage character of protective immunity to Plasmodium falciparum, naturally acquired by an indigenous population in Burkina Faso." *Scand J Immunol* **39**(4): 409-417.

Bowman, S., D. Lawson, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, C. Churcher, A. Craig, R. Davies, K. Devlin and T. Feltwell (1999). "The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*." *Nature* **400**(6744): 532-538.

Browne, P., O. Shalev and R. P. Hebbel (1998). "The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model." *Free Radical Biology and Medicine* **24**(6): 1040-1048.

Bruneton, J. and D. Barton (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Acribia.

Buchholz, K., B. Mwongela Mailu, R. Heiner Schirmer and K. Becker (2007). "Structure-based drug development against malaria." *Frontiers in Drug Design & Discovery: Structure-Based Drug Design in the 21st Century* **3**(1): 225-255.

Buchholz, K., R. H. Schirmer, J. K. Eubel, M. B. Akoachere, T. Dandekar, K. Becker and S. Gromer (2008). "Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**(1): 183-191.

Burton, G. J. and E. Jauniaux (2011). "Oxidative stress." *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **25**(3): 287-299.

Bzik, D. J., W. B. Li, T. Horii and J. Inselburg (1987). "Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**(23): 8360-8364.

Cabiscol, E., J. Tamarit and J. Ros (2010). "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species." *International Microbiology* **3**(1): 3-8.

Campanale, N., C. Nickel, C. A. Daubenberger, D. A. Wehlan, J. J. Gorman, N. Klonis, K. Becker and L. Tilley (2003). "Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*." *Journal of Biological Chemistry* **278**(30): 27354-27361.

Carranza-Rodríguez, C., F. Mateos-Rodríguez, A. Muro and J. Pérez Arellano (2010). "Tratamiento antiparasitario." *Medicine* **10**.

Conkling, P. R., C. S. Greenberg and J. B. Weinberg (1988). "Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes." *Blood* **72**(1): 128-133.

Coronado, L. M., C. T. Nadovich and C. Spadafora (2014). "Malarial hemozoin: From target to tool." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1840**(6): 2032-2041.

Cos, P., A. J. Vlietinck, D. V. Berghe and L. Maes (2006). "Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'." *Journal of ethnopharmacology* **106**(3): 290-302.

Crawley, J. and B. Nahlen (2004). Prevention and treatment of malaria in young African children. *Seminars in pediatric infectious diseases*, Elsevier.

Crawley, J. and B. Nahlen (2004). "Prevention and treatment of malaria in young African children." *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* **15**(3): 169-180.

Cheema, H. S., O. Prakash, A. Pal, F. Khan, D. U. Bawankule and M. P. Darokar (2014). "Glubridin induces oxidative stress mediated apoptosis like cell death of malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Parasitol Int* **63**(2): 349-358.

Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani and R. Colombo (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." *Clinica Chimica Acta* **329**(1): 23-38.

Dame, J. B., C. A. Yowell, L. Omara-Opyene, J. M. Carlton, R. A. Cooper and T. Li (2003). "Plasmepsin 4, the food vacuole aspartic proteinase found in all *Plasmodium* spp. infecting man." *Molecular and biochemical parasitology* **130**(1): 1-12.

Das, B. S. and N. K. Nanda (1999). "Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute *falciparum* malaria." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **93**(1): 58-62.

Díaz-Acosta, A. E. and J. Membrillo-Hernández (2006). "Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos." *TIP Rev Espc Quim Biol* **9**: 34-44.

Durán Lengua, M., R. Gaitán Ibarra and J. T. Olivero Verbel (2013). "Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides." *Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud* **24**(4): 416-430.

Dvorak, J. A., L. H. Miller, W. C. Whitehouse and T. Shiroishi (1975). "Invasion of erythrocytes by malaria merozoites." *Science (New York, NY)* **187**(4178): 748.

Egan, T. J., J. M. Combrinck, J. Egan, G. R. Hearne, H. M. Marques, S. Ntenti, B. T. Sewell, P. J. Smith, D. Taylor and D. A. Van Schalkwyk (2002). "Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Biochemical Journal* **365**(Pt 2): 343.

Ersmark, K., I. Feierberg, S. Bjelic, E. Hamelink, F. Hackett, M. J. Blackman, J. Hultén, B. Samuelsson, J. Åqvist and A. Hallberg (2004). "Potent Inhibitors of the *Plasmodium falciparum* Enzymes Plasmeprin I and II Devoid of Cathepsin D Inhibitory Activity." *Journal of medicinal chemistry* **47**(1): 110-122.

Ersmark, K., B. Samuelsson and A. Hallberg (2006). "Plasmeprins as potential targets for new antimalarial therapy." *Medicinal research reviews* **26**(5): 626-666.

Farrow, R. E., J. Green, Z. Katsimitsoulia, W. R. Taylor, A. A. Holder and J. E. Molloy (2011). "The mechanism of erythrocyte invasion by the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**(9): 953-960.

Fear, G., S. Komarnytsky and I. Raskin (2007). "Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs." *Pharmacology & therapeutics* **113**(2): 354-368.

Feng, T.-S., E. M. Guantai, M. Nell, C. E. J. van Rensburg, K. Ncokazi, T. J. Egan, H. C. Hoppe and K. Chibale (2011). "Effects of highly active novel artemisinin–chloroquinoline hybrid compounds on β -hematin formation, parasite morphology and endocytosis in *Plasmodium falciparum*." *Biochemical Pharmacology* **82**(3): 236-247.

Ferreira, A., J. Balla, V. Jeney, G. Balla and M. P. Soares (2008). "A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?" *Journal of molecular medicine* **86**(10): 1097-1111.

Fitch, C. D. (2004). "Ferritoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs." *Life sciences* **74**(16): 1957-1972.

Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." *Annual review of biochemistry* **64**(1): 97-112.

Fridovich, I. (1997). "Superoxide Anion Radical ($O_2^{\cdot -}$), Superoxide Dismutases, and Related Matters." *Journal of Biological Chemistry* **272**(30): 18515-18517.

Fry, M. and M. Pudney (1992). "Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80)." *Biochem Pharmacol* **43**(7): 1545-1553.

Gamo, F.-J. (2014). "Antimalarial drug resistance: new treatments options for Plasmodium." *Drug Discovery Today: Technologies* **11**(0): 81-88.

Garcia, L. S. (2010). "Malaria." *Clinics in Laboratory Medicine* **30**(1): 93-129.

Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson and S. Bowman (2002). "Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum." *Nature* **419**(6906): 498-511.

Gardner, M. J., S. J. Shallom, J. M. Carlton, S. L. Salzberg, V. Nene, A. Shoaibi, A. Ciecko, J. Lynn, M. Rizzo and B. Weaver (2002). "Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 2, 10, 11 and 14." *Nature* **419**(6906): 531-534.

Gilberger, T. W., R. D. Walter and S. Müller (1997). "Identification and Characterization of the Functional Amino Acids at the Active Site of the Large Thioredoxin Reductase from Plasmodium falciparum." *Journal of Biological Chemistry* **272**(47): 29584-29589.

Gilson, P. R. and B. S. Crabb (2009). "Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by Plasmodium falciparum merozoites." *International journal for parasitology* **39**(1): 91-96.

Ginsburg, H. and H. Atamna (1994). "The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems." *Parasite (Paris, France)* **1**(1): 5.

Glenister, F. K., R. L. Coppel, A. F. Cowman, N. Mohandas and B. M. Cooke (2002). "Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells." *Blood* **99**(3): 1060-1063.

Goldberg, D. E. and A. F. Cowman (2010). "Moving in and renovating: exporting proteins from Plasmodium into host erythrocytes." *Nature Reviews Microbiology* **8**(9): 617-621.

Goyal, M., P. Singh, A. Alam, S. Kumar Das, M. Shameel Iqbal, S. Dey, S. Bindu, C. Pal and G. Panda (2012). "Aryl aryl methyl thio arenes prevent multi-drug resistant malaria in mouse by promoting oxidative stress in parasite." *Free Radical Biology and Medicine* **53**(1): 129-142.

Greenbaum, D. C., A. Baruch, M. Grainger, Z. Bozdech, K. F. Medzihradzsky, J. Engel, J. DeRisi, A. A. Holder and M. Bogyo (2002). "A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite." *Science* **298**(5600).

Grellier, P., A. Marozienė, H. Nivinskas, J. Šarlauskas, A. Aliverti and N. Čėnas (2010). "Antiplasmodial activity of quinones: Roles of aziridinyl substituents and the inhibition of Plasmodium falciparum glutathione reductase." *Archives of biochemistry and biophysics* **494**(1): 32-39.

Grellier, P., J. Sarlauskas, Z. Anusevicius, A. Maroziene, C. Houee-Levin, J. Schrevel and N. Cenas (2001). "Antiplasmodial activity of nitroaromatic and quinoidal compounds: redox potential vs. inhibition of erythrocyte glutathione reductase." *Arch Biochem Biophys* **393**(2): 199-206.

Haldar, K. and N. Mohandas (2007). "Erythrocyte remodeling by malaria parasites." *Current opinion in hematology* **14**(3): 203-209.

Hawthorne, P. L., K. R. Trenholme, T. S. Skinner-Adams, T. Spielmann, K. Fischer, M. W. A. Dixon, M. R. Ortega, K. L. Anderson, D. J. Kemp and D. L. Gardiner (2004). "A novel Plasmodium falciparum ring stage protein, REX, is located in Maurer's clefts." *Molecular and biochemical parasitology* **136**(2): 181-189.

Hebbel, R. P. and W. J. Miller (1984). "Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia." *Blood* **64**(3): 733-741.

Hempelmann, E., C. Motta, R. Hughes, S. A. Ward and P. G. Bray (2003). "Plasmodium falciparum: sacrificing membrane to grow crystals?" *Trends in parasitology* **19**(1): 23-26.

Hiller, N., K. Fritz-Wolf, M. Deponte, W. Wende, H. Zimmermann and K. Becker (2009). "Plasmodium falciparum glutathione S-transferase—Structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition." *Protein science* **15**(2): 281-289.

Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estraño and K. Haldar (2004). "A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection." *Science* **306**(5703): 1934-1937.

Huang, H.-L., S.-L. Wu, H.-F. Liao, C.-M. Jiang, R.-L. Huang, Y.-Y. Chen, Y.-C. Yang and Y.-J. Chen (2005). "Induction of apoptosis by three marine algae through generation of reactive oxygen species in human leukemic cell lines." *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(5): 1776-1781.

Induli, M., M. Gebru, N. Abdissa, H. Akala, I. Wekesa, R. Byamukama, M. Heydenreich, S. Murunga, E. Dagne and A. Yenesew (2013). "Antiplasmodial quinones from the rhizomes of *Kniphofia foliosa*." *Nat Prod Commun* **8**(9): 1261-1264.

Jiang, S., S. T. Prigge, L. Wei, Y. Gao, T. H. Hudson, L. Gerena, J. B. Dame and D. E. Kyle (2001). "New Class of Small Nonpeptidyl Compounds Blocks *Plasmodium falciparum* Development In Vitro by Inhibiting Plasmepsins." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**(9): 2577-2584.

Jiménez, J. N., G. Snounou, F. Letourneur, L. Rénia, I. D. Vélez and C. E. Muskus (2010). "Near-fixation of a *Pfmsp1* block 2 allelic variant in genetically diverse *Plasmodium falciparum* populations across Western Colombia." *Acta tropica* **114**(1): 67-70.

Jortzik, E., K. Fritz-Wolf, N. Sturm, M. Hipp, S. Rahlfs and K. Becker (2010). "Redox Regulation of *Plasmodium falciparum* Ornithine δ -Aminotransferase." *Journal of Molecular Biology* **402**(2): 445-459.

Kawazu, S., K. Komaki-Yasuda, H. Oku and S. Kano (2008). "Peroxiredoxins in malaria parasites: parasitologic aspects." *Parasitology international* **57**(1): 1-7.

Krauth-Siegel, R. L., H. Bauer and R. H. Schirmer (2005). "Dithiol Proteins as Guardians of the Intracellular Redox Milieu in Parasites: Old and New Drug

Targets in Trypanosomes and Malaria-Causing Plasmodia." *Angewandte Chemie International Edition* **44**(5): 690-715.

Krnajski, Z., T. W. Gilberger, R. D. Walter and S. Müller (2001). "The malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses a functional thioredoxin system." *Molecular and biochemical parasitology* **112**(2): 219.

Krugliak, M. and H. Ginsburg (2006). "The evolution of the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*—infected erythrocytes—a kinetic analysis." *Experimental Parasitology* **114**(4): 253-258.

Kyes, S. A., J. A. Rowe, N. Kriek and C. I. Newbold (1999). "Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(16): 9333-9338.

Lauer, S., J. VanWye, T. Harrison, H. McManus, B. U. Samuel, N. L. Hiller, N. Mohandas and K. Haldar (2000). "Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection." *The EMBO journal* **19**(14): 3556-3564.

Le Bonniec, S., C. Deregnacourt, V. Redeker, R. Banerjee, P. Grellier, D. E. Goldberg and J. Schrével (1999). "Plasmepsin II, an Acidic Hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* Food Vacuole, Is Active at Neutral pH on the Host Erythrocyte Membrane Skeleton." *Journal of Biological Chemistry* **274**(20): 14218-14223.

Lee, M., R. Fridman and S. Mobashery (2004). "Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases." *Chem. Soc. Rev.* **33**(7): 401-409.

Legorreta-Herrera, M., R. Retana-Ugalde, J. L. Ventura-Gallegos and V. Narváez (2010). "Pyrimethamine induces oxidative stress in *Plasmodium yoelii* 17XL-infected mice: A novel immunomodulatory mechanism of action for an old antimalarial drug?" *Experimental parasitology* **126**(3): 381-388.

León, C., J. N. Domínguez, D. Rojas, J. Rodríguez, N. G. de Domínguez, J. Gut, P. Rosenthal and L. Vásquez (2008). "Síntesis y Actividad Antimalárica de Derivados 3-Cloro-2N-Aminosustituido-1, 4-Naftoquinona." *Revista de Investigación*(64).

Lew, V. L., L. Macdonald, H. Ginsburg, M. Krugliak and T. Tiffert (2004). "Excess haemoglobin digestion by malaria parasites: a strategy to prevent premature host cell lysis." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **32**(3): 353-359.

Liang, G. Z. and S. Z. Li (2007). "A new sequence representation as applied in better specificity elucidation for human immunodeficiency virus type 1 protease." *Peptide Science* **88**(3): 401-412.

Lim, L. and G. I. McFadden (2010). "The evolution, metabolism and functions of the apicoplast." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**(1541): 749-763.

López-Otín, C. and J. S. Bond (2008). "Proteases: multifunctional enzymes in life and disease." *Journal of Biological Chemistry* **283**(45): 30433-30437.

Loria, P., S. Miller, M. Foley and L. Tilley (1999). "Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials." *Biochemical Journal* **339**(Pt 2): 363.

Lyon, J. A. and J. Haynes (1986). "Plasmodium falciparum antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors." *The Journal of Immunology* **136**(6): 2245-2251.

Maier, A. G., B. M. Cooke, A. F. Cowman and L. Tilley (2009). "Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte." *Nature Reviews Microbiology* **7**(5): 341-354.

Mandal, S. (2014). "Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: global spectrum." *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **4**, **Supplement 1**(0): S13-S26.

Mansi, M. P., M. Dickson and A. J. Rodríguez-Morales (2007). "Influencia de la parasitemia sobre los valores de hemoglobina y anemia en niños con malaria por Plasmodium falciparum no complicada: experiencia en un hospital de Tanzania." *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* **24**(1): 27-34.

Mariga, S. T., M. Kolko, A. Gjedde and L. H. Bergersen (2014). "Lactate transport and receptor actions in cerebral malaria." *Front Neurosci* **8**: 125.

Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**(1): 83-95.

Marti, M., J. Baum, M. Rug, L. Tilley and A. F. Cowman (2005). "Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte." *The Journal of cell biology* **171**(4): 587-592.

Martínez, A., I. Reyes and N. Reyes (2007). "Cytotoxicity of the herbicide glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells." *Biomédica* **27**(4): 594-604.

Mason, P. J., J. M. Bautista and F. Gilsanz (2007). "G6PD deficiency: the genotype-phenotype association." *Blood reviews* **21**(5): 267-283.

McConkey, G. A., M. J. Rogers and T. F. McCutchan (1997). "Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis." *Journal of Biological Chemistry* **272**(4): 2046-2049.

McCoubrie, J. E., S. K. Miller, T. Sargeant, R. T. Good, A. N. Hodder, T. P. Speed, T. F. de Koning-Ward and B. S. Crabb (2007). "Evidence for a common role for the serine-type *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen proteases: implications for vaccine and drug design." *Infection and immunity* **75**(12): 5565-5574.

Méndez, D., M. L. Hernández, A. Diez, A. Puyet and J. M. Bautista (2010). "Combined proteomic approaches for the identification of specific amino acid residues modified by 4-hydroxy-2-nonenal under physiological conditions." *Journal of Proteome Research* **9**(11): 5770-5781.

Méndez, D., M. Linares, A. Diez, A. Puyet and J. M. Bautista (2011). "Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon *Plasmodium falciparum* invasion are differentially carbonylated in G6PD A deficiency." *Free Radical Biology and Medicine* **50**(10): 1305-1313.

Menendez, C., A. F. Fleming and P. L. Alonso (2000). "Malaria-related anaemia." *Parasitol Today* **16**(11): 469-476.

Miller, L. H., D. I. Baruch, K. Marsh and O. K. Doumbo (2002). "The pathogenic basis of malaria." *Nature* **415**(6872): 673-679.

Moneriz, C., P. Marín-García, J. M. Bautista, A. Diez and A. Puyet (2009). "Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for quantification of low-parasitaemia Plasmodium infected erythrocytes." *Malaria journal* **8**(1): 279.

Müller, S. (2004). "Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum." *Molecular microbiology* **53**(5): 1291-1305.

Myatt, L. (2010). "Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta." *Placenta* **31**: S66-S69.

Nmorsi, O. P. G., C. Isaac, N. C. D. Ukwandu and B. A. Ohaneme (2010). "Pro-and anti-inflammatory cytokines profiles among Nigerian children infected with Plasmodium falciparum malaria." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **3**(1): 41-44.

Ntie-Kang, F., P. A. Onguene, L. L. Lifongo, J. C. Ndom, W. Sippl and L. M. Mbaze (2014). "The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids." *Malar J* **13**(1): 81.

Olszewski, K. L. and M. Llinás (2011). "Central carbon metabolism of Plasmodium parasites." *Molecular and biochemical parasitology* **175**(2): 95-103.

Olliaro, P. (2001). "Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs." *Pharmacology & Therapeutics* **89**(2): 207-219.

Omodeo-Salè, F., A. Motti, N. Basilico, S. Parapini, P. Olliaro and D. Taramelli (2003). "Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with Plasmodium falciparum." *Blood* **102**(2): 705-711.

Ondetti, M. A., B. Rubin and D. W. Cushman (1977). "Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents." *Science (New York, NY)* **196**(4288): 441.

Orjih, A. U., R. Chevli and C. D. Fitch (1985). "Toxic heme in sickle cells: an explanation for death of malaria parasites." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **34**(2): 223.

Orlowski, R. Z. (2004). "Bortezomib and its role in the management of patients with multiple myeloma." *Expert review of anticancer therapy* **4**(2): 171-179.

- Parapini, S., N. Basilico, E. Pasini, T. J. Egan, P. Olliaro, D. Taramelli and D. Monti (2000). "Standardization of the Physicochemical Parameters to Assess in Vitro the β -Hematin Inhibitory Activity of Antimalarial Drugs." *Experimental parasitology* **96**(4): 249-256.
- Pasini, E. M., H. U. Lutz, M. Mann and A. W. Thomas (2010). "Red Blood Cell (RBC) membrane proteomics—Part II: Comparative proteomics and RBC pathophysiology." *Journal of proteomics* **73**(3): 421-435.
- Payne, S. H. and W. F. Loomis (2006). "Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences." *Eukaryotic cell* **5**(2): 272-276.
- Piermatey-Ditta, J. (2012). "Síntesis y Actividad Citotóxica de 4,5 y 4,9-furanonaftoquinonas 2-alquil sustituidas." Tesis de Maestría (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Cartagena) Cartagena de Indias.
- Postma, N., J. Zuidema, E. Mommers and W. Eling (1996). "Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy." *Pharmacy world & science* **18**(4): 121-129.
- Premji, Z., Y. Hamisi, C. Shiff, J. Minjas, P. Lubega and C. Makwaya (1995). "Anaemia and Plasmodium falciparum infections among young children in an holoendemic area, Bagamoyo, Tanzania." *Acta Tropica* **59**(1): 55-64.
- Puente, X. S., L. M. Sánchez, C. M. Overall and C. López-Otín (2003). "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach." *Nature Reviews Genetics* **4**(7): 544-558.
- Qin, H., S. M. Srinivasula, G. Wu, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri and Y. Shi (1999). "Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1." *Nature* **399**(6736): 549-557.
- Ra, H. J. and W. C. Parks (2007). "Control of matrix metalloproteinase catalytic activity." *Matrix biology* **26**(8): 587-596.
- Radfar, A., A. Diez and J. M. Bautista (2008). "Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant Plasmodium falciparum" *Free Radical Biology and Medicine* **44**(12): 2034-2042.

Radfar, A., D. Méndez, C. Moneriz, M. Linares, P. Marín-García, A. Puyet, A. Diez and J. M. Bautista (2009). "Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels." *Nature protocols* **4**(12): 1899-1915.

Requena, J., R. Levine and E. Stadtman (2003). "Recent advances in the analysis of oxidized proteins." *Amino acids* **25**(3): 221-226.

Rosenthal, P. J. (1998). "Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy." *Emerging Infectious Diseases* **4**(1): 49.

Rosenthal, P. J. (2002). "Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malaria parasites." *Current opinion in hematology* **9**(2): 140-145.

Rosenthal, P. J. (2004). "Cysteine proteases of malaria parasites." *International Journal for Parasitology* **34**(13–14): 1489-1499.

Rosenthal, P. J., J. E. Olson, G. K. Lee, J. T. Palmer, J. L. Klaus and D. Rasnick (1996). "Antimalarial effects of vinyl sulfone cysteine proteinase inhibitors." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**(7): 1600-1603.

Rowe, J. A., A. Claessens, R. A. Corrigan and M. Arman (2009). "falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications."

Sam-Yellowe, T. Y., L. Florens, J. R. Johnson, T. Wang, J. A. Drazba, K. G. Le Roch, Y. Zhou, S. Batalov, D. J. Carucci and E. A. Winzeler (2004). "A Plasmodium gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling." *Genome research* **14**(6): 1052-1059.

Sarduy, E. S., A. C. Munoz, S. A. Trejo and A. C. P. M. de los (2012). "High-level expression of Falcipain-2 in Escherichia coli by codon optimization and auto-induction." *Protein Expr Purif* **83**(1): 59-69.

Scott, C. J. and C. C. Taggart (2010). "Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents." *Biochimie* **92**(11): 1681-1688.

Schellenberg, D., C. Menendez, J. J. Aponte, E. Kahigwa, M. Tanner, H. Mshinda and P. Alonso (2005). "Intermittent preventive antimalarial treatment for Tanzanian infants: follow-up to age 2 years of a randomised, placebo-controlled trial." *The Lancet* **365**(9469): 1481-1483.

- Seife, C. (1997). "Blunting nature's Swiss army knife." *Science* **277**(5332): 1602-1603.
- Shen, H.-B. and K.-C. Chou (2009). "Identification of proteases and their types." *Analytical Biochemistry* **385**(1): 153-160.
- Shinar, E. and E. Rachmilewitz (1990). Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Seminars in hematology*.
- Shingadia, D. (2014). "Treating malaria in the UK." *Paediatrics and Child Health* **24**(6): 232-235.
- Sibley, C. H., J. E. Hyde, P. F. G. Sims, C. V. Plowe, J. G. Kublin, E. K. Mberu, A. F. Cowman, P. A. Winstanley, W. M. Watkins and A. M. Nzila (2001). "Pyrimethamine–sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next?" *Trends in parasitology* **17**(12): 570-571.
- Sijwali, P. S., L. S. Brinen and P. J. Rosenthal (2001). "Systematic Optimization of Expression and Refolding of the *Plasmodium falciparum* Cysteine Protease Falcipain-2." *Protein Expr Purif* **22**(1): 128-134.
- Singh, N., P. S. Sijwali, K. C. Pandey and P. J. Rosenthal (2006). "*Plasmodium falciparum*: biochemical characterization of the cysteine protease falcipain-2'." *Experimental parasitology* **112**(3): 187.
- Siow, Y. L. and L. Sarna (2011). "Redox regulation in health and disease—Therapeutic potential of berberine." *Food Research International* **44**(8): 2409-2417.
- Skinner-Adams, T. S., C. M. Stack, K. R. Trenholme, C. L. Brown, J. Grembecka, J. Lowther, A. Mucha, M. Drag, P. Kafarski and S. McGowan (2010). "*Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials." *Trends in biochemical sciences* **35**(1): 53-61.
- Smith, T. G., D. Walliker and L. C. Ranford-Cartwright (2002). "Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa." *Trends in parasitology* **18**(7): 315-323.
- Soldati, D., B. J. Foth and A. F. Cowman (2004). "Molecular and functional aspects of parasite invasion." *Trends in parasitology* **20**(12): 567-574.

Soni, S., S. Dhawan, K. M. Rosen, M. Chafel, A. H. Chishti and M. Hanspal (2005). "Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **35**(2): 201-211.

Staszewski, S., J. Morales-Ramirez, K. T. Tashima, A. Rachlis, D. Skiest, J. Stanford, R. Stryker, P. Johnson, D. F. Labriola and D. Farina (1999). "Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults." *New England Journal of Medicine* **341**(25): 1865-1873.

Stratton, L., M. S. O'Neill, M. E. Kruk and M. L. Bell (2008). "The persistent problem of malaria: Addressing the fundamental causes of a global killer." *Social Science & Medicine* **67**(5): 854-862.

Su, X., V. M. Heatwole, S. P. Wertheimer, F. Guinet, J. A. Herrfeldt, D. S. Peterson, J. A. Ravetch and T. E. Wellems (1995). "The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of plasmodium falciparum-infected erythrocytes." *Cell* **82**(1): 89-100.

Subramanian, S., M. Hardt, Y. Choe, R. K. Niles, E. B. Johansen, J. Legac, J. Gut, I. D. Kerr, C. S. Craik and P. J. Rosenthal (2009). "Hemoglobin cleavage site-specificity of the Plasmodium falciparum cysteine proteases falcipain-2 and falcipain-3." *PLoS One* **4**(4): e5156.

Thierbach, G. and H. Reichenbach (1981). "Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain." *Biochim Biophys Acta* **638**(2): 282-289.

Thomson, R. (2012). *Naturally occurring quinones*, Elsevier.

Tilley, L., M. W. A. Dixon and K. Kirk (2011). "The Plasmodium falciparum-infected red blood cell." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**(6): 839-842.

Torrentino-Madamet, M., L. Almeras, J. Desplans, Y. Le Priol, M. Belghazi, M. Pophillat, P. Fourquet, Y. Jammes and D. Parzy (2011). "Global response of Plasmodium falciparum to hyperoxia: a combined transcriptomic and proteomic approach." *Malar J* **10**: 4.

- Torres, W. H. (2002). "Biología de las especies de oxígeno reactivas." *Mens Bioquim* **26**: 19-53.
- Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." *Science (New York, NY)* **193**(4254): 673.
- Turk, B. (2006). "Targeting proteases: successes, failures and future prospects." *Nature reviews Drug discovery* **5**(9): 785-799.
- Turrens, J. F. (2004). "Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa." *Molecular aspects of medicine* **25**(1): 211-220.
- Urban, S. and M. Freeman (2002). "Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution." *Current opinion in genetics & development* **12**(5): 512-518.
- Uyemura, S. A., S. Luo, S. N. J. Moreno and R. Docampo (2000). "Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria." *Journal of Biological Chemistry* **275**(13): 9709-9715.
- Vaidya, A. B., R. Akella and K. Suplick (1989). "Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite." *Molecular and biochemical parasitology* **35**(2): 97-107.
- Vitoria, M., R. Granich, C. F. Gilks, C. Gunneberg, M. Hosseini, W. Were, M. Raviglione and K. M. De Cock (2009). "The global fight against HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria current status and future perspectives." *American journal of clinical pathology* **131**(6): 844-848.
- Wainwright, M. and L. Amaral (2005). "Review: The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs." *Tropical Medicine & International Health* **10**(6): 501-511.
- Walker, N. F., B. Nadjm and C. J. M. Whitty (2010). "Malaria." *Medicine* **38**(1): 41-46.
- Ward, G. E., L. H. Miller and J. A. Dvorak (1993). "The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes." *Journal of cell science* **106**(1): 237-248.

- White, N. J., S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu and A. M. Dondorp (2014). "Malaria." *The Lancet* **383**(9918): 723-735.
- Winstanley, P., S. Ward, R. Snow and A. Breckenridge (2004). "Therapy of falciparum malaria in sub-saharan Africa: from molecule to policy." *Clinical microbiology reviews* **17**(3): 612-637.
- Winterbourn, C. C. (1985). "Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin." *Environmental health perspectives* **64**: 321.
- Withers-Martinez, C., L. Jean and M. J. Blackman (2004). "Subtilisin-like proteases of the malaria parasite." *Molecular microbiology* **53**(1): 55-63.
- Wood, Z. A., E. Schröder, J. Robin Harris and L. B. Poole (2003). "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins." *Trends in biochemical sciences* **28**(1): 32-40.
- Yan, C. and D. D. Boyd (2006). "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." *Journal of cellular physiology* **211**(1): 19-26.
- Zhang, J., M. Krugliak and H. Ginsburg (1999). "The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs." *Molecular and biochemical parasitology* **99**(1): 129-141.

ANEXOS

ANEXO 01.

Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides Database search on biological activity of quinoid molecules

CDr. C. Marlene Durán Lengua, Dr. C. Ricardo Gaitán Ibarra, Dr. C. Jesús Tadeo Olivero Verbel
Universidad de Cartagena, Colombia.

RESUMEN

Introducción: las quinonas son moléculas biológicas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Recientemente el grupo de investigación de productos naturales, de la Universidad de Cartagena; obtuvo por extracción de plantas del género *tabebuia* y por síntesis química un número importante de estos compuestos. Sin embargo, con el fin de seguir profundizando en los estudios de sus actividades y su relación con el tipo de estructura lineal o angular se realizó una revisión en varias bases de datos. **Objetivo:** buscar información que permitiera conocer si los compuestos obtenidos se encontraban reportados; así como también la actividad biológica y los bioensayos realizados a estas moléculas *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. **Métodos:** esta investigación fue desarrollada con el uso de un diseño que aplicó la edición de moléculas, mediante la interfaz gráfica de servidores (PUBCHEM CHEMIDPLUS ADVANCE, CHEBI) y una búsqueda de datos complementarios en la base de datos PUBMED. Los datos de la actividad biológica más relevantes fueron relacionados con la estructura química de los compuestos sintetizados y de los análogos suministrados por PUBMED. **Resultados:** de los compuestos hallados en las bases de datos, 24 presentaron código en la base de datos PUBCHEM, 12 mostraron reportes de actividad biológica en las bases de datos, y se encontró que el mayor número de bioensayos fue reportado con furanonaftoquinonas, seguido por naftoquinonas. **Conclusiones:** la actividad citotóxica y anticancerígena en diferentes líneas celulares, representa el mayor número de bioensayos realizados a estos compuestos.

Palabras clave: quinonas, moléculas pequeñas, bioensayos, bases de datos, actividad biológica.

ABSTRACT

Introduction: quinones are biological molecules widely distributed on the nature. Recently the group of natural products of the University of Cartagena (Colombia) obtained by extraction of plants of genus *tabebuia* and by chemistry synthesis an important number of these compounds. However with the purpose of made more detailed studies about the biological activity and structural type reported for these compounds, (naphthoquinone and furanonaphthoquinone linear o angular) reviewed in several database. **Objective:** search information that allows us to know 1) The compounds were already registered 2) Biological activity and bioassay performed to these molecules, *in vivo*, *in vitro* and *in silico*. **Methods:** This research was developed using a design of review than involved the edition of molecules by a graphic interface of server (PUBCHEM CHEMIDPLUS ADVANCE, CHEBI) and supplementary data search in PUBMED database. The most relevant data about biological activity was related with chemical structure of the synthesized compounds and their analogues obtained from databases. **Results:** The compounds tested on the database, 24 were already on PUBCHEM database, 12 molecules show reports of biological activity on the databases. Founding that bigger number of bioassays was reported with furanonaphthoquinones, followed by naphthoquinones. **Conclusion:** The cytotoxic and anticancer activity in cell lines of different type, represent the most of performed bioassay.

Key words: Quinones, small molecules, bioassay, databases, biological activity.

INTRODUCCIÓN

Las quinonas son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, los cuales se han obtenido de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos.¹ El grupo de investigación de productos naturales ha obtenido de fuentes naturales (bignoniáceas) y por síntesis química, compuestos quinoideos diferenciados en el número y tipo de sustituyentes en el núcleo base.² Los compuestos con base quinoide han sido estudiados *in vivo*, *in vitro* e *in silico* con el fin de evaluar y caracterizar efectos biológicos, entre los que se destacan anticancerígenos, antiparasitarios y citotóxicos atribuidos a estos compuestos. Los organismos internacionales han elaborado legislaciones para minimizar el uso de animales vertebrados, en la

evaluación de efectos biológicos de compuestos, y han fomentado métodos alternativos.³ Estos métodos incluyen bases de datos internacionales actualizadas, usos de modelos matemáticos que relacionan la estructura química, y la actividad bioquímica y fisiológica de compuestos químicos (QSAR). Los experimentos virtuales, comúnmente llamados *in silico*, son un conjunto de herramientas que permiten modelar interacciones a nivel molecular y entender el comportamiento general de cualquier sistema biológico.⁴ Los modelos computacionales están basados en información biológica y producen datos confiables que dan la posibilidad de planear nuevas hipótesis.⁵ Las técnicas *in vitro* comprenden el uso de hongos, bacterias, fracciones subcelulares, cultivos celulares, tejidos u órganos mantenidos en nutrientes; sin embargo, los métodos *in vitro* no suplantán los ensayos *in vivo*.⁶

Por la importancia biológica presentada por los compuestos con estructuras quinoides, muchos investigadores han dirigido sus investigaciones a la búsqueda de mecanismos que justifiquen su actividad y han hallado, entre otros, los siguientes: alteración de la membrana celular y/o nuclear, generación de acoplamientos con ácido desoxirribonucleico (ADN) y formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Los compuestos quinoides aceptan electrones, por la atracción conferida por los sustituyentes de los residuos quinoides, los cuales modulan las propiedades redox responsables del estrés oxidativo, mecanismo implicado en la inhibición del crecimiento bacteriano, viral y de células cancerígenas.⁶ La búsqueda de información adicional podría ampliar posibles aplicaciones para moléculas de este tipo, que ayudarían a dirigir de manera racional futuras investigaciones apoyadas en características estructurales y su relación con la actividad biológica descrita para los compuestos investigados.

Algunas quinonas son utilizadas como agentes farmacológicos: doxorubicina y mitomicina con actividad anticancerígena,⁷ y atovaquona como agente antipalúdico.⁸ López y otros sugieren que las actividades que presentan estos compuestos están basadas en una relación estructura-actividad, para lo cual tienen en consideración el tipo, la posición y la electrofilia de los sustituyentes.⁹

Este trabajo tuvo como objetivo buscar información para conocer si los compuestos obtenidos se encontraban reportados, así como la actividad biológica y los bioensayos realizados a estas moléculas *in vivo*, *in vitro* e *in silico*.

MÉTODOS

Las estructuras de 30 moléculas tipo quinonas, de origen natural y sintético, cuya numeración se explica en la figura 1, fueron sometidas a un proceso de revisión: ocho naftoquinonas, seis furanonaftoquinonas (lineales), cuatro furanonaftoquinonas (angulares), siete dihidrofuranonaftoquinonas (lineales) y cinco dihidrofuranonaftoquinonas (angulares).

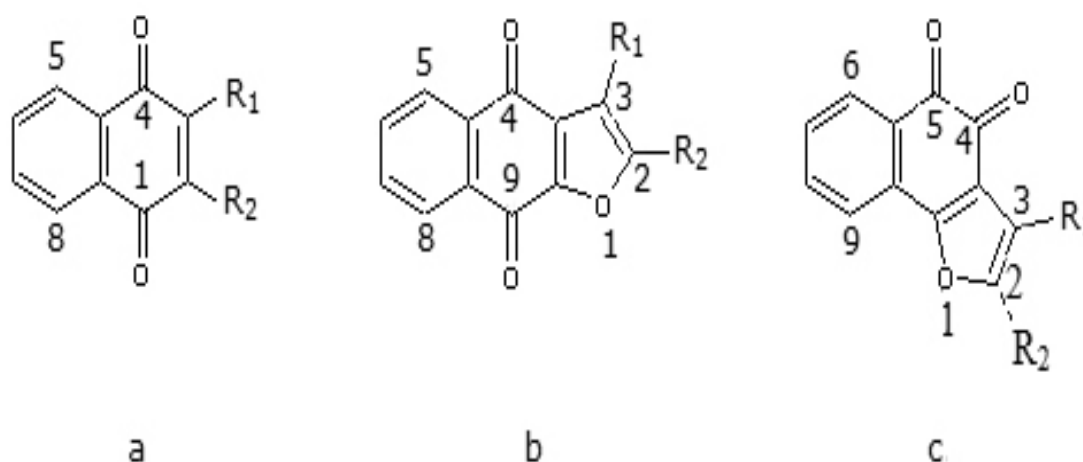


Fig. 1. Sistema de numeración: a) naftoquinonas, b) furanonaftoquinonas lineales y c) furanonaftoquinonas angulares.

En esta revisión las estructuras de las quinonas naturales y sintéticas fueron editadas en la interfaz gráfica de la base de datos PubChem: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/help.html>^{10,11} y en ChemIDplus Advance: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/Chebi>.^{12,13} La base de datos más consultada por su completa información fue PubChem, ya que presenta las estructuras de las moléculas codificadas y vínculos, mediante el cual se accede a otros servidores. Este sistema está soportado y operado por el Centro Nacional para la Información de la

Biología (NCBI), un componente de la Biblioteca Nacional de Medicina, y el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos.¹¹ Una vez obtenida la evidencia de actividad biológica, se utilizó un vínculo (*related record*) que permitió el acceso a estructuras análogas a la revisada, y con esa información se analizaron las características estructurales comunes que coincidían con una actividad biológica determinada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

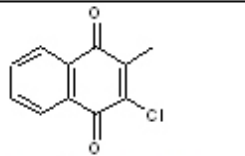
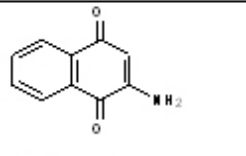
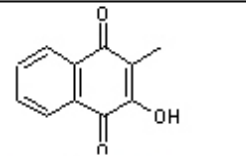
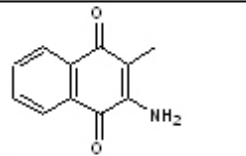
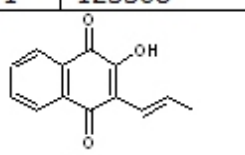
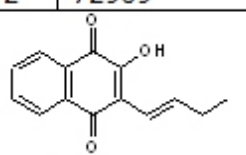
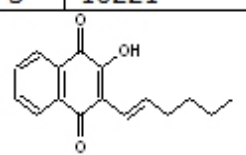
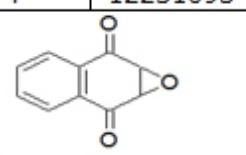
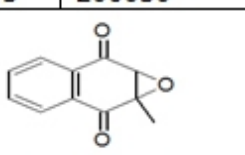
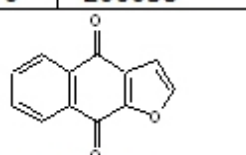
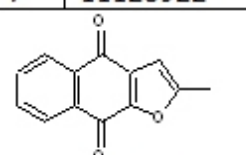
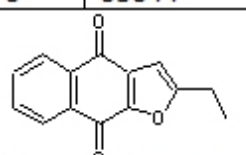
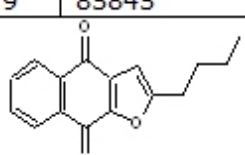
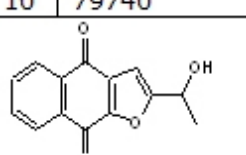
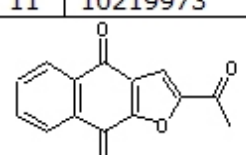
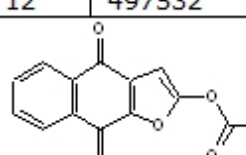
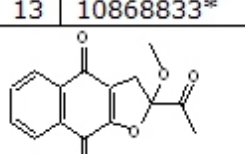
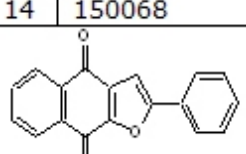
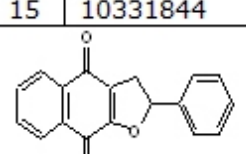
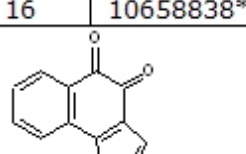
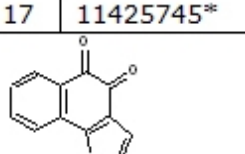
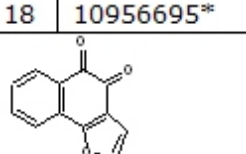
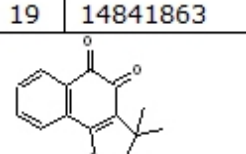
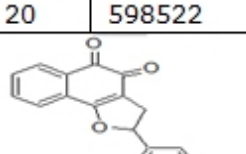
De las quinonas sometidas a la interfaz gráfica, 24 están registradas y codificadas en las bases de datos consultadas, de las cuales 12 tienen reportados bioensayos con actividad biológica (Figs. 2 y 3). Durante el proceso con cada molécula, se obtuvo un amplio número de compuestos similares, con reportes de bioensayos realizados a cada molécula en particular, hecho que permitió correlacionar características estructurales con la actividad biológica reportada para cada grupo en estudio.

El servidor PubChem registra la mayor información, sustentado por tres bases de datos PubChem (PC):

- *PC sustancia*: esta tiene más de 61 millones de sustancias registradas.
- *PC compuesto*: con más de 25 millones de estructuras.

PC bioensayos: con más de 1 600 bioensayos realizados. Esta base de datos posee vínculos con otros servidores, que permiten la conexión a literatura científica relacionada, y vínculos que llevan a moléculas similares, denominadas isómeros conformacionales, y detalles acerca de la relación estructura-actividad.¹²

A lo largo de esta revisión se hallaron numerosos estudios con estas moléculas, en los cuales se muestra el efecto tripanocida,¹⁴ así como la actividad antimalárica,^{2,15,16} anticancerígena,¹⁷ antiproliferativa,¹⁸ y antibacteriana.¹⁹

			
1 123368	2 72909	3 10221*	4 12251093*
			
5 260636*	6 260638 *	7 11128922*	8 85844
			
9 85845	10 79740	11 10219973	12 497532
			
13 10868833*	14 150068	15 10331844	16 10658838*
			
17 11425745*	18 10956695*	19 14841863	20 598522
			
21 611379	22 497536*	23 15783390*	24 10912707*

* Compuestos registrados sin reporte de actividad biológica en la base de datos PubChem.

Fig. 2. Compuestos registrados en la base de datos PubChem

Los datos arrojados para el compuesto 1 (2-cloro, 3-metil-1,4-naftoquinona), identificado en PubChem con el código 123368, reporta un ensayo positivo como inhibidor de la peroxidación lipídica, estudio evaluado en muestras homogenizadas de cerebro de ratas.²⁰ El método utilizado en este estudio fue la determinación malonildialdehído (MDA) producto de la oxidación, a través de la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA), aunque esta reacción es inespecífica, ya que TBA reacciona con una variedad de aldehídos, no solo con los formados como resultado de la peroxidación

lipídica, sino también con glucosa, desoxirribosa, ácido ascórbico, homocisteína y algunos aminoácidos, como prolina, arginina y glutamato.²¹ Sin embargo, esta reacción es utilizada ampliamente en el campo investigativo.

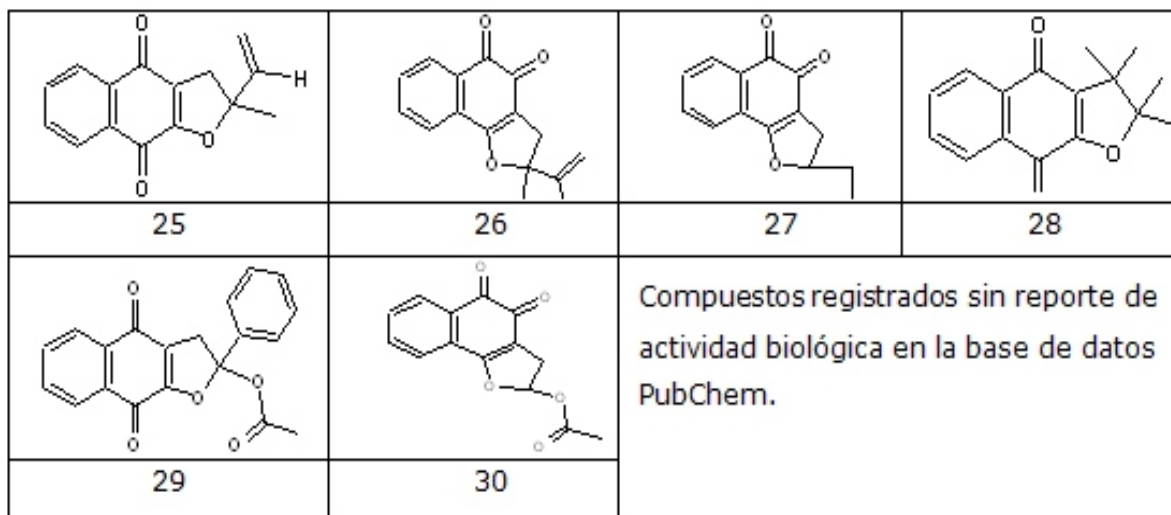


Fig. 3. Compuestos no registrados en las bases de datos con interfaz gráfica

Análogos relacionados, sustituidos con átomos de cloro, presentan actividad anticancerígena.²² Este estudio fue evaluado usando como blanco específico la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa, la cual cataliza la degradación del triptófano hasta formilquinurenina. La degradación de triptófano mediada por esta enzima se considera tóxica y responsable de la progresión tumoral,²³ inhibición de serino-proteasa en citomegalovirus,²⁴ que juega un papel importante en la maduración y ensamblaje de la cápside del citomegalovirus. Esta enzima es un blanco atractivo en la investigación de agentes promisorios en quimioterapia antiviral.

Estos análogos fueron evaluados en bioensayos relacionados con procesos inflamatorios, medidos *in vitro* en el modelo polimorfonuclear neutrófilos (PMN), en el cual evaluaron liberación de lisozima y β -glucuronidasa. Estos compuestos mostraron inhibición de la desgranulación del PMN cuando fueron estimulados por el formilpeptido N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). La actividad antialérgica, para estos compuestos, fue evaluada por liberación de histamina en mastocitos obtenidos de la cavidad peritoneal de rata Sprague-Dawley, la cual mostró un efecto significativo en la inhibición de la desgranulación de estas células.²⁵ Basados en la anterior información,

se podría postular al compuesto 1 como candidato para profundizar estudios relacionados con las actividades antes reportadas.

Investigaciones con compuestos quinoides han mostrado inhibición del crecimiento de células cancerígenas, ya que actúan como agentes alquilantes biorreductores.²⁶ Estas prodrogas no son citotóxicas en su forma original, pero pueden activarse al experimentar reducción enzimática dentro de las células, y convertirse en especies químicas capaces de producir alquilación en macromoléculas biológicas.²⁷ Las quinonas actúan como oxidantes y electrófilos, una adición nucleofílica a una biomolécula; representan una reducción que implica 1 o 2 electrones;²⁸ juegan un papel clave como agentes biorreductores, potenciadores del estrés oxidativo y alquilación de nucleófilos celulares, y abarcan un amplio rango de biomoléculas.²⁹

El compuesto 2, muestra reporte de 30 ensayos biológicos, en la base de datos PubChem, de los cuales 4 muestran actividad anticancerígena. Estos ensayos fueron realizados en cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, con mutaciones genéticas definidas en la reparación del ADN; control de genes encargados de la proliferación y control del crecimiento celular.³⁰ Esta información está registrada en la base de datos del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI). Este compuesto tiene estudios que reportan la inhibición de polimerasa de ARN de *Vibrio cholerae*. Los datos se encuentran detallados en esta base de datos. De otro lado, estudios realizados por *Moret* y otros mostraron que la actividad biológica se relaciona con la hidrofobicidad de estos compuestos.³¹

A través del vínculo a Pubmed se obtuvo información referente a análogos al compuesto 2 obtenido de plantas, con actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, ampliamente extendida en la naturaleza. Esta se ha aislado de infecciones nosocomiales, neumonía, infecciones del tracto urinario y en bacteriemia.³² El estudio sobre *Staphylococcus aureus* pone de manifiesto el papel de las estructuras quinoides y el carácter lipofílico en la actividad de estos compuestos. Las furanonaftoquinonas evaluadas inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistentes y sensibles a meticilina. En esta investigación la furanonaftoquinona con un doble enlace adicional presentó menor valor en la concentración mínima inhibitoria (MIC).³³

El pigmento quinoide phthiocol, aislado de *Mycobacterium tuberculosis*; y piocianina producido por *Pseudomonas aeruginosa*, similares al compuesto 3, 3-metil- 2-hidroxi-naftoquinona, fueron evaluados en su efecto sobre la producción de anión superóxido (O_2^-) en cultivo de células epiteliales pulmonares tipo A 549, y se midió específicamente la inhibición de la enzima aconitasa, la cual es un indicador sensible de cambios en la actividad de anión superóxido O_2^- *in vivo* e *in vitro* y cataliza la conversión de citrato a isocitrato. La producción de anión superóxido es un mecanismo de interés, al momento de diseñar compuestos con actividad citotóxica y antibiótica.³⁴ Los compuestos 4, 5, 6 y 7 no tienen reporte de actividad biológica en las bases de datos consultadas.

El compuesto epoxídico 8, tiene reportada inhibición de la enzima metiltransferasa de histona-lisina, relacionada con la transferencia de grupos metilos desde adenosil-metionina hasta los aminoácidos lisina o arginina de las histonas. Las histonas metiladas se unen fuertemente al ADN e inhiben el proceso de transcripción. Esta molécula ha sido evaluada en cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual inhibió la enzima α -DNA polimerasa, y la proteína TOR (blanco de rapamicina); esta última participa en el inicio de la transcripción del ARN mensajero (mARN) y la síntesis de proteínas; regula rutas de señalización relacionadas con el crecimiento y progresión del ciclo celular; TOR se encuentra asociada a las regiones promotoras de los genes que se transcriben y esta interacción es bloqueada por rapamicina (macrolido inmunosupresor utilizado para evitar el rechazo en trasplantes de órganos).³⁵ Estas actividades están relacionadas con el desarrollo de células cancerígenas (Base de datos PubChem-CID 85844).

El compuesto 9 metil epóxido, similar a menadiona, genera radical hidroxilo (OH^\cdot) en presencia de iones metálicos. Los radicales libres producen alteración al ácido desoxirribonucleico (ADN) e inducen apoptosis. Estudios realizados a compuestos similares reportan inhibición de la proliferación celular y detención del ciclo celular.³⁶ Bioensayos de actividad anticancerígena por inducción de apoptosis en células U87 línea celular humana de glioblastoma mostraron fragmentación del ADN y condensación de cromatina.³⁷

El compuesto 10 (Naphtho[2,3-*b*] furan-4,9-diones) fue reportado en Pubchem con más de 20 bioensayos positivos, los cuales evaluaron la citotoxicidad del compuesto en varias líneas celulares normales: fibroblastos gingivales (HGF), célula pulpa (HPC), fibroblastos del ligamento periodontal (HPLF); y líneas celulares tumorales: células escamosas de carcinoma oral (HSC-2, HSC-3, HSC-4) y leucemia promielocítica (HL-60).^{38,39} La misma molécula fue evaluada *in silico* para determinar su potencial contra *Tripanosoma cruzi*.¹⁴ Mediante métodos estadísticos se seleccionaron cuatro descriptores que se correlacionaron con la actividad tripanocida: 1) ángulo de torsión, 2) suma de valores absolutos de cargas atómicas, 3) volumen de sustituyentes en la región B, y 4) energía del orbital molecular bajo, los cuales fueron calculados mediante el método DFT/B3LYP (teoría del funcional densidad), en una de las versiones más utilizadas, el funcional híbrido B3LYP (Becke, 3-parámetro, Lee-Yang-Parr), con aproximaciones de correlación-intercambio para compuestos orgánicos y metales de transición.⁴⁰ Muchas propiedades están relacionadas con energías totales o diferencias. Estos descriptores proporcionan información acerca del tipo de interacción que ocurre entre los compuestos y el receptor biológico. De otro lado, estas moléculas, por su estructura planar aromática, se pueden intercalar en la molécula de ADN, con la consecuente producción de apoptosis y necrosis en células malignas.⁴¹

El compuesto 11 fue evaluado en su actividad citotóxica, y se destacó su selectividad en comparación con las células epiteliales normales. Este compuesto actúa como antitumoral por inducción de apoptosis, con efecto sobre la expresión de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 (proteína 2 de células B), las cuales regulan procesos en la permeabilización mitocondrial, con un papel importante en la vía intrínseca de la apoptosis celular. Su alteración podría estar relacionada con necrosis por daño mitocondrial.⁴² La actividad metabólica y el efecto de los oncogenes favorecen el aumento de las especies reactivas de oxígeno, con lo que promueven la inestabilidad genética.⁴³ De otro lado, las células cancerígenas tienen bajas defensas antioxidantes,⁴⁴ característica que las hace más vulnerables y selectivas comparadas con las células normales.

El compuesto 12, furanonaftoquinona sustituida en la posición dos por un grupo 2-hidroxietil y varias estructura similares, fueron evaluadas en tripomastigote de *Tripanosoma cruzi* con resultados inespecíficos (Base de datos Pubchem CID 497532).

Ferreira evaluó la actividad de una serie de compuestos quinoides contra *Toxoplasma gondii*, *in vitro* e *in vivo*, de los cuales siete mostraron actividad *in vitro*, mientras que tres fueron efectivos *in vivo*.⁴⁵ Los compuestos 13, 14, 16, 17 y 18 no registran reportes de ensayos biológicos en las bases de datos investigadas. El compuesto 15 2-acetil furanonaftoquinona lineal, reportó bioensayos positivos para actividad citotóxica, anti-proliferativa⁴⁶ y anticancerígena.⁴⁷

Una serie de compuestos quinoides similares, aislados de *Tabebuia impetiginosa*, fueron evaluados *in vitro*, y mostraron inhibición del crecimiento de keratinocitos humanos línea HaCaT. Estas células han permitido la caracterización de procesos metabólicos en piel y vitamina D.⁴⁸ Compuestos que inhiben el crecimiento de estas células merecen estudios más profundos que avalen su potencial actividad antipsoriasis. En investigaciones que evalúan la inhibición de estas células son consideradas potenciales agentes antipsoriasis.^{46,49,50}

El compuesto 19, 2-fenil furanonaftoquinona lineal y moléculas similares, fue investigado por *Klebe*, y el efecto citotóxico en un ambiente virtual, con el uso de modelos de relación estructura-actividad (3D QSAR) para lo cual utilizó el método CoMSIA (del inglés Comparative Molecular Similarity Index Analysis), el cual calcula índices de similitud para un conjunto de moléculas previamente alineadas con respecto a propiedades fisicoquímicas; interacciones de distintos tipos, estéricas, electrostáticas y puentes de hidrógeno. Esos índices luego se correlacionan con la actividad citotóxica.⁵¹ *Pérez-Sacau* determinó estructuras específicas capaces de unirse a ligando claves para el despliegue de propiedades antitumorales.⁵²

Con respecto al compuesto 20, una furanonaftoquinona angular, *Tseng* reportó inhibición de la proliferación celular. Los ensayos fueron realizados en líneas celulares de carcinomas humanos MCF7 (cáncer de mama), SF268 (glioblastoma), K562 (eritroleucemia) y en la línea de fibroblastos Detroit 551; y mostraron inhibición del crecimiento celular en la línea K562, mientras que los ensayos efectuados en fibroblastos no mostraron citotoxicidad.⁵³ En este estudio fue determinado el índice de selectividad (IS=concentración citotóxica/50/concentración inhibitoria 50), el cual es utilizado para determinar la selectividad de un compuesto o especie química con respecto a una serie de ensayos biológicos.^{54,55} Un compuesto análogo al 20 arrojó un

IS alto comparable con el IS de daunorrubicina, un fármaco utilizado en quimioterapia.⁵³ Este compuesto inhibió de manera reversible la enzima tirosina fosfatasa (CD45), de particular importancia en desórdenes autoinmunes, rechazo y trasplantes; hecho que pudiera explicar por qué este compuesto inhibe la proliferación celular.⁵⁶ Por los bioensayos realizados al compuesto 20 y los resultados obtenidos en las diferentes investigaciones, sus indicios de selectividad hacen a esta molécula interesante para seguir ahondando en su estudio y evaluación de la actividad antiproliferativa y citotóxica de este compuesto. Un análogo de este: 2-Methyl-2-(2-methylpropenyl)-2,3-dihydronaphthoquinone [2,3-b] furan-4,9-dione (NFD-37), inhibió la interleucina 6 (IL 6),⁵⁷ ensayo realizado en macrófagos de murino estimulados con lipopolisacáridos (LPS), lo cual nos hace inferir que estos compuestos podrían ser explorados en su potencial antiinflamatorio.

El compuesto 21, codificado en la base de datos con ensayos biológicos de citotoxicidad realizados en células KB (carcinoma epidermoide humano); furanonaftoquinonas angulares con estructura similar, aisladas de *Psychotria rubra*, mostraron citotoxicidad significativa en la línea celular KB, que señalaron que sustituciones con grupos hidrofílicos disminuyen la actividad biológica de estos compuestos.⁵⁸

Furanonaftoquinonas similares a los compuestos estudiados fueron activos contra tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*,⁵⁹ y confirmaron que la geometría angular está fuertemente relacionada con la actividad biológica presentada por estos compuestos. Otros análogos quinoideos tricíclicos, tipo alfa lapachona, fueron significativamente citotóxicos en células de mamíferos cultivadas *in vitro*; línea P388 linfoblástica.⁶⁰ Estos compuestos también presentaron actividad frente a cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina, cepa K1 y cepa sensible T9-96.⁶¹ Los compuestos 22, 23 y 24 están registrados y sin reportes de actividad biológica al momento de terminar esta revisión.

Naftoquinonas y furanonaftoquinonas ejercen efectos anticancerígenos gracias a sus capacidades de generar especies reactivas de oxígeno, teniendo en cuenta su electrofilia, mediante la cual forman aductos con los constituyentes celulares; características que fueron demostradas por *Kwiecinski*, quien observó un aumento en

los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células T24 expuestas a juglona (naftoquinona hidroxilada en la posición ocho). La generación de ERO fue acompañada por un aumento en el consumo intracelular de glutatión reducido GSH.⁶² Los resultados obtenidos a través de esta revisión en los diferentes ensayos realizados a estas moléculas (*in vivo e in vitro*), apuntan hacia mecanismos relacionados con la capacidad de inhibir la cadena transportadora de electrones, desacopladores de la fosforilación oxidativa, agentes intercalantes en la doble hélice del ADN y alquilantes de biomoléculas.⁶³

En esta revisión, el mayor número de bioensayos con actividad biológica corresponde a la actividad citotóxica y anticancerígena, mientras que la actividad antiparasitaria fue realizada a *Plasmodium spp* y *Trypanosoma cruzi*. Las propiedades antitumorales y el mecanismo de acción de las quinonas ha sido estudiado y se conoce que ellas pueden actuar como inhibidores de la topoisomerasa, intercalación en el DNA y posterior reducción de las quinonas por oxido-reductasas.⁶⁴

Simamura realizó estudios con furanonaftoquinonas en células A 549 de adenocarcinoma pulmonar humano, las cuales desarrollaron una masiva producción de H₂O₂, alteración del potencial de la membrana mitocondrial, liberación de citocromo C y caspasa 9,⁶⁵ acciones que inducen la muerte celular (apoptosis), un mecanismo a tener en cuenta en la terapia contra el cáncer. Entre los compuestos evaluados, la mayor cantidad de reportes para actividad biológica y el mayor número de ensayos se han realizado en el grupo de las furanonaftoquinonas lineales. Estos ensayos en su mayoría evaluaron citotoxicidad. La actividad antiparasitaria parece concentrarse en las furanonaftoquinonas tanto lineales como angulares, con ensayos *in vitro e in silico* relacionados principalmente con *T. cruzi* y *P. falciparum*. A lo largo de esta revisión la atención se concentró en estos dos parásitos, posiblemente por dos razones: la primera, el limitado número de fármacos utilizados para el tratamiento, y la segunda, la resistencia que estos presentan a los medicamentos existentes.

Se concluye que las bases de datos consultadas suministran amplia información que puede ser aprovechada como herramienta para dirigir con altas probabilidades de éxito el tamizaje biológico de productos naturales y sintéticos. La correcta utilización de esta información puede correlacionarse, para encontrar evidencias adicionales que permitan

crear modelos cercanos a farmacóforos que reducen tiempo y costo en el diseño de moléculas con potencial biológico.

La información relacionada con las actividades biológicas ensayadas brinda la posibilidad de conocer blancos moleculares sobre los cuales podrían actuar nuevas estructuras análogas e, incluso, datos fisicoquímicos reportados suministran ideas aproximadas acerca de las características fisicoquímicas necesarias para optimizar nuevas moléculas. Los ensayos biológicos de las moléculas revisadas son escasos, los cuales cubren solo el 40 % de los compuestos evaluados, hecho que en cierta forma abre grandes posibilidades de indagación para las moléculas sin reporte, y para profundizar en los estudios reportados. Estos ensayos en su gran mayoría estuvieron relacionados con actividad anticancerígena y citotóxica, en menor grado con actividad antibacteriana y antiparasitaria.

Estos resultados estimulan la obtención de nuevas moléculas naturales o sintéticas, con el cuidado de mantener características estructurales necesarias para la actividad biológica y adicionar otras que pudieran mejorar el perfil biológico, según la tendencia evidenciada en el análisis de las estructuras reportadas.

La ausencia de reportes y la no codificación de algunos de estos compuestos, son indicativos que se convierten en soportes adicionales, que sopesan la novedad estructural de algunos de los compuestos sintetizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernardo PH, Chai CL, Le Guen M, Smith GD, Waring P. Structure-activity delineation of quinones related to the biologically active Calothrixin B. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17(1):82-5.
2. Gaitán Ibarra RAE, Álvarez W, Jaraba-Salgado Z. Obtención de análogos de productos naturales furanonaftoquinónicos y evaluación de su actividad antimalárica frente a *Plasmodium falciparum*. *Scientia et Technica*. 2007;33:141-4
3. Repetto G, Repetto M. Métodos alternativos: estudios toxicológicos *in vitro*. *Toxicología especial*. Díaz de Santos; 1995:37-59.
4. Kumar N, Hendriks BS, Janes KA, de Graaf D, Lauffenburger DA. Applying computational modeling to drug discovery and development. *Drug discovery today*. 2006;11(17):806-11.
5. Frazier JM. *In vitro* toxicity testing: applications to safety evaluation: *Inform Health Care*; 1992.
6. Canales M, Hernández T, Serrano R, Hernández LB, Durán A, Ríos V, et al. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *J Ethnopharmacol*. 2007;110(2):343-7.
7. Koo DH, Lee JL, Kim TW, Chang HM, Ryu MH, Yook JH, et al. Adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and mitomycin-C (FAM) for 6 months after curative resection of gastric carcinoma. *Europ J Surg Oncol (EJSO)*. 2007;33(7):843-8.
8. Siregar JE, Syafruddin D, Matsuoka H, Kita K, Marzuki S. Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo2) of the cytochrome b gene. *Parasitology International*. 2008;57(2):229-32.
9. López L, Li I. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Rev Mex Cienc Farmacéut*. 2011;42(1):6-17.
10. Ihlenfeldt W, Bolton E, Bryant S. The PubChem chemical structure sketcher. *J Cheminform*. 2009;1(1):20.
11. Chen B, Wild D, Guha R. PubChem as a source of polypharmacology. *J Chem Inf Model*. 2009;49(9):2044-55.
12. Degtyarenko K, de Matos P, Ennis M, Hastings J, Zbinden M, McNaught A, et al. ChEBI: a database and ontology for chemical entities of biological interest. *Nucleic Acids Res*. 2008:D344-50.

13. de Matos P, Alcantara R, Dekker A, Ennis M, Hastings J, Haug K, et al. Chemical Entities of Biological Interest: an update. *Nucleic Acids Res.* 2009;38(Database issue):D249-54.
14. Molfetta FA, Bruni AT, Honorio KM, da Silva AB. A structure-activity relationship study of quinone compounds with trypanocidal activity. *Eur J Med Chem.* 2005 Apr;40(4):329-38.
15. Grellier P, Marozziene A, Nivinskas H, Sarlauskas J, Aliverti ANC. Antiplasmodial activity of quinones: Roles of aziridinyl substituents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* glutathione reductase. *Arch Biochem Bioph.* 2010;494(1):32-9.
16. El Hage S, Ane MI, Stigliani JL, Marjorie M, Vial H, Baziard-Mouysset GV, et al. Synthesis and antimalarial activity of new atovaquone derivatives. *Europ J Med Chem.* 2009;44(11):4778-82.
17. Sagar S, Green IR. Pro-apoptotic activities of novel synthetic quinones in human cancer cell lines. *Canc Lett.* 2009;285(1):23-7.
18. Rios-Luci C, Bonifazi EL, Leon LG, Montero JC, Burton G, Pandiella A, et al. beta-Lapachone analogs with enhanced antiproliferative activity. *Eur J Med Chem.* 2012;53C:264-74.
19. Rodríguez EGR, Méndez D, Martelo J, Zambrano R. Análogos de quinonas naturales con actividad antibacteriana. *Scien Techn.* 2007;33:281-3.
20. Jung YS, Joe BY, Cho SJ, Konishi Y. 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinones and 2-methyl-1,4-naphthoquinones: glycation inhibitors with lipid peroxidation activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(4):1125-9.
21. Spickett CM, Wiswedel I, Siems W, Zarkovic K, Zarkovic N. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free radical research.* 2010;44(10):1172-202.
22. Kumar S, Malachowski WP, DuHadaway JB, LaLonde JM, Carroll PJ, Jaller D, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is the anticancer target for a novel series of potent naphthoquinone-based inhibitors. *J Med Chem.* 2008;51(6):1706-18.
23. Adams S, Braidy N, Bessesde A, Brew BJ, Grant R, Teo C, et al. The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis. *Canc res.* 2012;72(22):5649-57.
24. Ertl P, Cooper D, Allen G, Slater MJ. 2-chloro-3-substituted-1,4-naphthoquinone inactivators of human cytomegalovirus protease. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999;9(19):2863-6.

25. Lien JC, Huang LJ, Wang JP, Teng CM, Lee KH, Kuo SC. Synthesis and antiplatelet, antiinflammatory and antiallergic activities of 2-substituted 3-chloro-1,4-naphthoquinone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 1997;5(12):2111-20.
26. Hodnett EM, Wongwiechintana C, Dunn WJ, Marrs P. Substituted 1,4-naphthoquinones vs. the ascitic sarcoma 180 of mice. *J Med Chem.* 1983;26(4):570-4.
27. Urdaneta N, Roberts K, Vera R, Vera A, Gutiérrez E, Aguilar Y, et al. Papel de la mitomicina C como adyuvante a la radioterapia en el tratamiento de cáncer del cuello uterino localmente avanzado; Role of mitomycin C as adyunct in the treatment of locally advanced cancer of uterine cervix. *Gac méd Caracas.* 1998;106(3):310-31.
28. Hillard EA, de Abreu FC, Ferreira DCM, Jaouen G, Goulart MOF, Amatore C. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. *Chem Commun.* 2008 (23):2612-28.
29. Begleiter A, Leith MK. Activity of quinone alkylating agents in quinone-resistant cells. *Cancer research.* 1990;50(10):2872-6.
30. Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol.* 2001;18(4):767-73.
31. Moret EE, de Boer M, Hilbers HW, Tollenaere JP, Janssen LH, Holthuis JJ, et al. *In vivo* activity and hydrophobicity of cytostatic aziridinyl quinones. *J Med Chem.* 1996;39(3):720-8.
32. Habbal OA, Al-Jabri AA, El-Hag AH, Al-Mahrooqi ZH, Al-Hashmi NA. *In-vitro* antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* Linn (henna). A pilot study on the Omani henna. *Sau Med J.* 2005;26(1):69.
33. Machado T, Pinto A, Pinto M, Leal I, Silva M, Amaral A, et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Internat J Antimicrob Agents.* 2003;21(3):279-84.
34. Gardner PR. Superoxide production by the mycobacterial and pseudomonad quinoid pigments phthiocol and pyocyanine in human lung cells. *Arch Biochem Biophys.* 1996;333(1):267-74.
35. Malik AR, Urbanska M, Macías M, Skalecka A, Jaworski J. Beyond control of protein translation: What we have learned about the non-canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2013.

36. Klaus V, Hartmann T, Gambini J, Graf P, Stahl W, Hartwig A, et al. 1, 4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2010;496(2):93-100.
37. Wu J, Chien CC, Yang LY, Huang GC, Cheng MC, Lin CT, et al. Vitamin K3-2,3-epoxide induction of apoptosis with activation of ROS-dependent ERK and JNK protein phosphorylation in human glioma cells. *Chemico-biological interactions.* 2011;193(1):3-11.
38. Ogawa M, Koyanagi J, Sugaya A, Tsuda T, Ohguchi H, Nakayama K, et al. Cytotoxic activity toward KB cells of 2-substituted naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and their related compounds. *Biosc, biotech, biochem.* 2006;70(4):1009-12.
39. Takano A, Hashimoto K, Ogawa M, Koyanagi J, Kurihara T, Wakabayashi H, et al. Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in human tumor cell lines: relationship to electronic structure. *Anticancer research.* 2009;29(1):455-64.
40. Tlahuice Flores A, Pérez Tijerina E, Mejía Rosales S. Modos vibracionales de C60 obtenidos mediante el método DFT. Universidad Autónoma de Nuevo León, México: Ciencia UANL. 2007;10(3):261-68.
41. Jiménez-Alonso S, Guasch J, Estévez-Braun A, Ratera I, Veciana J, Ravelo AG. Electronic and cytotoxic properties of 2-amino-naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. *J Org Chem.* 2011;76(6):1634-43.
42. Pan J, Simamura E, Koyama J, Shimada H, Hirai KI. Induced apoptosis and necrosis by 2-methylfuranonaphthoquinone in human cervical cancer HeLa cells. *Cancer detection and prevention.* 2000;24(3):266-74.
43. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell.* 2006;10(3):241-52.
44. Verrax J, Beck R, Dejeans N, Glorieux C, Sid B, Pedrosa RC, et al. Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(2):213-21.
45. Ferreira RA, Oliveira AB, Gualberto SA, Vitor RW. Activity of natural and synthetic naphthoquinones against *Toxoplasma gondii*, *in vitro* and in murine models of infection. *Parasite.* 2002;9(3):261-9.
46. Muller K, Sellmer A, Wiegrebbe W. Potential antipsoriatic agents: lapacho compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. *J Nat Prod.* 1999;62(8):1134-6.

47. Eyong KO, Kumar PS, Kuete V, Folefoc GN, Nkengfack EA, Baskaran S. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(20):5387-90.
48. Lehmann B. HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *J Invest Dermatol.* 1997;108(1):78-82.
49. Baumer W, Hoppmann J, Rundfeldt C, Kietzmann M. Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis. *Inflamm Aller-Dr Targ.* 2007;6(1):17-26.
50. Tse WP, Che CT, Liu K, Lin ZX. Evaluation of the anti-proliferative properties of selected psoriasis-treating Chinese medicines on cultured HaCaT cells. *J Ethnopharmacol.* 2006;108(1):133-41.
51. Klebe G, Abraham U, Mietzner T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *J Med Chem.* 1994;37(24):4130-46.
52. Pérez-Sacau E, Díaz-Penate RG, Estévez-Braun A, Ravelo AG, García-Castellano JM, Pardo L, et al. Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *J Med Chem.* 2007;50(4):696-706.
53. Tseng CH, Chen YL, Yang SH, Peng SI, Cheng CM, Han CH, et al. Synthesis and antiproliferative evaluation of certain iminonaphtho[2,3-b]furan derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(14):5172-82.
54. Fernández-Calienes Valdés A, Mendiola Martínez J, Acuña Rodríguez D, Caballero Lorenzo Y, Scull Lizama R, Gutiérrez Gaitén Y. Actividad antimalárica y citotoxicidad de extractos hidroalcohólicos de seis especies de plantas usadas en la medicina tradicional cubana. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(1):52-7.
55. Quispe A, Zavala D, Rojas J. Efecto citotóxico selectivo *in vitro* de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Rev Per Med Exp Sal Púb.* 2006;23(4):265-9.
56. Urbanek RA, Suchard SJ, Steelman GB, Knappenberger KS, Sygowski LA, Veale CA, et al. Potent reversible inhibitors of the protein tyrosine phosphatase CD45. *J Med Chem.* 2001;44(11):1777-93.
57. Shin HM, Lee YR, Chang YS, Lee JY, Kim BH, Min KR, et al. Suppression of interleukin-6 production in macrophages by furonaphthoquinone NFD-37. *Int Immunopharmacol.* 2006;6(6):916-23.

58. Hayashi T, Smith FT, Lee KH. Antitumor agents. 89. Psychorubrin, a new cytotoxic naphthoquinone from *Psychotria rubra* and its structure-activity relationships. *J Med Chem.* 1987;30(11):2005-8.
59. Goulart MIOF, Zani CL, Tonholo J, Freitas LR, de Abreu FC, Oliveira AdB, et al. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorganic & Med Chem Lett.* 1997;7(15):2043-8.
60. Mi Q, Lantvit D, Reyes-Lim E, Chai H, Zhao W, Lee IS, et al. Evaluation of the potential cancer chemotherapeutic efficacy of natural product isolates employing in vivo hollow fiber tests. *J Nat Prod.* 2002;65(6):842-50.
61. Weiss CR, Moideen SV, Croft SL, Houghton PJ. Activity of extracts and isolated naphthoquinones from *Kigelia pinnata* against *Plasmodium falciparum*. *J Nat Prod.* 2000;63(9):1306-9.
62. Kwiecinski MR, Pedrosa RC, Felipe KB, Farias MS, Glorieux C, Valenzuela M, et al. Inhibition of cell proliferation and migration by oxidative stress from ascorbate-driven juglone redox cycling in human bladder-derived T24 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;421(2):268-73.
63. Simamura E, Hirai KI, Shimada H, Pan J, Koyama J. Mitochondrial damage prior to apoptosis in furanonaphthoquinone treated lung cancer cells. *Canc detect prevent.* 2003;27(1):5-13.
64. Miguel del Corral JM, Castro MA, Oliveira AB, Gualberto SA, Cuevas C, San Feliciano A. New cytotoxic furoquinones obtained from terpenyl-1,4-naphthoquinones and 1,4-anthracenediones. *Bioorg Med Chem.* 2006;14(21):7231-40.
65. Simamura E, Hirai KI, Shimada H, Pan J, Koyama J. Mitochondrial damage prior to apoptosis in furanonaphthoquinone treated lung cancer cells. *Cancer detection and prevention.* 2003;27(1):5-13.

Recibido: 15 de marzo de 2013

Aprobado: 18 de julio de 2013.

CDr. C. *Marlene Durán Lengua*. Grupo de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Cartagena. Campus de la Salud, Barrio Zaragocilla. Cartagena de Indias, Bolívar. Colombia. Correo electrónico: mduranl@unicartagena.edu.co

ANEXO 2.

Quinoid Compounds Cause Inhibition of Falcipain 2, and Arrest *Plasmodium falciparum* Growth *in Vitro* ‡*¹

Marlene DURAN-LENGUA 1, Emir SALAS-SARDUY 2, Larissa M. CANO-DURAN 1,
Carlos E. MONERIZ-PRETELL 1, Dario M. MENDEZ-CUADRO 1, Julia LORENZO-RIVERA 3,
Jhoan PIERMATTEY-DITTA1, Joel MONTALVO-ACOSTA1,
Jose M. BAUTISTA-SANTA CRUZ 4 & Ricardo GAITAN IBARRA 1,*

1 Grupo de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Farmacéuticas.
Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias, Colombia.

2 Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo Ugalde"
Instituto Tecnológico Chascomús, UNSAM-CONICET, Campus Miguelete,
Av. 25 de Mayo y Francia, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina.

3 Institut de Biotecnologia i Biomedicina. Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular.
Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Barcelona, Spain.

4 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV,
Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, E28040 Madrid, Spain

SUMMARY. Nine quinone derivatives, three 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone; three 4,5 and three 4,9-naphthoquinone scaffolds, were synthesized and evaluated against 3D7 and Dd2 *Plasmodium falciparum* strains. Quinoid compounds showed half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values in the micromolar range, and moderate toxicity against a human fibroblast cell line. Additionally, the compounds produced morphological changes in the digestive vacuole of treated parasites, similar to those caused by protease inhibitors that block hemoglobin degradation pathway, which is essential for parasite development. 2-hydroxy-3-(1-propenyl)-1,4-naphthoquinone (**1**) showed an IC₅₀ value of 0.068 \square } 0.035 μ M against FP2, a chemotherapeutic target, and thus representing a lead compound for further structure/activity optimization. Taken together, our results suggest that blocking of hemoglobin degradation pathway by inhibiting the cysteine peptidases present in the digestive vacuole, could represent one of the mechanisms used by these compounds to antagonize the growth of malaria parasites.

RESUMEN. Nueve derivados de quinona (tres 2-hidroxil-1,4-naftoquinonas, tres 4,5- y tres 4,9- naftoquinonas), se sintetizaron y evaluaron contra cepas 3D7 y Dd2 de

¹KEY WORDS: Antimalarial agents, Falcipain 2 inhibition, *Plasmodium falciparum*, Quinoid derivatives.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: rigaitan2003@yahoo.es

‡ The present work was done in the framework of the Red CYTED-PROMAL 210RT0398 (Proteómica y Qimiogenómica de Inhibidores de Proteasas de Origen Natural con Potencial Terapéutico en Malaria).

Plasmodium falciparum. Los compuestos quinoides mostraron concentración inhibidora media-maxima (IC50) en el rango micromolar y toxicidad moderada contra una línea celular de fibroblastos humanos. Además, los compuestos produjeron cambios morfológicos en la vacuola digestiva de los parásitos tratados, similares a los causados por inhibidores de la proteasa que bloquea la vía de degradación de la hemoglobina, que es esencial para el desarrollo del parásito. La 2-hidroxi-3-(1-propenil)-1,4-naftoquinona (**1**) mostró un valor de CI50 de 0,068 \square } 0,035 M contra FP2, un blanco quimioterapéutico; representa por lo tanto un compuesto interesante para estudios de relación estructura/actividad. Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que el bloqueo de la vía de degradación de la hemoglobina mediante la inhibición de las peptidasas de cisteína presentes en la vacuola digestiva podría representar uno de los mecanismos utilizados por estos compuestos para antagonizar el crecimiento de los parásitos causantes de la malaria.

INTRODUCTION

Malaria is a prevalent neglected tropical protozoal disease, caused in humans by five species of the genus *Plasmodium*. Despite decades of sustained efforts, it remains a major public health problem in Africa, South America and many parts of Asia ¹, causing every year around 660.000 deaths, more than 219 million new infections and making 3.2 billion persons live at continuous risk of infection ². Due to the lack of an effective vaccine ³, chemotherapy constitutes the only line of defense against malaria. However, the emergence and widespread of drug-resistant strains of *P. falciparum*, the most deadly malaria species ⁴, reduce the effectiveness of current therapy and demand the urgent development of new drugs with novel mechanisms of action ⁵⁻⁷.

Hemoglobin degradation occurs within the digestive vacuole, an acidic and specialized organelle, where the globin component is degraded to small peptides by a complex combination of four aspartic (plasmepsins: Plms), three cysteine (falcipains: FPs) and one metallo (falcilysin) endopeptidases ^{8,9} and the haem group is polymerized to form hemozoin pigments to avoid redox toxicity ¹⁰.

The privileged position of quinones in medicinal chemistry derives from their chemical and structural properties ¹¹. Quinones are both oxidants and potent electrophiles. Consequently, two major mechanisms have been proposed for their cytotoxic action: i) the generation of reactive oxygen species (ROS) after a previous step of one-electron

reduction to form semiquinone radicals; and ii) the reaction with thiol groups and other cellular nucleophiles to form alkylated conjugates, encompassing a large range of crucial biomolecules such as proteins, nucleic acids and glutathione, among others¹²⁻¹⁴. It has been proposed that both mechanisms contribute to the general antiparasitic and cytotoxic activities exerted by naphthoquinones, generating a multitarget profile mediated by both target-specific effects and general free-radical-generation mechanisms¹⁵⁻¹⁷. However, the relative contribution of these two mechanisms is influenced by the nature of the substituents and the characteristics of the quinone nucleus¹⁸, making necessary the analysis of both in case-to-case basis.

In recent years, evidence has been accumulating supporting the role of naphthoquinone derivatives as enzyme inhibitors. Many enzymatic classes seem to be inhibited by these compounds, including phosphatases¹⁹, kinases²⁰, dehydrogenases¹⁵, topoisomerases²¹, DNA polymerases²², ATPases²³, amine oxidases²⁴, ureases²⁵, and proteases belonging to different mechanistic classes such as the proteasome (threonine)²⁶, cruzipain (cysteine) and diverse serine-peptidases²⁷.

In this work we exposed *P. falciparum* cultures to different concentrations of the naphthoquinone derivatives and evaluated their effects on the physiology and morphology of the parasites.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Proteolytic enzymes and *trans*-epoxy succinyl-l-leucylamido-(4 guanidino) butane were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The fluorogenic substrate for cysteine proteases benzyloxycarbonyl-Leucyl-Arginyl-7-amino-4-methyl coumarin (Z-LR-AMC) was obtained from Bachem Bioscience (Bubendorf, Switzerland). All fine chemicals, solvents and media components were obtained from Sigma-Aldrich.

Quinoidales synthetic derivatives

Recently, the group of natural products of the University of Cartagena (Colombia) obtained by chemical synthesis three series of quinone derivatives: a) lapachol analogues (3-alkenyl-2-hydroxyl-1,4-naphthoquinone), b) 4,5-furanonaphthoquinones and c) 4,9-furano-naphthoquinones. The synthesis of these compounds was carried out in two steps using the synthetic pathways previously reported by Hooker²⁸, and

Dudley & Miller ²⁹. The structures of the synthesized compounds are summarized in Table 1.

Antimalarial activity of naphthoquinone derivatives

P. falciparum culture

P. falciparum strains 3D7 and Dd2, sensitive and resistant to Chloroquine, were cultured *in vitro* according to the protocol described by Radfar ^{30,31}. The culture media consisted of standard RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 0.5% ALBUMAX I (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 100 µM hypoxanthine (Sigma-Aldrich), 25 mM HEPES (Sigma Aldrich), 12.5 µg/mL gentamicin (Sigma-Aldrich) and 25 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich). Erythrocytes were obtained from human healthy local donors and collected in Vacuette® tubes with citrate-phosphate-dextrose anticoagulant (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) ³¹.

Antimalarial activity assay

The antiplasmodial activity of the compounds was performed in 96-well tissue culture plates. Several dilutions of compounds (0-100 µM) dissolved in DMSO 0.02%, were placed in micro titer plates, and diluted with culture medium. A suspension (100 µL) of parasitized erythrocytes (1% parasitaemia, 2% hematocrit) containing trophozoites was added to the wells to give a final volume of 200 µL. Chloroquine was used as positive control and uninfected and infected erythrocytes were included as negative controls.

The plates were incubated at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere and observed after 48 h. *Staining and visualization of parasites.*

After incubation, Wright-stained thick blood films were prepared for each well, and the percentage of inhibition of parasite growth was determined under a microscope by comparison of a total of 500 erythrocyte, using the freely available "Cell Count Aid" (<http://www.vicbioinformatics.com/software.autocount.shtml>). The percent of inhibition at each concentration was determined and the reported values are the mean of at least three independent measures. IC₅₀ values of parasite viability were calculated using mathematic log-concentration response analysis using Sigma plot version 12.0.

Cytotoxic evaluation of naphthoquinone derivatives

The cytotoxic effects were evaluated on the human Fibroblast cell line IBR3G, with tetrazolium salts (EZ4U Cell Proliferation Assay) manufactured by (Biomedica Vienna Austria).. The fibroblast cell line was cultured in DEMEM médium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin at 37 °C under 5 % CO₂ atmosphere. After the incubation period, EZ4U reagent was added, and the samples (compounds in DMSO 0.02 %) were incubated for 3 h at 37 °C, and read at wavelength of 490 and 620 nm (reference wavelength). The percentage of viability was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Viability} = [(A_{490} - A_{620})_{\text{SAMPLE}} / (A_{490} - A_{620})_{\text{CONTROL}}] \times 100.$$

Protease inhibition studies

Enzymatic inhibition assays for prototypic peptidases

Protease inhibition assays were conducted *in vitro* using an internally quenched fluorogenic peptide substrate (EnzChek® Protease Assay Kit-E33758; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Protease dilutions (50 µL), with or without quinones at different concentrations, were put into separate wells of a microplate. After the addition of 50 µL of substrate working solution (prepared following manufacturer instructions). The fluorescence intensity was measured (excitation 485 nm, emission 528 nm) using Tecan Infinite 200 spectrofluorometer (Viena Austria). The % inhibition was calculated with the following equation:

$$\% \text{ Residual activity} = 100 \times (\text{Fluorescence}_{\text{SAMPLE}} / \text{Fluorescence}_{\text{CONTROL}})$$

Plots of residual activity, *versus* concentration of inhibitor were used to determine the concentrations that inhibited protease activity by 50% (IC₅₀). The enzymes evaluated, purchased from Sigma-Aldrich, were as follows: subtilisin A (EC 3.4.21.62.) from *Bacillus licheniformis* (serine protease), papain (EC3.4.22.2) from *Carica papaya* (cysteine protease) and thermolysin (EC 3.4.24.27) from *Bacillus thermoproteolyticus rokko* (metalloprotease). Assays were performed in 10 mM Tris-HCl (pH 7.8). Papain dilutions were made from a buffer containing 30 mM L-cysteine.

FP2 enzymatic assay

Recombinant FP2 was expressed as inclusion bodies in BL21(DE3) *E. coli* strain under auto-induction conditions; purified by IMAC under denaturing conditions and refolded to active enzyme as previously described 32. FP2 activity was assayed fluorimetrically with Z-LR-AMC as substrate in 100 mM NaAc, 10 mM DTT, pH 5.5 32. The release of 7-amino-4-methyl coumarin was monitored (excitation 355 nm; emission 460 nm) over 5 min at RT.

Preliminary evaluation of FP2 inhibitory activity of quinone derivatives

All the assays were performed in Greiner (black) 96-well microtiter plates and the fluorescence was recorded in a DTX 880 Multimode Reader Beckman coulter. (Radnor, Pennsylvania USA). FP2 (4.11 nM) was incubated for 5 min in reaction buffer, then the quinoid compounds were added at fixed concentration of 400 μ M, and the mixture was incubated for 10 min at room temperature with orbital agitation. Subsequently, fluorogenic substrate (15 μ M) was added to initiate the reaction. In all cases, the final volume of the reaction mixture was 200 μ L.

The trials were conducted in triplicate, in three independent experiments. Positive controls included *trans*-epoxy succinyl-l-leucylamido-(4 guanidino) butane (E-64) at a concentration of 1 μ M. Negative control corresponding to 100% of the enzyme activity were performed by adding the corresponding amount of solvent. Compounds able to inhibit at least 50% of the FP-2 activity in the initial screening were selected to determine IC50 values.

Estimation of IC50 of selected quinoid compounds

Based on the initial set of screening experiments, five quinoid compounds (**1**, **2**, **3**, **5** and **7**) were selected, for more detailed characterization of their effects on FP2 activity, by a more accurate determination of their IC50 values using an Aminco Bowman Series 2 spectrofluorometer (Thermo Spectronic, Madison, WI, USA). The IC50 values were derived from plots of activity over at least six compound concentrations.

The inhibition of recombinant FP2 was assessed by comparing the hydrolysis of the fluorogenic substrate Z-LR-AMC, the control with inhibitor E64-treated and samples, as described previously^{32,33}. All measurements were performed in triplicate in three

independent experiments. The curve fitting was performed using Graph Pad Prism program (version 5.03). The concentration of the enzyme was determined by titration with different concentrations (0.1-2.5 μM) of E-64 inhibitor, and calculated by lineal regression in the lineal zone of bi-phasic dose-response curve 34,35.

RESULTS AND DISCUSSION

In this paper we evaluate the antiparasitic activity of nine synthetic quinone derivatives against two strains of *P. falciparum*, differing in their cytotoxicity and sensitivity to reference antimalarial drugs (Table 1).

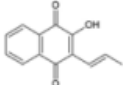
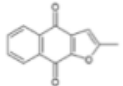
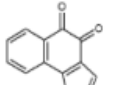
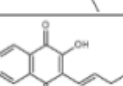
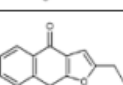
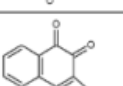
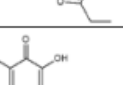
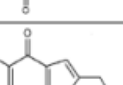
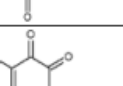
ID	Name	Structure	IBR3G IC50 (μM)
1	2-hydroxy-3-(1-propenyl)-1,4-naphthoquinone		59.7 \pm 1.5
2	2-methyl-1,4-furano naphthoquinone		56.6 \pm 7.8
3	2-methyl-4,5-furano naphthoquinone		5.6 \pm 2.4
4	2-hydroxy-3-(1-butenyl)-1,4-naphthoquinone		76 \pm 1.39
5	2-ethyl-1,4-furano naphthoquinone		9.4 \pm 0.8
6	2-ethyl-4,5-furano naphthoquinone		2.9 \pm 0.9
7	2-hydroxy-3-(1-hexenyl)-1,4-naphthoquinone		5.9 \pm 0.3
8	2-butyl-1,4-furano naphthoquinone		0.83 \pm 0.2
9	2-butyl-4,5-furano naphthoquinone		7.4 \pm 2.6

Table 1. Quinoid compound synthetic evaluated. IC50 in μM of cytotoxicity evaluated in IBR3G. Data shown are the means \pm standard deviation of three independent experiments.

The effect of the synthetic quinone derivatives on the growth of the Dd2 (chloroquine,-resistant) and 3D7 (chloroquine-sensitive) strains of *P. falciparum*, was determined by analyzing the dose-response curves in the micromolar range by using a microfluorometric assay on DNA-stained cultures (Fig. 1). All the compounds showed antiparasitic activity against both *P. falciparum* strains, as indicated by the dose dependent inhibition of parasite growth. In all cases the activity was moderate, with most of the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values in the low-micromolar range (< 10 µM). A clear dependence between the antiparasitic activity and the length of the alkyl substituents was evident.

IC₅₀ were < 1 µM for five compounds against 3D7 and seven compounds against Dd2, also showing acceptable selectivity ratios (> 20) using fibroblast toxicity as reference (Table 1). In general terms, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone derivatives showed the higher selectivity for parasites while 4,9-furanonaphthoquinones seem to be the less selective group of quinoid compounds.

In order to evaluate the morphology of *P. falciparum* digestive vacuole, synchronized infected erythrocytes at mature ring stage (1% parasitaemia) were incubated with naphthoquinone derivatives at different concentrations during one infective cycle (48 h), sampled and examined by thin blood smears. Typically, the untreated culture reached > 10 % parasitaemia and contained predominantly trophozoites at sampling time, indicating that a complete invasive cycle had taken place, producing new trophozoites (Fig. 2). These parasites showed digestive vacuoles with a clear appearance, indicative of a fully active and functional hemoglobin degradation pathway. The cultures treated with the synthetic quinones at concentrations in the µM range, also accumulated trophozoites at the same time (Fig. 2), concomitant with a 50% reduction in parasitaemia as compared to the untreated culture.

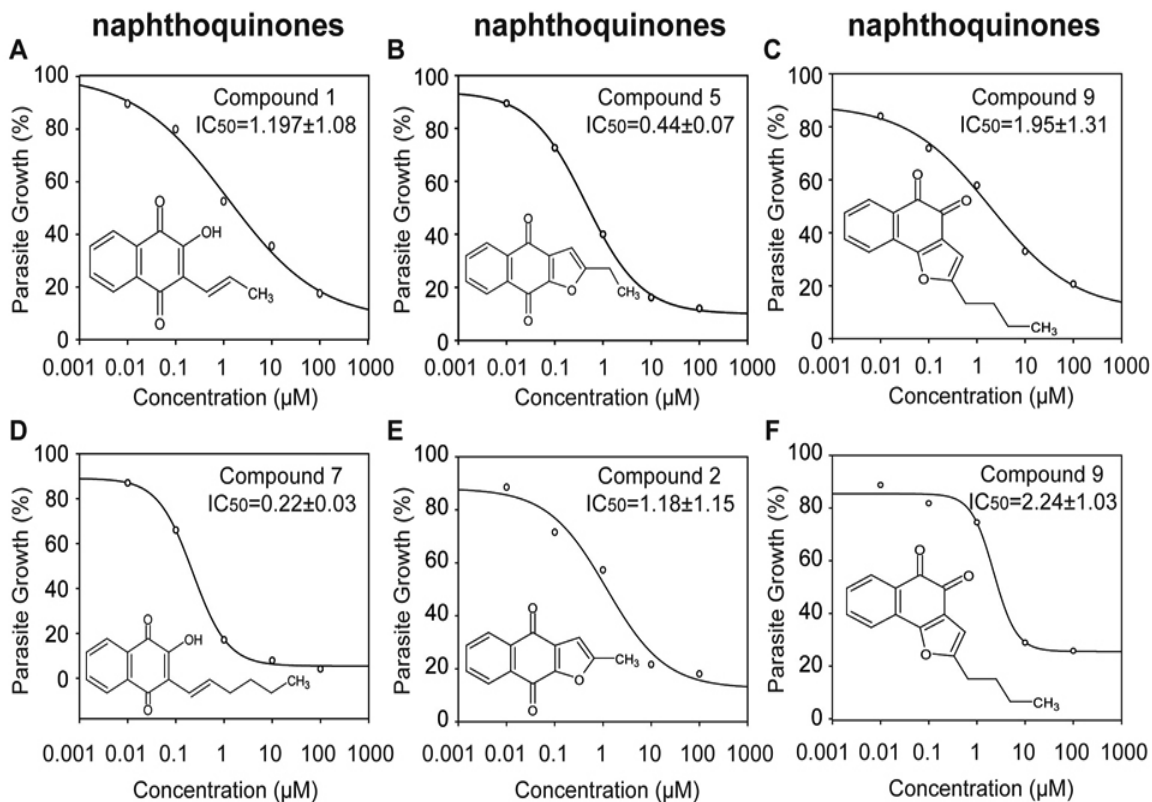


Figure 1. Dose-response curves of naphthoquinone derivatives on *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Only the results of the most active compound of each series against each strain are shown. *P. falciparum* 3D7 (upper panel) and Dd2 (bottom panel) strains were grown in erythrocyte cultures at 1% initial parasitaemia and incubated with different concentrations of the indicated compound. The DNA content was determined at 48 hours by microfluorimetry. The calculated 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values are indicated for each compound. Results are the mean of three independent cultures.

The increase in parasitaemia suggests that the parasite was able to invade new erythrocytes, although at lower rates, and the observed accumulation of trophozoite stage may account for both first and delayed second generation parasites. Quinone concentrations corresponding to 1 x IC₅₀ led to almost complete arrest of parasite growth (typically less than 2% of parasitaemia). At this concentration, parasite population consisted mainly in trophozoites; likely from the previous cycle as suggest the absence of further increase in parasitaemia.

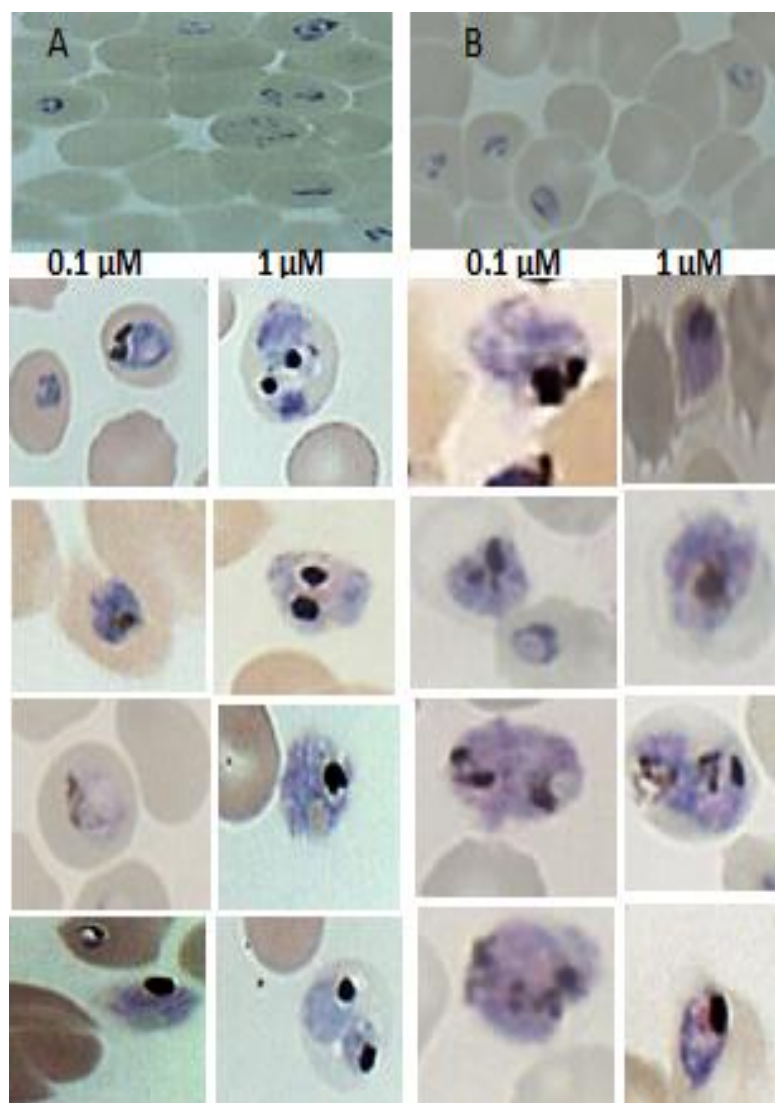


Figure 2. Naphthoquinone derivatives on the morphology of *P. falciparum* digestive vacuole. Only the results of the most active compound against each strain are shown. Synchronized parasite cultures (panel A 3D7; panel B, Dd2) at mature ring stage (22 h, 1% parasitaemia) were incubated for 48 h with the compounds at the indicated concentrations and compared to an untreated control. Cultures were evaluated by microscopic inspection of Wright's-stained thin blood smears.

Interestingly, parasite cultures treated with synthetic quinones at those high concentrations showed digestive vacuoles abnormally swollen and filled with dark staining material, suggesting impairment in hemoglobin degradation pathway (Fig. 2). This phenotype resembles that observed for parasites treated with potent cysteine protease inhibitors such as E-64, leupeptin³⁶⁻³⁹, which lead to a complete blockage of hemoglobin hydrolysis (accumulation of undigested hemoglobin) and the arrest of the parasite development⁴⁰.

Enzyme	Enzyme mU/mL	Quinoid Compounds				
		1	2	4	5	7
papain	20	17.9 ± 1.7	NI	23.3 ± 5.1	5.9 ± 0.81	3.3 ± 1.9
Subtlisin A	0.4	NI	5.3 ± 1.16	NI	30.1 ± 1.28	NI

Table 2. Effect of selected quinoid compound on the activity of prototypic cysteine, serine proteases 20, 0.4 mU/mL correspond to cysteine, serine peptidase detection limit. Values (mean ± SD) were obtained from three independent experiments (n = 3). NI: No inhibition detected.

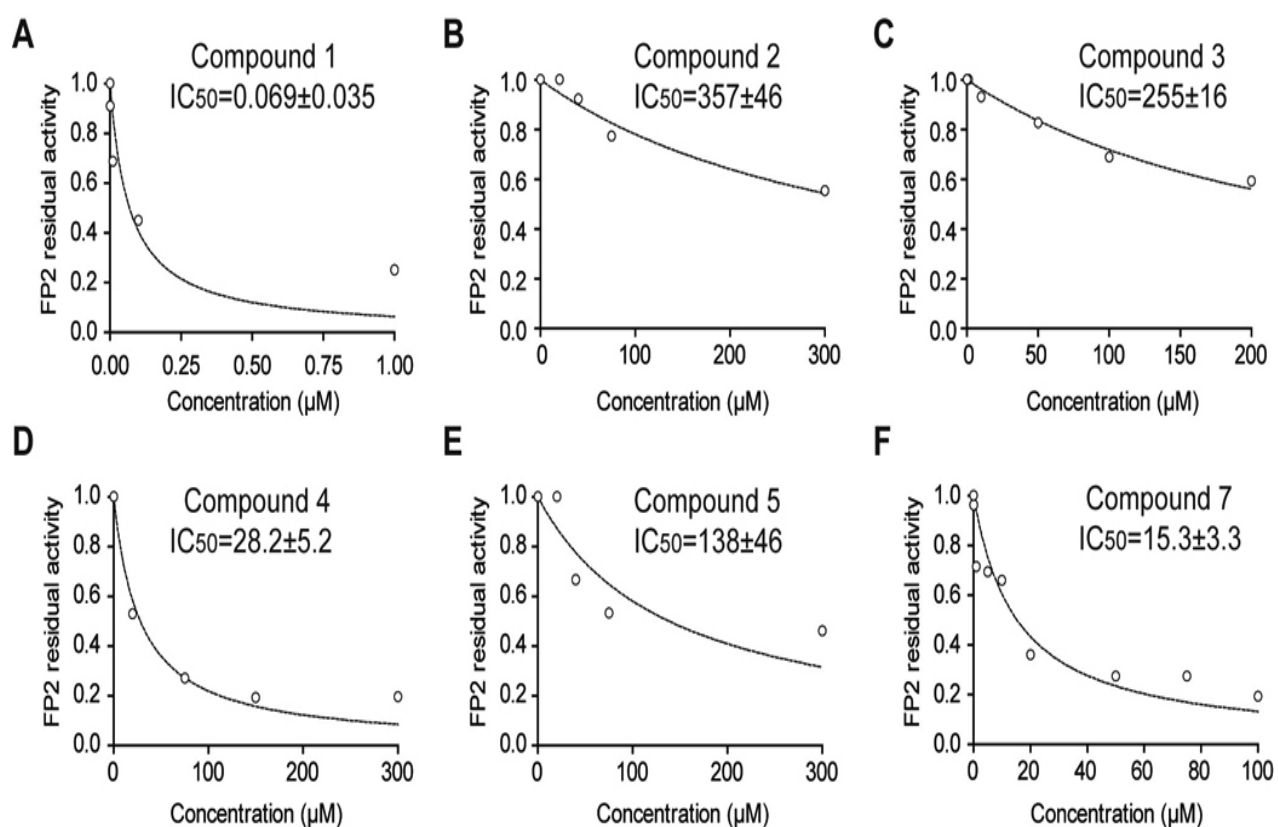


Figure 3. Inhibition of falcipain 2 by selected naphthoquinone derivatives. At least six different concentrations were assayed for each compound. Each point was evaluated in triplicate in two independent experiments. The corresponding IC₅₀ value (mean ± SD) for each compound against FP2 is indicated.

Furthermore, this also suggests that the antiplasmodial activity observed *in vitro* by us for the synthetic naphthoquinones might be due to the inhibition of hydrolytic enzyme(s) occurring within the digestive vacuole. To assess this hypothesis, the most

active compounds against *P.falciparum* were evaluated for inhibition of prototypical proteases of the main mechanistic classes: cysteine and serine, as can be observed in Table 2.

In previous studies (unpublished date), synthetic quinones were mostly active against the cysteine-peptidase papain, (the prototypic enzyme of Clan CA, family C1); lthough compound **2** and **5**, were also active against the serinepeptidase subtilisin A (Clan SB, family S8). In all cases, IC50 values were in the micromolar range, indicating oderate inhibitory activity.

Considering that three papain-like cysteinepeptidases (FP2, FP2' and FP3) are present in the digestive vacuole and no inhibition was observed for metallo-peptidases, we decided to evaluate the effect of these quinoid compounds on the activity of FP2, the major cysteine hemoglobinase of *P. falciparum*^{41,42}. The inhibitory activity of selected quinones was evalated against recombinant FP2 by using a fluorogenic (continuous) enzymatic assay. Increasing concentrations of the selected compounds were initially pre-incubated with enzyme in the reaction buffer; then Z-LR-AMC substrate was added to start the reaction and the experimental slopes used to construct dose-response curves. All tested compounds reduced the enzymatic activity of FP2 control and showed typical dose-response curves (Fig. 3).

The IC50 values ranged from 0.068 μ M (compound 1) to 357.1 μ M (compound 2), confirming that the evaluated quinones are moderate inhibitors of FP2 *in vitro* (Table 3). To the best of our knowledge, this constitutes the first report of the inhibition of FP2 activity by quinone derivatives. This finding is in good agreement with previous reports indicating the micromolar inhibitory activity of 1,4 nahtoquinone derivatives against different parasitic protozoal enzymes 15,43,44.

Quinoid Compounds	IC ₅₀ μ M
1	0,068 \pm 0,035
2	357,1 \pm 46,45
3	255,0 \pm 16,14
4	28,15 \pm 5,16
5	138,6 \pm 46,02
6	> 400
7	15,33 \pm 3,26
8	> 400
9	> 400

Table 3. Inhibition of recombinant FP2 by selected naphthoquinone derivatives. Values (mean \pm SD) were obtained from three independent experiments (n = 3).

Interestingly, also cruzipain, the major papainlike cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*, is inhibited by quinoid compounds in the micromolar range 27. It seems likely that the occurrence of an accessible thiol group in the active site of cysteinepeptidases, acting as the central nucleophile during the catalytic cycle, makes these enzymes particularly susceptible to quinone inhibition.

Although the observed FP2 inhibition is individually modest, their simultaneous activity on other enzymes belonging to the same family cannot be dismissed. There are sixteen papainlike cysteine-peptidases in *P. falciparum* genome and three of them, showing high level of sequence similarities and functional redundancy, occur within the digestive vacuole^{36,45}. The observed morphological abnormalities of naphthoquinone-treated parasites and its impairment to progress through the life cycle after trophozoite stage is compatible with i) a blockade in hemoglobin degradation caused by protease inhibition, ii) the timing of expression for falcipains and iii) the reported anti-parasitic effects of cysteine protease inhibitors^{37,40}.

Regarding the antiparasitic activity, highly potent cysteine-protease inhibitors such as E-64 and leupeptin also displayed only modest activity against 3D7 and Dd2 *P. falciparum* strains, with IC50 values in the low micromolar range^{39, 46,47}. However, a detailed analysis of the two sets of data failed to establish any direct correlation between enzyme inhibition and reduction of *P. falciparum* growth, suggesting that Fp2 inhibition represents just one of the various mechanisms through which quinoid compounds effectively antagonize parasite replication.

Although some of the quinones inhibited falcipains *in vitro* and in parasites, their primary antimalarial mechanism is uncertain. In fact, the subtilysin A inhibitory activity observed by us for some of the naphthoquinones could stand for *in vivo* inhibition of subtilysin-like serinepeptidases such as PfSUB1 y PfSUB2, validated as chemotherapeutic targets and involved in *P.falciparum* egression and infectivity⁴⁸. The existence of diverse molecular targets and several mechanisms of action for these

compounds would be advantageous in different ways for their potential application as antimalarials. First, they could elicit additive or synergistic effects on the parasite physiology, targeting simultaneously different processes and metabolic pathways. Secondly, this multi-target mechanism could greatly reduce the possibility of parasite escape, diminishing the chance of generation of drug resistance 49,50. New experiments must to be performed in order to gain a better understanding of the inhibition mechanisms of falcipains by quinoid derivatives and its relative contribution to the global antimalarial activities of such compounds.

CONCLUSIONS

Our findings showed that naphthoquinonetreated parasites presented morphological abnormalities in the digestive vacuole, suggesting an impaired hemoglobin degradation pathway. Furthermore, we present evidence supporting that quinone derivatives are able to inhibit recombinant FP2 in the micromolar range, suggesting that blockade of hemoglobin degradation (*via* falcipain inhibition) could represent a new target-specific mechanism additional, for antiplasmodial activity of naphthoquinones derivatives.

Acknowledgements. The authors wish to thank to Ibero-American Program for Science and Technology Development (CYTED), for the financial support, and to Dr. Juan José Cazzulo, Instituto Tecnológico de Chascomús & Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo Ugalde", UNSAM-CONICET, Buenos Aires, Argentina, for the evaluation of falcipain 2 inhibitory activity

REFERENCES

1. Ettari, R., F. Bova, M. Zappalà, S. Grasso & N. Micale (2010) *Med. Res. Rev.* **30**: 136-67.
2. Crowther, G.J., A.J. Napuli, J.H. Gilligan, K. Gagaring, R. Borboa, C. Francek, *et al.* (2011) *Mol. Biochem. Parasitol.* **175**: 21-9.
3. Schwartz, L., G.V. Brown, B. Genton & V.S. Moorthy (2012) *Malaria J.* **11**: 11.
4. Fear, G., S. Komarnytsky & I. Raskin (2007) *Pharmacol. Ther.* **113**: 354-68.
5. Mita, T., K. Tanabe & K. Kita (2009) *Parasitol. Int.* **58**: 201-9.

6. Sanchez, C.P., A. Dave, W.D. Stein & M. Lanzer (2010) *Int. J. Parasitol.* **40**: 1109-18.
7. Dominguez, J.N. (2002) *Curr. Top. Med. Chem.* **2**: 1173-85.
8. Kolakovich, K.A., I.Y. Gluzman, K.L. Duffin & D.E. Goldberg (1997) *Mol. Biochem. Parasitol.* **87**: 123-35.
9. Rosenthal, P.J. (2004) *Int. J. Parasitol.* **34**: 1489-99.
10. Wunderlich, J., P. Rohrbach & J.P. Dalton (2012) *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*. **4**: 1424-48.
11. Costantino, L. & D. Barlocco (2006) *Curr. Med. Chem.* **13**: 65-85.
12. Pinto, A.V. & S.L. de Castro. (2009) *Molecules* **14**: 4570-90.
13. Castro, F.A., D. Mariani, A.D. Panek, E.C. Eleutherio & M.D. Pereira (2008) *PLoS One*. **3**(12): e3999.
14. Bolton, J.L., M.A. Trush, T.M. Penning, G. Dryhurst & T.J. Monks (2000) *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 135-60.
15. Pieretti, S., J.R. Haanstra, M. Mazet, R. Perozzo, C. Bergamini, F. Prati, et al. (2013) *PLoS Neglect. Trop. Dis.* **7**: e2012.
16. Monks, T.J., R.P. Hanzlik, G.M. Cohen, D. Ross & D.G. Graham (1992) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **112**: 2-16.
17. Wu, H.Q., Z.S. Huang, X.Z. Bu, Y.D. Shen, Z.L. Zhang, B.F. Xie, et al. (2005) *Eur. J. Med. Chem.* **40**: 1341-5.
18. Monks, T.J. & D.C. Jones (2002) *Curr. Drug Metab.* **3**: 425-38.
19. Pahwa, P. & M. Papreja (2012) *Acta Pol. Pharm.* **69**: 535-43.
20. Cao, S., B.T. Murphy, C. Foster, J.S. Lazo & D.G. Kingston (2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 2276-81.
21. Neves, A.P., M.X. Pereira, E.J. Peterson, R. Kipping, M.D. Vargas, F.P. Silva-Jr., et al. (2013) *J. Inorg. Biochem.* **119**: 54-64.
22. Kobayashi, K., S. Nishiumi, M. Nishida, M. Hirai, T. Azuma, H. Yoshida, et al. (2011) *Med. Chem.* **7**: 37-44.
23. Bedford, R., D. LePage, R. Hoffmann, S. Kennedy, T. Gutschenritter, L. Bull, et al. (2012) *J. Photochem. Photobiol. B.* **107**: 55-64.
24. Coelho Cerqueira, E., P.A. Netz, C. Diniz, V. Petry do Canto & C. Follmer (2011) *Bioorg. Med. Chem.* **19**: 7416-24.
25. Kot, M., W. Karcz, W. Zaborska (2010) *Bioorg. Chem.* **38**: 132-7.
26. Xu, K., Z. Xiao, Y.B. Tang, L. Huang, C.H. Chen, E. Ohkoshi, et al. (2012) *Bioorg Med. Chem. Lett.* **22**: 2772-4.

27. Bourguignon, S.C., D.F. Cavalcanti, A.M. de Souza, H.C. Castro, C.R. Rodrigues, M.G. Albuquerque, et al. (2011) *Exp. Parasitol.* **127**: 160-6.

ANEXO 3.

A FAMILY OF COMPOUNDS BASED ON ALKYL SUBSTITUTED SYNTHETIC QUINONES OXIDIZE MEMBRANE PROTEIN AND ARREST PLASMODIUM FALCIPARUM GROWTH IN VITRO.

Durán-Lengua M,^{1,3,4} Kamali AN³, Cano A⁴, Moneriz C,^{1,3,4} Méndez D,^{1,3} Piermattey J,¹ Reyes N⁴, Bautista J.M³ and Gaitán R.^{1,3}
Durán Marlene Professor Faculty of Medicine, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia. mduranl@unicartagena.edu.co

1. Grupo de Productos Naturales, Facultad de Ciencias farmacéuticas. Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias Colombia.
2. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, E28040 Madrid, Spain.
3. Red CYTED-PROMAL (210RT0398): Proteómica y Quimiogenómica de Inhibidores de Proteasas de Origen Natural con Potencial Terapéutico en Malaria. Universidad Nacional de la Plata, La Plata. Argentina.
4. Facultad de Medicina Universidad de Cartagena. Cartagena de Indias Colombia

ABSTRACT. Quinones are a family of bioactive compounds with known antibacterial, antiviral and antiparasitic activity. The capacity of quinoid compounds to accept electrons, due to electron-attracting (or donating) substituents at the Quinone moiety, modulates their redox activity upon interaction with biological systems. Nine Quinone derivate including three 2 –hydroxyl–1,4–naphthoquinone; three 4,5 – and three 4,9 – naphthoquinone scaffolds, were synthesized and evaluated against 3D7 and Dd2 *Plasmodium falciparum* strains. Cell viability was determined MTT-related colorimetric assay (EZ4U; Biomedica, Austria). Selectivity of these compounds was evaluated by comparing *in vitro*, of cytotoxicity in human fibroblast and antimalarial activity in *Plasmodium falciparum*. Peripheral blood mononuclear cells and hemoglobin release from human erythrocytes were evaluated too. In addition, oxidized membrane protein in the malaria parasite and human erythrocyte was evaluated in vitro, after treatment at IC₅₀ values on *P.*

falciparum Dd2 strain. Quinoid compounds showed IC₅₀ values in the micromole range.

Keywords: Plasmodium, Malaria, Public health, drug resistance.

1. INTRODUCTION: Around one-half of the world population lives in regions with a high risk of malaria which leads to about 250 million cases of malaria each year (Crowther, Napuli et al. 2011). The malaria parasite infects millions of people and causes more than one million deaths annually, predominantly in sub-Saharan Africa and Asia. *Plasmodium falciparum* is mainly responsible for deaths from malaria caused mostly by drug-resistant strains (Agbor-Enoh, Seudieu et al. 2009). Knowledge on the mechanism of action of the antimalarial drugs and its potential parasite targets, are fundamental on designing new drugs (Olliaro 2001). Quinones are a variety of bioactive compounds which have shown antibacterial, antiviral and antiparasitic activity (Kanokmedhakul, Kanokmedhakul et al. 2005). Gaitán et al, recently reported several antiparasitic with antimalarial activity (Gaitán Ibarra, Arguello et al. 2007). Current antimalarial therapy uses atovaquone, (El Hage, Ane et al. 2009) compound having in its structure quinoid system, which is present also in anti-cancer drugs, antibacterial (Lengua, Ibarra et al. 2013).

Oxidative stress is responsible for physicochemical changes on erythrocyte membrane during plasmodium infection (Das and Nanda 1999), and is related to pathology and parasite clearance from circulation (Legorreta-Herrera, Retana-Ugalde et al. 2010). The malaria parasite is vulnerable to oxidative stress, during intra- erythrocytic stages (Becker, Tilley et al. 2004). Disease conditions as sickles cells, thalassemia and glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency; characterized by a spectrum of abnormalities in the membrane as poor deformability and disturbance in the homeostatic equilibrium (Advani, Rubin et al. 1992).

Altered redox state oxidized thiols, alteration in membranes lipids, presence hemicromos and clusters of band 3. These alterations induce a protective effect against malaria (Akide-Ndunge, Tambini et al. 2009). In this work, we propose that oxidation of parasite proteins and the erythrocyte membrane provided as mechanism, contributes to an antimalarial effect.

2. METHODOLOGY

2.1 Chemical part

All the reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC). Solvents and reagents were obtained from MERCK. Melting points of synthetic compounds were determined on a Fischer-Johns apparatus and are uncorrected. H^1 , C^{13} Nuclear Magnetic Resonance spectrums were obtained with BRUKER equipment of 400 MHz using deuterated chloroform $CDCl_3$ as a solvent and tetramethylsilane (TMS) as an internal reference standard. The mass spectrums were taken in Agilent GC-MS: HP 6990 Capillary GC and HP 5973 Mass Selective Detector. The Infra-red (IR) spectrums were analyzed in a MADZU FT-IR 1700 spectrometer. Compounds were purified by crystallization in ethanol/water, and for linear furanonaphthoquinones were necessary to use preparative TLC to obtain pure crystals.

2.1.1 Synthesis

The synthesis of 4,5 and 4,9-furanonaphthoquinone was carried out in two steps using the synthetic pathways previously reported by Hooker (Hooker 1936), and Dudley and Miller (Dudley and Miller 1967). The first step consisted on nucleophilic addition using 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone and an aldehyde (propionaldehyde, butanaldehyde, or hexanaldehyde) dissolved in acetic acid at $60^\circ C$, which produced an intermediary compound (2-hydroxy-3-alkenyl-1,4-naphthoquinone) specific for each aldehyde used. Table 1.

Table 1. Details of the synthesis steps.

REAGENT		STEP 1		REAGENT		STEP 2	
Aldehyde	Lawsone (1)	Time(min)	Intermediary	Hg(OAc) ₂ /HOAc	1.HCl 2N/ EtOH 2.HCl 12N/ EtOH	Time(min)	Final Product
Propanal 7 mL	2 g	90 min	2-hydroxy-3-[prop-1-en-yl]-1,4-naphthoquinone (2) 61.5%	5,95 g/ 50 mL	2	120	2-methylnaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (3) 51.3%
					1	15	2-methylnaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (4) 42.3%
Butanal 7 mL	2 g	75 min	2-hydroxy-3-[but-1-en-yl]-1,4-naphthoquinone (5) 67.5%	5,58 g/ 50 mL	2	120	2-ethylnaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (6) 72.3%
					1	15	2-ethylnaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (7) 65.6%
Hexanal 10 mL	2 g	40 min	2-hydroxy-3-[hex-1-en-yl]-1,4-naphthoquinone (8) 60.1%	4,9736 g/ 50 mL	2	120	2-butylnaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (9) 69.2%
					1	15	2-butylnaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (10) 62.7%

The second step was the oxidative cyclization of the intermediary compound obtained in the previous step. In this case, the intermediary was mixed into a solution of mercuric acetate in acetic acid, keeping a molar ratio 1:2 between the intermediary and mercuric acetate. The mixture was heated to 65°C and immediately cooled at room temperature. After solvent evaporation and subsequent extraction with ethyl ether, the solute was dissolved in ethanol and treated with hydrochloric acid at 65°C. When a diluted hydrochloric acid was used and heated for 15 min red crystals of 2-alkyl-4,5-furanonaphthoquinones were yield (Miguel del Corral, Castro et al. 2006). On the other hand, when a concentrated hydrochloric acid was used and heated for 2 h, yellow crystals of 2-alkyl-4,9-furanonaphthoquinones were produced. Figure 1 illustrates the general scheme of the synthesis. (Spectroscopic data in supplementary material)

A family of compounds based on alkyl substituted synthetic Quinones oxidize membrane protein and arrest *Plasmodium falciparum* growth in vitro.)

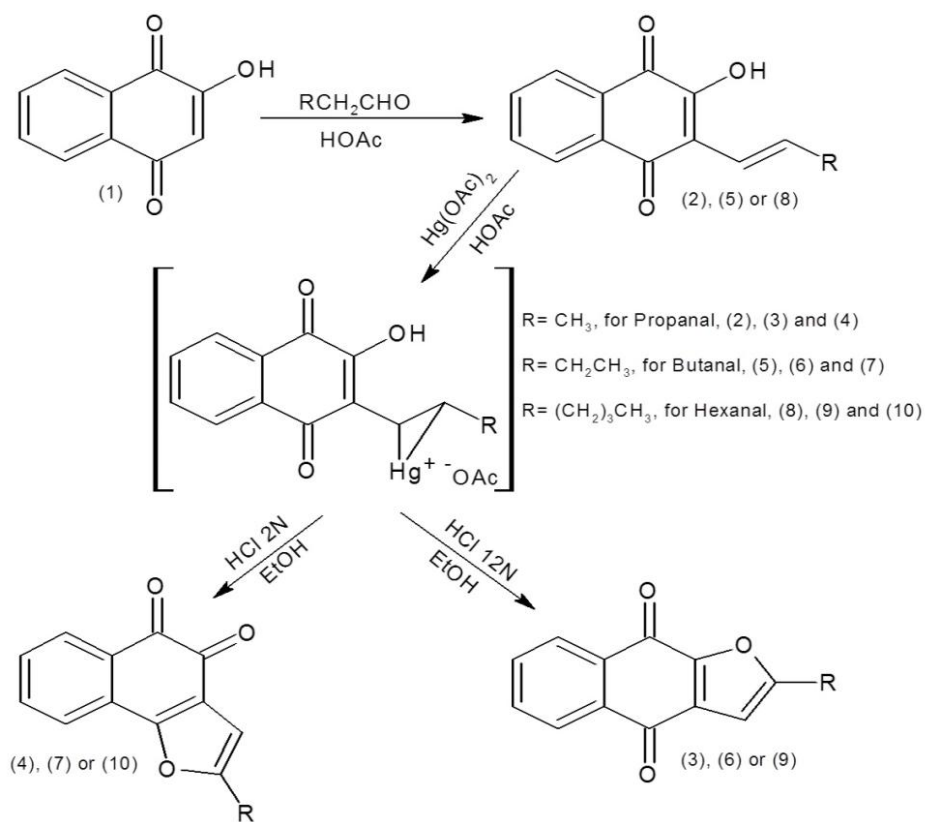


Figure 1. General synthesis of 4,5 and 4,9-furanonaphthoquinones

2.2 Biological assays

2.2.1. Cytotoxic evaluation of Quinone derivatives

The cytotoxic effect of 4,5 and 4,9-furanonaphthoquinone derivate Table 2. were tested on the IBR 3G fibroblast cell line and measured using tetrazolium salts EZ4U kit (Biomedica-Austria) (Perabo, Frossler et al. 2006) was used to determine cell growth and viability, according to the manufacturer's instructions. In order to determine IC_{50} (concentration that kills 50 % of cells), the cells were treated with quinoid compounds in serial dilutions (0.01-100 μM). The viability of cells was analyzed after 24 h of treatment, the percentage of cell viability for each compound was calculated using the following equation: % viability = $[(\text{A}_{490} - \text{A}_{620}) \text{ sample} / (\text{A}_{490} - \text{A}_{620}) \text{ control}] \times 100$

The method was based on the fact that living cells are capable of reducing less colored tetrazolium salts into intensely colored formazan derivatives. This reduction process requires functional mitochondria, which are inactivated within a few minutes after cell death.

2.2.2 Cell viability of peripheral blood mononuclear cells

Cell viability of peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) was evaluated by tripan blue dye exclusion (Conkling, Greenberg et al. 1988). Heparinized blood (from healthy and non-smoker donors) was collected and peripheral blood lymphocytes were isolated by differential centrifugation in a Ficoll density gradient, following standard procedures (Martínez, Reyes et al. 2007). Then, PMBCs were washed and re-suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U mL⁻¹ penicillin, 100 µg mL⁻¹ streptomycin at 37°C under 5% CO₂, and subsequently exposed to IC₅₀ concentrations of quinones for 24 y 48 hours, and monitored with tripan blue dye exclusion (Huang, Wu et al. 2005). The selectivity of the compounds was evaluated by selectivity index, which is obtained by the ratio of the IC₅₀ value in the fibroblast growth inhibition and the IC₅₀ value antimalarial activity (SI = CC₅₀/IC₅₀) (Cos, Vlietinck et al. 2006)

SI: Selectivity index, CC₅₀: Cytotoxic Concentration 50, IC₅₀: Inhibitory concentration 50.

2.2.3 Red blood cell hemolysis assay

Hemolytic activity of Quinone derivatives was evaluated by hemoglobin release, from red blood cells (RBC) (Krugliak and Ginsburg 2006). Freshly human isolated RBCs were seeded into 96-well microtiter plates at a plating density of 1×10⁶ cells/well in complete RPMI medium and incubated either in the presence of DMSO 0,2 % (negative control), IC₅₀ concentrations of compounds for 24h at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. After incubation, RBCs were pelleted by centrifugation at 10,000 rpm for 15 minutes and finally optical density (O.D) was measured in supernatant at 540 nm (Goyal, Singh et al. 2012). Experiments were performed in

triplicates; positive control was performed with saponin in PBS 0.2%. Percentage hemoglobin release was calculated using the following equation: % hemolysis = (Abs sample/ Abs control) x 100

2.2.4 Culture of *Plasmodium falciparum*

Two strains, Dd2 (clone MRA-150) resistant to chloroquine, and 3D7 (clone MRA-102) sensitive to chloroquine were cultured following protocols described previously (Radfar, Diez et al. 2008, Moneriz, Marin-Garcia et al. 2011). Briefly, *P. falciparum* strains were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 25 mM HEPES(Sigma-Aldrich) Albumax I 0.5% (Gibco) 100 µM hypoxanthine (Sigma-Aldrich), gentamicin 12.5mg/mL and sodium bicarbonate 1.77 mM (Sigma-Aldrich). Cultures were initiated by mixing infected and uninfected erythrocytes to achieve a hematocrit of 2% and parasitaemia of 1%, and incubated at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. The progress of growth in the culture was determined by microscopy in thin blood smears (Proudfoot, Drew et al. 2008). A detailed description of the culture and synchronization methods used can be obtained from Radfar et al, 2009 (Radfar, Méndez et al. 2009).

2.2.5 Antimalarial activity assay

A PicoGreen ® microfluorimetric DNA-based assay (Molecular Probes™ Invitrogen) was used for the monitorization of parasite growth inhibition on *P. falciparum* Dd2 and 3D7 strains (Moneriz, Marín-García et al. 2009) at different quinone derivatives concentrations, red blood cells (iRBCs) synchronized at ring stages as it was described previously (Radfar, Méndez et al. 2009), were used to test 0.01 - 100µM serial dilutions of quinone derivatives diluted in culture medium in 96-well culture microplates. Thus, 100 µl of iRBC at 1% parasitaemia and 2% hematocrit were allowed to grow for 48 h in 5% CO₂ at 37°C. Experiments were performed in triplicates. After this incubation, parasites were centrifuged at 600 x g for 10 min and subsequently suspended in saponin 0.15% (w/v) prepared in PBS to lyse the erythrocytes and release the *Plasmodium* parasites. The pellet was washed as described (Moneriz, Marín-García et al. 2009) and finally Pico Green

diluted in tris-EDTA buffer was added to each well. The plates were incubated in the dark and stirred for 45 min. The fluorescence intensity was determined at 485 nm excitation and 528 nm emission in spectrophotometer Perkin Elmer LS-50B. The growth inhibition was calculated as it was previously described (Moneriz, Marín-García et al. 2009) using the following equation: % GP= (Fp-Fcn) / (Fcp-Fcn) x 100

GP: parasitized erythrocytes; Fcn: negative control fluorescence; Fp parasitized sample treated fluorescence; Fcp: positive control fluorescence.

The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by non-linear regression, plotting quinone derivative concentration against the corresponding percentage (%) of growth inhibition. All measurements were performed in triplicate from two independent experiments. The curve fitting was performed using Sigmaplot© 12, from Systat Software, Inc.

2.2.7 Evaluation of oxidative stress:

Membrane proteins from infected and non-infected erythrocytes treated with IC₅₀ of quinoid compounds, were extracted according a protocol described previously (Radfar, Diez et al. 2008, Méndez, Hernáez et al. 2012).

2.2.7.1 *P. Falciparum* protein extracts

Total proteins from Dd2 parasite extracts were obtained from synchronized ring stage and incubated for 24 h at IC₅₀ concentrations of quinone derivatives, as previously described (Moneriz, Marín-García et al. 2011), and quantified by Bradford method.

2.2.7.2 Derivatization, electrophoresis and immunoblotting.

Samples dissolved in sodium dodecyl sulfate 6% (SDS) were derivatized by addition of 20 mM 2,4-dinitrophenylhydrazones (DNPH) in 10% trifluoroacetic acid (TFA) as previously described (Levine, Williams et al. 1994). Two micrograms of

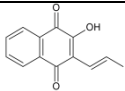
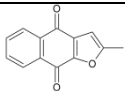
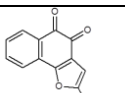
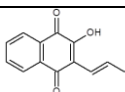
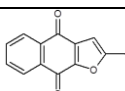
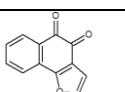
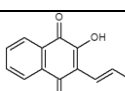
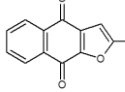
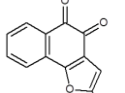
DNPH-derivatized proteins were electrophoresed by 10% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF-Amersham Biosciences), using a Bio-Rad transfer apparatus (1 mA/cm² of gel) following reported protocols (Méndez, Hernáez et al. 2012).

PVDF membranes were blocked for 1 h at room temperature with 10% non-fat dry milk in PBS. Blocked membranes were incubated with rabbit polyclonal anti-2,4-dinitrophenylhydrazone antibody 1:4000 (Anti-DNPH SIGMA, 1.0–1.7 mg mL⁻¹ of specific antibody) in PBS containing 0.05% Tween 20 and 10% milk for 2 h at room temperature with gentle rocking, and then incubated with anti-rabbit IgG antibody 1:5000 (Amersham Biosciences) for 2 h at room temperature, and exposure to X-ray film.

3. RESULTS AND DISCUSSION: The nucleophilic addition between 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone and the corresponding aldehydes, gave the intermediaries 2-hydroxy-3-alkenyl-1,4-naphthoquinone, with yields higher than 60%. Intermediaries oxidative cyclization and subsequent heating in the presence of diluted hydrochloric acid yielded angular isomers 4, 7 and 10, as orange needles with melting points that corresponded with those reported for each compound, 124, 136 and 64°C respectively; but when the heating is performed with concentrated hydrochloric acid for longer time, yellow needles were obtained with melting points 174, 143 and 104°C. Spectroscopic analysis was further evidence to obtaining linear isomer 3, 6 and 9, respectively. The overall yield for each furanonaphthoquinone was between 30 to 50%, only the analog 4 was obtained with a yield lower with 21.6%. In all cases the angular isomer yielded was lower than linear Table 1.

3.1. Assay of toxicity. In mononuclear cells the viability at 48 h of incubation was > 80%. Hemolysis was lower than 35%. *Table 2.*

Table 2. Quinoid compound synthetic evaluated in vitro antimalarial activity. Intermediary compounds 2, 5 and 8. Final compounds 3, 6 and 9 lineal furanonaphthoquinones and 4, 7 and 10, angular furanonaphthoquinones and IC_{50} in μM of cytotoxicity evaluated in IBR3G cytotoxicity of quinones evaluated mononuclear cells and erythrocytes of peripheral blood. Data shown are the means \pm standard deviation of 3 independent experiments.

ID	Structure	IBR3G IC_{50} (μM)	Mononuclear % Viability	Erythrocytes % Hemolysis
2		59.7 \pm 1.5	93.3 \pm 1.51	23.4 \pm 4.5
3		56.6 \pm 7.8	92.3 \pm 0.72	21.4 \pm 1.0
4		5.6 \pm 2.4	94.0 \pm 1.0	21.4 \pm 1.7
5		76 \pm 1.39	93.7 \pm 0.64	22.8 \pm 5.8
6		9.4 \pm 0.8	94.0 \pm 1.52	24.6 \pm 2.3
7		2.9 \pm 0.9	93.0 \pm 2.06	29.9 \pm 1.5
8		5.9 \pm 0.3	93.3 \pm 2.06	18.6 \pm 0.6
9		0.83 \pm 0.2	81.7 \pm 3.0	23.6 \pm 0.6
10		7.4 \pm 2.6	93.0 \pm 0.0	35.0 \pm 1.2
Average \pm SD				
SD: standard deviation				

Chloroquine-sensitive (3D7) and chloroquine-resistant strains (Dd2) of *P. falciparum* were sensitive to tested quinones, which was in a range of 0.2- 3 μ M; the highest antimalarial activity that was shown by compound 8 with IC₅₀ of 0.22 and 2.4 μ M for Dd2 and 3D7 strain respectively, follow by compounds 3, 2, 5, and 6 for both strain. The low IC₅₀ was observed with compounds 4, 7, 9, and 10, minors of 3 μ M, are related with cytotoxicity.

Table 3. Antimalarial activity by fluorometry in Dd2 and 3D7 strain of *Plasmodium falciparum*, expressed as IC₅₀, and indexes of selectivity.

Compounds	Dd2 IC ₅₀ (μ M)	3D7 IC ₅₀ (μ M)	SI Dd2	SI 3D7
2	1.6 \pm 0.06	1.2 \pm 1.0	37.3	49.7
3	1.2 \pm 1.1	1.5 \pm 1.4	47.2	37.7
4	3.1 \pm 1.4	3.3 \pm 0.3	1.8	1.9
5	4.0 \pm 1.5	2.3 \pm 0.6	19.0	33.0
6	1.8 \pm 1.5	0.4 \pm 0.06	5.3	23.5
7	11.3 \pm 1.2	2.1 \pm 0.1	0.25	1.4
8	0.22 \pm 0.02	2.4 \pm 1.2	26.8	2.45
9	3.4 \pm 2.2	3.8 \pm 0.3	0.24	0.22
10	2.2 \pm 1.0	1.9 \pm 1.3	3.4	3.9

The present study demonstrates that quinoid compound promotes protein carbonylation in membrane of *Plasmodium falciparum* and erythrocyte. Strong oxidation was observed on isolated parasite's proteins (25 - 250 kDa) compared with the untreated control (line 4-C). Figure 2A. With respect to oxidation in membrane proteins of parasitized and non-parasitized erythrocyte the oxidation was widespread in both membranes. Fig 2 B-C. Thus, their antiplasmodial effect seems to be related to generalize oxidative membrane protein. Figure 2.

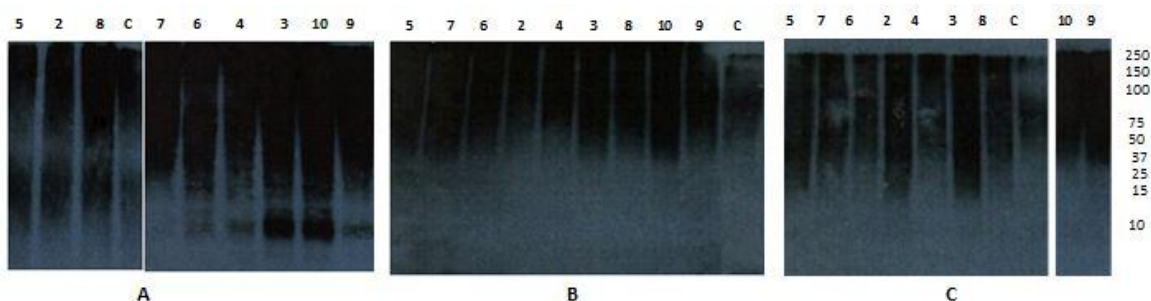


Figure 2. Quinones synthetic 2-Hidroxy 1,4 naphthoquinones (2, 5 and 8). 4,5 furanonaphthoquinones(3, 6 and 9). 4,9 furanonaphthoquinones (4, 7 y 10). A. Quinoid compounds induces protein carbonylation in culture of *P. falciparum* Dd2 strain. B. Quinoid compounds induce protein carbonylation from non-parasitized erythrocytes. C. carbonylation in membrane proteins from parasitized erythrocyte treated with IC₅₀ of compounds. C: control untreated.

There was a correlation between oxidative patrons, and IC₅₀ values. Oxidation pattern of carbonylated proteins from treated parasites with compounds that showed the higher IC₅₀ extended from 15 until 250 kDa, compared to the compounds showing the lower inhibition of growth of the parasite, which was (37-250 kDa) to the culture with no treatment. Figure 3B. The synthetic quinones showed different degrees of activity against two strains of *P. falciparum*. Compounds evaluated using strain Dd2 showed antimalarial activity with IC₅₀ between 0.22 and 4.1 μM, the compound 8 showed lowest IC₅₀.

3D7 strain showed the greatest sensitivity to the compounds tested, with the highest IC₅₀ around 3,5 μM. Compounds 2, 3, 6, showed selectivity greater than 10. Selectivity index is a value that determines the selectivity of a chemical compound with respect to series of biological test. (Cos, Vlietinck et al. 2006, Fernández-Calienes Valdés, Mendiola Martínez et al. 2011). The compounds 2, 3, 5 and 8, were considered the more selective; the SI was 20 - 50. The other compounds tested with IC₅₀ between 1 and 4 μM (7, 9, and 10) are considered compound lower selectivity. All tested compounds had antimalarial activity in both strain, being the most active compounds 2, 3, 6 showing IC₅₀ between (0.2-3.0 μM).

The research realized by Onegi, with anthraquinones and naphthoquinones showed antimalarial activity *in vitro*, this study reveals an important aspect of the activity from the antimalarial compounds related to oxidative stress (Onegi, Kraft et al. 2002). Study performed with other quinones (lapachol), showed *in vivo* and *in vitro* antimalarial activity (de Andrade-Neto, Goulart et al. 2004). In this study the parasites resistant to chloroquine were more susceptible to the active quinoid compounds *in vitro*, these results are consistent with what was shown by de Andrade Neto in 2004, with similar compounds.

This work is evidence that oxidative stress, may contribute to the antimalarial activity as shown by increased carbonylated proteins (Figure 2). When treated with the IC_{50} of the compounds, the oxidative pattern showed by membrane proteins from parasitized erythrocytes and non-parasitized showed general oxidation. For parasitized erythrocytes it extended from 25 to 250 kDa in proteins membrane from. While for membrane proteins non parasitized erythrocytes the oxidation extended from 75 to 250 kDa.

Distinct mechanisms that confers protection against severe and complicated malaria have been proposed for the different hemoglobinopathies such as sickle-cell trait, beta thalassemia trait (López, Saravia et al. 2010), enzymeopathies as deficiency Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (Cappellini and Fiorelli 2008). It has also been shown that hemoglobin S erythrocytes infected by *P. falciparum* lower the surface expression of PfEMP-1, which results in a reduction of cytoadherence and thus protection against severe malaria (Cholera, Brittain et al. 2008). G6PD deficiency is common in *Plasmodium falciparum* malaria is endemic provides evidence that G6PD deficiency confers resistance against malaria (Ruwende and Hill 1998). Mendez et al evaluated oxidative changes in parasitized erythrocyte membrane proteins in patients with G6PD deficiency, confirming oxidation patterns in protein of membrane erythrocytes of normal people, showed a wide range of bands between 100 and 250 kDa, while in protein of membrane of individuals with G6PD deficiency shows an oxidative pattern of band between 37

and 50 kDa (Méndez, Linares et al. 2011). In this work, oxidation patterns of the compounds tested, shows oxidation of membrane proteins of parasitized erythrocytes up to 25kDa, for those compounds with greater antimalarial activity.

The malaria parasite is very susceptible to oxidative stress during intraerythrocytic stages (Becker, Tilley et al. 2004). The possibilities around the observed increase in oxidative for these compounds is very significant because it shows that redox metabolism represents an excellent target for future antimalarial drug development (Legorreta-Herrera, Retana-Ugalde et al. 2010). Certainly some antimalarial agents, such as chloroquine, artemisinins, antimalarial peroxides, anthraquinones and xanthenes act in part by increasing the oxidative stress in infected red blood cells, morphologic changes, hemoglobin accumulation (Fitch 2004). impairment of membrane function (Dutta and Fitch 1983), peroxidation of lipids (Sugioka and Suzuki 1991), other ways of oxidative stress include inhibition of key redox regulatory proteins such as glutathione, thioredoxin and glutathione reductase, peroxidase peroxiredoxin, and superoxide reductase (Goyal, Alam et al. 2012)

The compounds evaluated in this study, act as oxidants agents, which oxidized the parasite proteins, protein membrane erythrocyte. Other compounds may work by inhibiting the parasite's antioxidant defense systems by acting on specific targets, such as glutathione reductase (Buchholz, Schirmer et al. 2008). A series of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones showed high antimalarial activity in patients infected with *Plasmodium vivax*, which are not used by the high doses required to get pharmacological effect (Hudson, Randall et al. 1985). Some naphthoquinones such as benzylisoquinoline 5-10-dione when isolated from rubiaceae and then tested in *Plasmodium falciparum* are showing an IC₅₀ of 0.84 µg/mL, which was associated to a high cytotoxicity(Kayser, Kiderlen et al. 2003).

Quinoid compounds as 1,4 naphthoquinones are inhibitors of glutathione reductase (GR) (Buchholz, Schirmer et al. 2008, Feng, Guantai et al. 2011), the enzyme responsible for regenerating the reduced form of glutathione, a major (di) thiol

responsible for the prevention of oxidative damage in both human cells and the malaria parasite (Atamna and Ginsburg 1995). The compounds tested may exert inhibition of GR, and oxidative stress, therefore the oxidation caused in the membrane proteins from both erythrocytes and parasite may also be caused through (GR) inhibition. There is a proof that the host red blood cells are exposed to oxidative stress during malaria infection (Goyal, Singh et al. 2012). It is also considered that the reactive oxygen species indirectly inhibit parasites growth in some host erythrocyte variants in which antioxidant protection is inefficient (Stocker, Hunt et al. 1985).

Erythrocyte membrane deformability may also be affected by protein cross links that can develop in the erythrocyte cytoskeleton protein, under the oxidative stresses of malaria parasite infection (Glenister, Coppel et al. 2002). Normal erythrocytes exposure to oxidants agents such as phenazine methosulfate, which induces superoxide generation within the cells, demonstrated that ROS dose-dependently induce membrane rigidity, reduce erythrocytes elasticity, and oxidize membrane associated hemoglobin as well as sulfhydryl groups of cytoskeleton and transmembrane proteins (Joiner, Rettig et al. 2004). The compounds evaluated may be having the same effect on the erythrocytes membrane, due to oxidant's nature.

4. CONCLUSIONS: The combination of the synthetic steps proposed by Hooker and Dudley and Miller, allowed to obtain 6 furanonaftoquinones occurring among themselves, with good yields and high degree of purity, evidenced by the spectroscopic results, in all cases the linear isomer was obtained in greater proportion than the isomer angle. Both compounds intermediaries and products, showed antimalarial activity in strains sensitive and resistant to chloroquine, These results show an increase in the amount of carbonylated proteins from cultured parasites treated and erythrocyte protein membrane, with respect to not treated control.

Acknowledgments: The authors wish to thank the program to support research groups, sponsored by the Vice-Rector for research of the University of Cartagena, Cartagena (Colombia) and Ibero-American Programme for Science, Technology and Development (CYTED).

5. REFERENCE

Acosta Sánchez, T., D. P. Núñez and M. Suárez Luengo (2003). "Anemia hemolítica por deficiencia de G6PD y estrés oxidativo." *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* **22**(3): 186-191.

Advani, R., E. Rubin, N. Mohandas and S. Schrier (1992). "Oxidative red blood cell membrane injury in the pathophysiology of severe mouse beta-thalassemia." *Blood* **79**(4): 1064-1067.

Advani, R., E. Rubin, N. Mohandas and S. L. Schrier (1992). "Oxidative red blood cell membrane injury in the pathophysiology of severe mouse beta-thalassemia." *Blood* **79**(4): 1064-1067.

Agbor-Enoh, S., C. Seudieu, E. Davidson, A. Dritschilo and M. Jung (2009). "Novel inhibitor of Plasmodium histone deacetylase that cures P. berghei-infected mice." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(5): 1727-1734.

Akide-Ndunge, O. B., E. Tambini, G. Giribaldi, P. J. McMillan, S. Muller, P. Arese and F. Turrini (2009). "Co-ordinated stage-dependent enhancement of Plasmodium falciparum antioxidant enzymes and heat shock protein expression in parasites growing in oxidatively stressed or G6PD-deficient red blood cells." *Malar J* **8**: 113.

Akide-Ndunge, O. B., E. Tambini, G. Giribaldi, P. J. McMillan, S. Müller, P. Arese and F. Turrini (2009). "Co-ordinated stage-dependent enhancement of Plasmodium falciparum antioxidant enzymes and heat shock protein expression in parasites growing in oxidatively stressed or G6PD-deficient red blood cells." *Malar J* **8**: 113.

Anderson, M. E. (1996). "Glutathione and glutathione delivery compounds." *Advances in pharmacology* **38**: 65-78.

Andricopulo, A., M. Akoachere, R. Krogh, C. Nickel, M. McLeish, G. Kenyon, L. Arscott, C. Williams, E. Davioud-Charvet and K. Becker (2006). "Specific inhibitors of *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase as potential antimalarial agents." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **16**(8): 2283-2292.

Ashley, E., R. McGready, S. Proux and F. Nosten (2006). "Malaria." *Travel Medicine and Infectious Disease* **4**(3-4): 159-173.

Atamna, H. and H. Ginsburg (1995). "Heme degradation in the presence of glutathione." *Journal of Biological Chemistry* **270**(42): 24876-24883.

Ayi, K., F. Turrini, A. Piga and P. Arese (2004). "Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait." *Blood* **104**(10): 3364-3371.

Baker, R. P., R. Wijetilaka and S. Urban (2006). "Two Plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria." *PLoS pathogens* **2**(10): e113.

Bannister, L., J. Hopkins, R. Fowler, S. Krishna and G. Mitchell (2000). "A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium falciparum Asexual Blood Stages." *Parasitology Today* **16**(10): 427-433.

Bannister, L. and G. Mitchell (2009). "The malaria merozoite, forty years on." *Parasitology* **136**(12): 1435-1444.

Becker, K., L. Tilley, J. L. Vennerstrom, D. Roberts, S. Rogerson and H. Ginsburg (2004). "Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions." *International journal for parasitology* **34**(2): 163-189.

Birth, D., W. C. Kao and C. Hunte (2014). "Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action." *Nat Commun* **5**: 4029.

Biryukov, S. and J. A. Stoute (2014). "Complement activation in malaria: friend or foe?" *Trends in Molecular Medicine* **20**(5): 293-301.

Blackman, M. J. (2000). "Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite function and potential as chemotherapeutic targets." *Current drug targets* **1**(1): 59-83.

Blackman, M. J. (2004). "Proteases in host cell invasion by the malaria parasite." *Cellular microbiology* **6**(10): 893-903.

Blackman, M. J. (2008). "Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade." *Cellular microbiology* **10**(10): 1925-1934.

Borstnik, K., I. Paik, T. A. Shapiro and G. H. Posner (2002). "Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds." *International journal for parasitology* **32**(13): 1661-1667.

Bowman, S., D. Lawson, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, C. Churcher, A. Craig, R. Davies, K. Devlin and T. Feltwell (1999). "The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of Plasmodium falciparum." *Nature* **400**(6744): 532-538.

Browne, P., O. Shalev and R. P. Hebbel (1998). "The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model." *Free Radical Biology and Medicine* **24**(6): 1040-1048.

Bruneton, J. and D. Barton (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia, Acribia.

Buchholz, K., B. Mwongela Mailu, R. Heiner Schirmer and K. Becker (2007). "Structure-based drug development against malaria." *Frontiers in Drug Design & Discovery: Structure-Based Drug Design in the 21st Century* **3**(1): 225-255.

Buchholz, K., R. H. Schirmer, J. K. Eubel, M. B. Akoachere, T. Dandekar, K. Becker and S. Gromer (2008). "Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**(1): 183-191.

Burton, G. J. and E. Jauniaux (2011). "Oxidative stress." *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **25**(3): 287-299.

Bzik, D. J., W. B. Li, T. Horii and J. Inselburg (1987). "Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**(23): 8360-8364.

Cabiscol, E., J. Tamarit and J. Ros (2010). "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species." *International Microbiology* **3**(1): 3-8.

Campanale, N., C. Nickel, C. A. Daubenberger, D. A. Wehlan, J. J. Gorman, N. Klonis, K. Becker and L. Tilley (2003). "Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*." *Journal of Biological Chemistry* **278**(30): 27354-27361.

Cappellini, M. D. and G. Fiorelli (2008). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." *Lancet* **371**(9606): 64-74.

Carranza-Rodríguez, C., F. Mateos-Rodríguez, A. Muro and J. Pérez Arellano (2010). "Tratamiento antiparasitario." *Medicine* **10**.

Conkling, P. R., C. S. Greenberg and J. B. Weinberg (1988). "Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes." *Blood* **72**(1): 128-133.

Coronado, L. M., C. T. Nadovich and C. Spadafora (2014). "Malarial hemozoin: From target to tool." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1840**(6): 2032-2041.

Cos, P., A. J. Vlietinck, D. V. Berghe and L. Maes (2006). "Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'." *Journal of ethnopharmacology* **106**(3): 290-302.

Cos, P., A. J. Vlietinck, D. V. Berghe and L. Maes (2006). "Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'." *J Ethnopharmacol* **106**(3): 290-302.

Crawley, J. and B. Nahlen (2004). Prevention and treatment of malaria in young African children. Seminars in pediatric infectious diseases, Elsevier.

Crawley, J. and B. Nahlen (2004). "Prevention and treatment of malaria in young African children." Seminars in Pediatric Infectious Diseases **15**(3): 169-180.

Crowther, G. J., A. J. Napuli, J. H. Gilligan, K. Gagaring, R. Borboa, C. Francek, Z. Chen, E. F. Dagostino, J. B. Stockmyer, Y. Wang, P. P. Rodenbough, L. J. Castaneda, D. J. Leibly, J. Bhandari, M. H. Gelb, A. Brinker, I. H. Engels, J. Taylor, A. K. Chatterjee, P. Fantauzzi, R. J. Glynn, W. C. Van Voorhis and K. L. Kuhen (2011). "Identification of inhibitors for putative malaria drug targets among novel antimalarial compounds." Mol Biochem Parasitol **175**(1): 21-29.

Cheema, H. S., O. Prakash, A. Pal, F. Khan, D. U. Bawankule and M. P. Darokar (2014). "Glabridin induces oxidative stress mediated apoptosis like cell death of malaria parasite Plasmodium falciparum." Parasitol Int **63**(2): 349-358.

Cholera, R., N. J. Brittain, M. R. Gillrie, T. M. Lopera-Mesa, S. A. Diakité, T. Arie, M. A. Krause, A. Guindo, A. Tubman and H. Fujioka (2008). "Impaired cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(3): 991-996.

Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani and R. Colombo (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clinica Chimica Acta **329**(1): 23-38.

Dame, J. B., C. A. Yowell, L. Omara-Opyene, J. M. Carlton, R. A. Cooper and T. Li (2003). "Plasmeprin 4, the food vacuole aspartic proteinase found in all Plasmodium spp. infecting man." Molecular and biochemical parasitology **130**(1): 1-12.

Das, B. S. and N. K. Nanda (1999). "Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute falciparum malaria." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **93**(1): 58-62.

de Andrade-Neto, V. F., M. O. Goulart, J. F. da Silva Filho, M. J. da Silva, C. Pinto Mdo, A. V. Pinto, M. G. Zalis, L. H. Carvalho and A. U. Krettli (2004). "Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against Plasmodium falciparum in vitro and Plasmodium berghei in vivo." Bioorg Med Chem Lett **14**(5): 1145-1149.

Díaz-Acosta, A. E. and J. Membrillo-Hernández (2006). "Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos." TIP Rev Espc Quim Biol **9**: 34-44.

Dudley, K. H. and H. W. Miller (1967). "Mercuric acetate oxidation of isolapachol." The Journal of Organic Chemistry **32**(7): 2341-2344.

Durán Lengua, M., R. Gaitán Ibarra and J. T. Olivero Verbel (2013). "Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides." *Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud* **24**(4): 416-430.

Dutta, P. and C. Fitch (1983). "Diverse membrane-active agents modify the hemolytic response to ferriprotoporphyrin IX." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **225**(3): 729-734.

Dvorak, J. A., L. H. Miller, W. C. Whitehouse and T. Shiroishi (1975). "Invasion of erythrocytes by malaria merozoites." *Science (New York, NY)* **187**(4178): 748.

Egan, T. J., J. M. Combrinck, J. Egan, G. R. Hearne, H. M. Marques, S. Ntente, B. T. Sewell, P. J. Smith, D. Taylor and D. A. Van Schalkwyk (2002). "Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Biochemical Journal* **365**(Pt 2): 343.

El Hage, S., M. Ane, J.-L. Stigliani, M. Marjorie, H. Vial, G. Baziard-Mouysset and M. Payard (2009). "Synthesis and antimalarial activity of new atovaquone derivatives." *European Journal of Medicinal Chemistry* **44**(11): 4778-4782.

Ersmark, K., I. Feierberg, S. Bjelic, E. Hamelink, F. Hackett, M. J. Blackman, J. Hultén, B. Samuelsson, J. Åqvist and A. Hallberg (2004). "Potent Inhibitors of the *Plasmodium falciparum* Enzymes Plasmeprin I and II Devoid of Cathepsin D Inhibitory Activity." *Journal of medicinal chemistry* **47**(1): 110-122.

Ersmark, K., B. Samuelsson and A. Hallberg (2006). "Plasmeprins as potential targets for new antimalarial therapy." *Medicinal research reviews* **26**(5): 626-666.

Farrow, R. E., J. Green, Z. Katsimitsoulia, W. R. Taylor, A. A. Holder and J. E. Molloy (2011). "The mechanism of erythrocyte invasion by the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**(9): 953-960.

Fear, G., S. Komarnytsky and I. Raskin (2007). "Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs." *Pharmacology & therapeutics* **113**(2): 354-368.

Feng, T.-S., E. M. Guantai, M. Nell, C. E. J. van Rensburg, K. Ncokazi, T. J. Egan, H. C. Hoppe and K. Chibale (2011). "Effects of highly active novel artemisinin-chloroquinoline hybrid compounds on β -hematin formation, parasite morphology and endocytosis in *Plasmodium falciparum*." *Biochemical Pharmacology* **82**(3): 236-247.

Fernández-Calienes Valdés, A., J. Mendiola Martínez, D. Acuña Rodríguez, Y. Caballero Lorenzo, R. Scull Lizama and Y. Gutiérrez Gaitén (2011). "Actividad antimalárica y citotoxicidad de extractos hidroalcohólicos de seis especies de plantas usadas en la medicina tradicional cubana." *Revista Cubana de Medicina Tropical* **63**(1): 52-57.

Ferreira, A., J. Balla, V. Jeney, G. Balla and M. P. Soares (2008). "A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?" *Journal of molecular medicine* **86**(10): 1097-1111.

Fitch, C. D. (2004). "Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs." *Life sciences* **74**(16): 1957-1972.

Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." *Annual review of biochemistry* **64**(1): 97-112.

Fridovich, I. (1997). "Superoxide Anion Radical (O_2^-), Superoxide Dismutases, and Related Matters." *Journal of Biological Chemistry* **272**(30): 18515-18517.

Fry, M. and M. Pudney (1992). "Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80)." *Biochem Pharmacol* **43**(7): 1545-1553.

Gaitan Ibarra, R., E. Arguello, W. Alvarez and S. Jaraba Salgado (2007). "Obtencion de analogos de productos naturales furanonaftoquinonicos y evaluacion de su actividad antimalarica frente a plasmodium falciparum." *Scientia et Technica* **1**(33): 141-144.

Garcia, L. S. (2010). "Malaria." *Clinics in Laboratory Medicine* **30**(1): 93-129.

Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson and S. Bowman (2002). "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." *Nature* **419**(6906): 498-511.

Gardner, M. J., S. J. Shallom, J. M. Carlton, S. L. Salzberg, V. Nene, A. Shoaibi, A. Ciecko, J. Lynn, M. Rizzo and B. Weaver (2002). "Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14." *Nature* **419**(6906): 531-534.

Gilberger, T. W., R. D. Walter and S. Müller (1997). "Identification and Characterization of the Functional Amino Acids at the Active Site of the Large Thioredoxin Reductase from *Plasmodium falciparum*." *Journal of Biological Chemistry* **272**(47): 29584-29589.

Gilson, P. R. and B. S. Crabb (2009). "Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites." *International journal for parasitology* **39**(1): 91-96.

Ginsburg, H. and H. Atamna (1994). "The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems." *Parasite (Paris, France)* **1**(1): 5.

Glenister, F. K., R. L. Coppel, A. F. Cowman, N. Mohandas and B. M. Cooke (2002). "Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells." *Blood* **99**(3): 1060-1063.

Goldberg, D. E. and A. F. Cowman (2010). "Moving in and renovating: exporting proteins from Plasmodium into host erythrocytes." *Nature Reviews Microbiology* **8**(9): 617-621.

Goyal, M., A. Alam and U. Bandyopadhyay (2012). "Redox Regulation in Malaria: Current Concepts and Pharmacotherapeutic Implications." *Current medicinal chemistry* **19**(10): 1475-1503.

Goyal, M., P. Singh, A. Alam, S. Kumar Das, M. Shameel Iqbal, S. Dey, S. Bindu, C. Pal, S. Kumar Das, G. Panda and U. Bandyopadhyay (2012). "Aryl aryl methyl thio arenes prevent multidrug-resistant malaria in mouse by promoting oxidative stress in parasites." *Free Radical Biology and Medicine* **53**(1): 129-142.

Goyal, M., P. Singh, A. Alam, S. Kumar Das, M. Shameel Iqbal, S. Dey, S. Bindu, C. Pal and G. Panda (2012). "Aryl aryl methyl thio arenes prevent multi-drug resistant malaria in mouse by promoting oxidative stress in parasite." *Free Radical Biology and Medicine* **53**(1): 129-142.

Greenbaum, D. C., A. Baruch, M. Grainger, Z. Bozdech, K. F. Medzihradsky, J. Engel, J. DeRisi, A. A. Holder and M. Bogyo (2002). "A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite." *Science* **298**(5600).

Grellier, P., A. Marozienė, H. Nivinskas, J. Šarlauskas, A. Aliverti and N. Čėnas (2010). "Antiplasmodial activity of quinones: Roles of aziridiny substituents and the inhibition of Plasmodium falciparum glutathione reductase." *Archives of biochemistry and biophysics* **494**(1): 32-39.

Grellier, P., J. Sarlauskas, Z. Anusevicius, A. Maroziene, C. Houee-Levin, J. Schrevel and N. Cenas (2001). "Antiplasmodial activity of nitroaromatic and quinoidal compounds: redox potential vs. inhibition of erythrocyte glutathione reductase." *Arch Biochem Biophys* **393**(2): 199-206.

Haldar, K. and N. Mohandas (2007). "Erythrocyte remodeling by malaria parasites." *Current opinion in hematology* **14**(3): 203-209.

Hawthorne, P. L., K. R. Trenholme, T. S. Skinner-Adams, T. Spielmann, K. Fischer, M. W. A. Dixon, M. R. Ortega, K. L. Anderson, D. J. Kemp and D. L. Gardiner (2004). "A novel Plasmodium falciparum ring stage protein, REX, is located in Maurer's clefts." *Molecular and biochemical parasitology* **136**(2): 181-189.

Hebbel, R. P. and W. J. Miller (1984). "Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia." *Blood* **64**(3): 733-741.

Hempelmann, E., C. Motta, R. Hughes, S. A. Ward and P. G. Bray (2003). "Plasmodium falciparum: sacrificing membrane to grow crystals?" Trends in parasitology **19**(1): 23-26.

Hiller, N., K. Fritz-Wolf, M. Deponte, W. Wende, H. Zimmermann and K. Becker (2009). "Plasmodium falciparum glutathione S-transferase—Structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition." Protein science **15**(2): 281-289.

Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estraño and K. Haldar (2004). "A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection." Science **306**(5703): 1934-1937.

Hooker, S. C. (1936). "On the Oxidation of 2-Hydroxy-1, 4-naphthoquinone Derivatives with Alkaline Potassium Permanganate¹, 2." Journal of the American Chemical Society **58**(7): 1174-1179.

Huang, H.-L., S.-L. Wu, H.-F. Liao, C.-M. Jiang, R.-L. Huang, Y.-Y. Chen, Y.-C. Yang and Y.-J. Chen (2005). "Induction of apoptosis by three marine algae through generation of reactive oxygen species in human leukemic cell lines." Journal of agricultural and food chemistry **53**(5): 1776-1781.

Hudson, A., A. Randall, M. Fry, C. Ginger, B. Hill, V. Latter, N. McHardy and R. Williams (1985). "Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity." Parasitology **90**(01): 45-55.

Induli, M., M. Gebru, N. Abdissa, H. Akala, I. Wekesa, R. Byamukama, M. Heydenreich, S. Murunga, E. Dagne and A. Yenesew (2013). "Antiplasmodial quinones from the rhizomes of Kniphofia foliosa." Nat Prod Commun **8**(9): 1261-1264.

Jiang, S., S. T. Prigge, L. Wei, Y. Gao, T. H. Hudson, L. Gerena, J. B. Dame and D. E. Kyle (2001). "New Class of Small Nonpeptidyl Compounds Blocks Plasmodium falciparum Development In Vitro by Inhibiting Plasmepsins." Antimicrobial agents and chemotherapy **45**(9): 2577-2584.

Jiménez, J. N., G. Snounou, F. Letourneur, L. Rénia, I. D. Vélez and C. E. Muskus (2010). "Near-fixation of a PfmSP1 block 2 allelic variant in genetically diverse Plasmodium falciparum populations across Western Colombia." Acta tropica **114**(1): 67-70.

Joiner, C. H., R. K. Rettig, M. Jiang and R. S. Franco (2004). "KCl cotransport mediates abnormal sulfhydryl-dependent volume regulation in sickle reticulocytes." Blood **104**(9): 2954-2960.

Jortzik, E., K. Fritz-Wolf, N. Sturm, M. Hipp, S. Rahlfs and K. Becker (2010). "Redox Regulation of Plasmodium falciparum Ornithine δ -Aminotransferase." Journal of Molecular Biology **402**(2): 445-459.

Kanokmedhakul, K., S. Kanokmedhakul and R. Phatchana (2005). "Biological activity of Anthraquinones and Triterpenoids from *Prismatomeris fragrans*." *J Ethnopharmacol* **100**(3): 284-288.

Kawazu, S., K. Komaki-Yasuda, H. Oku and S. Kano (2008). "Peroxiredoxins in malaria parasites: parasitologic aspects." *Parasitology international* **57**(1): 1-7.

Kayser, O., A. Kiderlen and S. Croft (2003). "Natural products as antiparasitic drugs." *Parasitology research* **90**: 55-62.

Krauth-Siegel, R. L., H. Bauer and R. H. Schirmer (2005). "Dithiol Proteins as Guardians of the Intracellular Redox Milieu in Parasites: Old and New Drug Targets in Trypanosomes and Malaria-Causing Plasmodia." *Angewandte Chemie International Edition* **44**(5): 690-715.

Krnajski, Z., T. W. Gilberger, R. D. Walter and S. Müller (2001). "The malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses a functional thioredoxin system." *Molecular and biochemical parasitology* **112**(2): 219.

Krugliak, M. and H. Ginsburg (2006). "The evolution of the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*—infected erythrocytes—a kinetic analysis." *Experimental Parasitology* **114**(4): 253-258.

Kyes, S. A., J. A. Rowe, N. Kriek and C. I. Newbold (1999). "Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(16): 9333-9338.

Lauer, S., J. VanWye, T. Harrison, H. McManus, B. U. Samuel, N. L. Hiller, N. Mohandas and K. Haldar (2000). "Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection." *The EMBO journal* **19**(14): 3556-3564.

Le Bonniec, S., C. Deregnacourt, V. Redeker, R. Banerjee, P. Grellier, D. E. Goldberg and J. Schrével (1999). "Plasmepsin II, an Acidic Hemoglobinase from the *Plasmodium falciparum* Food Vacuole, Is Active at Neutral pH on the Host Erythrocyte Membrane Skeleton." *Journal of Biological Chemistry* **274**(20): 14218-14223.

Lee, M., R. Fridman and S. Mobashery (2004). "Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases." *Chem. Soc. Rev.* **33**(7): 401-409.

Legorreta-Herrera, M., R. Retana-Ugalde, J. L. Ventura-Gallegos and V. Narváez (2010). "Pyrimethamine induces oxidative stress in *Plasmodium yoelii* 17XL-infected mice: A novel immunomodulatory mechanism of action for an old antimalarial drug?" *Experimental parasitology* **126**(3): 381-388.

Legorreta-Herrera, M., R. Retana-Ugalde, J. L. Ventura-Gallegos and V. Narváez (2010). "Pyrimethamine induces oxidative stress in Plasmodium yoelii 17XL-infected mice: A novel immunomodulatory mechanism of action for an old antimalarial drug?" *Experimental Parasitology* **126**(3): 381-388.

Lengua, M. D., R. G. Ibarra and J. T. O. Verbel (2013). "Búsqueda en bases de datos sobre la actividad biológica de moléculas quinoides." *Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud* **24**(4).

León, C., J. N. Domínguez, D. Rojas, J. Rodríguez, N. G. de Domínguez, J. Gut, P. Rosenthal and L. Vásquez (2008). "Síntesis y Actividad Antimalárica de Derivados 3-Cloro-2N-Aminosustituido-1, 4-Naftoquinona." *Revista de Investigación*(64).

Levine, R. L., J. A. Williams, E. R. Stadtman and E. Shacter (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." *Methods Enzymol* **233**: 346-357.

Lew, V. L., L. Macdonald, H. Ginsburg, M. Krugliak and T. Tiffert (2004). "Excess haemoglobin digestion by malaria parasites: a strategy to prevent premature host cell lysis." *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **32**(3): 353-359.

Liang, G. Z. and S. Z. Li (2007). "A new sequence representation as applied in better specificity elucidation for human immunodeficiency virus type 1 protease." *Peptide Science* **88**(3): 401-412.

Lim, L. and G. I. McFadden (2010). "The evolution, metabolism and functions of the apicoplast." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**(1541): 749-763.

López-Otín, C. and J. S. Bond (2008). "Proteases: multifunctional enzymes in life and disease." *Journal of Biological Chemistry* **283**(45): 30433-30437.

López, C., C. Saravia, A. Gomez, J. Hoebeke and M. A. Patarroyo (2010). "Mechanisms of genetically-based resistance to malaria." *Gene* **467**(1-2): 1-12.

Loria, P., S. Miller, M. Foley and L. Tilley (1999). "Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials." *Biochemical Journal* **339**(Pt 2): 363.

Lyon, J. A. and J. Haynes (1986). "Plasmodium falciparum antigens synthesized by schizonts and stabilized at the merozoite surface when schizonts mature in the presence of protease inhibitors." *The Journal of Immunology* **136**(6): 2245-2251.

Maier, A. G., B. M. Cooke, A. F. Cowman and L. Tilley (2009). "Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte." *Nature Reviews Microbiology* **7**(5): 341-354.

Mandal, S. (2014). "Epidemiological aspects of vivax and falciparum malaria: global spectrum." *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **4**, **Supplement 1**(0): S13-S26.

Mansi, M. P., M. Dickson and A. J. Rodríguez-Morales (2007). "Influencia de la parasitemia sobre los valores de hemoglobina y anemia en niños con malaria por Plasmodium falciparum no complicada: experiencia en un hospital de Tanzania." *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* **24**(1): 27-34.

Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**(1): 83-95.

Marti, M., J. Baum, M. Rug, L. Tilley and A. F. Cowman (2005). "Signal-mediated export of proteins from the malaria parasite to the host erythrocyte." *The Journal of cell biology* **171**(4): 587-592.

Martínez, A., I. Reyes and N. Reyes (2007). "Cytotoxicity of the herbicide glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells." *Biomédica* **27**(4): 594-604.

Mason, P. J., J. M. Bautista and F. Gilsanz (2007). "G6PD deficiency: the genotype-phenotype association." *Blood reviews* **21**(5): 267-283.

McConkey, G. A., M. J. Rogers and T. F. McCutchan (1997). "Inhibition of Plasmodium falciparum protein synthesis." *Journal of Biological Chemistry* **272**(4): 2046-2049.

McCoubrie, J. E., S. K. Miller, T. Sargeant, R. T. Good, A. N. Hodder, T. P. Speed, T. F. de Koning-Ward and B. S. Crabb (2007). "Evidence for a common role for the serine-type Plasmodium falciparum serine repeat antigen proteases: implications for vaccine and drug design." *Infection and immunity* **75**(12): 5565-5574.

Méndez, D., M. L. Hernández, A. N. Kamali, A. Diez, A. Puyet and J. M. Bautista (2012). "Differential carbonylation of cytoskeletal proteins in blood group O erythrocytes: Potential role in protection against severe malaria." *Infection, Genetics and Evolution* **12**(8): 1780-1787.

Méndez, D., M. Linares, A. Diez, A. Puyet and J. M. Bautista (2011). "Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon Plasmodium falciparum invasion are differentially carbonylated in G6PD A- deficiency." *Free Radical Biology and Medicine* **50**(10): 1305-1313.

Méndez, D., M. Linares, A. Diez, A. Puyet and J. M. Bautista (2011). "Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon Plasmodium falciparum invasion are differentially carbonylated in G6PD A- deficiency." *Free Radical Biology and Medicine* **50**(10): 1305-1313.

Miguel del Corral, J. M., M. A. Castro, A. B. Oliveira, S. A. Gualberto, C. Cuevas and A. San Feliciano (2006). "New cytotoxic furoquinones obtained from terpenyl-1,4-naphthoquinones and 1,4-anthracenediones." *Bioorg Med Chem* **14**(21): 7231-7240.

Moneriz, C., P. Marín-García, J. M. Bautista, A. Diez and A. Puyet (2009). "Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for quantification of low-parasitaemia Plasmodium infected erythrocytes." *Malaria journal* **8**(1): 279.

Moneriz, C., P. Marín-García, J. M. Bautista, A. Diez and A. Puyet (2011). "Parasitostatic effect of maslinic acid. II. Survival increase and immune protection in lethal Plasmodium yoelii-infected mice." *Malaria journal* **10**(1): 103.

Moneriz, C., P. Marin-Garcia, A. Garcia-Granados, J. M. Bautista, A. Diez and A. Puyet (2011). "Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of Plasmodium falciparum intraerythrocytic stages." *Malar J* **10**: 82.

Müller, S. (2004). "Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum." *Molecular microbiology* **53**(5): 1291-1305.

Myatt, L. (2010). "Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta." *Placenta* **31**: S66-S69.

Ntie-Kang, F., P. A. Onguene, L. L. Lifongo, J. C. Ndom, W. Sippl and L. M. Mbaze (2014). "The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids." *Malar J* **13**(1): 81.

Olszewski, K. L. and M. Llinás (2011). "Central carbon metabolism of Plasmodium parasites." *Molecular and biochemical parasitology* **175**(2): 95-103.

Olliario, P. (2001). "Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs." *Pharmacology & Therapeutics* **89**(2): 207-219.

Olliario, P. (2001). "Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs." *Pharmacol Ther* **89**(2): 207-219.

Omodeo-Salè, F., A. Motti, N. Basilico, S. Parapini, P. Olliario and D. Taramelli (2003). "Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with Plasmodium falciparum." *Blood* **102**(2): 705-711.

Onegi, B., C. Kraft, I. Köhler, M. Freund, K. Jenett-Siems, K. Siems, G. Beyer, M. F. Melzig, U. Bienzle and E. Eich (2002). "Antiplasmodial activity of naphthoquinones and one anthraquinone from *Stereospermum kunthianum*." *Phytochemistry* **60**(1): 39-44.

Orjih, A. U., R. Chevli and C. D. Fitch (1985). "Toxic heme in sickle cells: an explanation for death of malaria parasites." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **34**(2): 223.

Payne, S. H. and W. F. Loomis (2006). "Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences." *Eukaryotic cell* **5**(2): 272-276.

Perabo, F., C. Frossler, G. Landwehrs, D. Schmidt, A. Von Rucker, A. Wirger and S. Muller (2006). "Indirubin-3'-monoxime, a CDK inhibitor induces growth inhibition and apoptosis-independent up-regulation of survivin in transitional cell cancer." *Anticancer research* **26**(3A): 2129-2135.

Piermatey-Ditta, J. (2012). "Síntesis y Actividad Citotóxica de 4,5 y 4,9-furanonaftoquinonas 2-alcil sustituidas." Tesis de Maestría (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Cartagena) **Cartagena de Indias**.

Postma, N., J. Zuidema, E. Mommers and W. Eling (1996). "Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy." *Pharmacy world & science* **18**(4): 121-129.

Proudfoot, O., N. Drew, A. Scholzen, S. Xiang and M. Plebanski (2008). "Investigation of a novel approach to scoring Giemsa-stained malaria-infected thin blood films." *Malaria journal* **7**(1): 62.

Puente, X. S., L. M. Sánchez, C. M. Overall and C. López-Otín (2003). "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach." *Nature Reviews Genetics* **4**(7): 544-558.

Qin, H., S. M. Srinivasula, G. Wu, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri and Y. Shi (1999). "Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1." *Nature* **399**(6736): 549-557.

Ra, H. J. and W. C. Parks (2007). "Control of matrix metalloproteinase catalytic activity." *Matrix biology* **26**(8): 587-596.

Radfar, A., A. Diez and J. M. Bautista (2008). "Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*" *Free Radical Biology and Medicine* **44**(12): 2034-2042.

Radfar, A., A. Diez and J. M. Bautista (2008). "Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*." *Free Radic Biol Med* **44**(12): 2034-2042.

Radfar, A., D. Méndez, C. Moneriz, M. Linares, P. Marín-García, A. Puyet, A. Diez and J. M. Bautista (2009). "Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels." *Nature protocols* **4**(12): 1899-1915.

Requena, J., R. Levine and E. Stadtman (2003). "Recent advances in the analysis of oxidized proteins." *Amino acids* **25**(3): 221-226.

Rosenthal, P. J. (1998). "Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy." *Emerging Infectious Diseases* **4**(1): 49.

Rosenthal, P. J. (2002). "Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malaria parasites." *Current opinion in hematology* **9**(2): 140-145.

Rosenthal, P. J. (2004). "Cysteine proteases of malaria parasites." *International Journal for Parasitology* **34**(13-14): 1489-1499.

Rosenthal, P. J., J. E. Olson, G. K. Lee, J. T. Palmer, J. L. Klaus and D. Rasnick (1996). "Antimalarial effects of vinyl sulfone cysteine proteinase inhibitors." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**(7): 1600-1603.

Rowe, J. A., A. Claessens, R. A. Corrigan and M. Arman (2009). "falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications."

Ruwende, C. and A. Hill (1998). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria." *Journal of Molecular Medicine* **76**(8): 581-588.

Sam-Yellowe, T. Y., L. Florens, J. R. Johnson, T. Wang, J. A. Drazba, K. G. Le Roch, Y. Zhou, S. Batalov, D. J. Carucci and E. A. Winzeler (2004). "A Plasmodium gene family encoding Maurer's cleft membrane proteins: structural properties and expression profiling." *Genome research* **14**(6): 1052-1059.

Sarduy, E. S., A. C. Munoz, S. A. Trejo and A. C. P. M. de los (2012). "High-level expression of Falcipain-2 in Escherichia coli by codon optimization and auto-induction." *Protein Expr Purif* **83**(1): 59-69.

Scott, C. J. and C. C. Taggart (2010). "Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents." *Biochimie* **92**(11): 1681-1688.

Schellenberg, D., C. Menendez, J. J. Aponte, E. Kahigwa, M. Tanner, H. Mshinda and P. Alonso (2005). "Intermittent preventive antimalarial treatment for Tanzanian infants: follow-up to age 2 years of a randomised, placebo-controlled trial." *The Lancet* **365**(9469): 1481-1483.

Seife, C. (1997). "Blunting nature's Swiss army knife." *Science* **277**(5332): 1602-1603.

Shen, H.-B. and K.-C. Chou (2009). "Identification of proteases and their types." *Analytical Biochemistry* **385**(1): 153-160.

Shinar, E. and E. Rachmilewitz (1990). Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Seminars in hematology*.

Shingadia, D. (2014). "Treating malaria in the UK." *Paediatrics and Child Health* **24**(6): 232-235.

Sibley, C. H., J. E. Hyde, P. F. G. Sims, C. V. Plowe, J. G. Kublin, E. K. Mberu, A. F. Cowman, P. A. Winstanley, W. M. Watkins and A. M. Nzila (2001). "Pyrimethamine–sulfadoxine resistance in Plasmodium falciparum: what next?" Trends in parasitology **17**(12): 570-571.

Sijwali, P. S., L. S. Brinen and P. J. Rosenthal (2001). "Systematic Optimization of Expression and Refolding of the Plasmodium falciparum Cysteine Protease Falcipain-2." Protein Expr Purif **22**(1): 128-134.

Singh, N., P. S. Sijwali, K. C. Pandey and P. J. Rosenthal (2006). "Plasmodium falciparum: biochemical characterization of the cysteine protease falcipain-2'." Experimental parasitology **112**(3): 187.

Siow, Y. L. and L. Sarna (2011). "Redox regulation in health and disease—Therapeutic potential of berberine." Food Research International **44**(8): 2409-2417.

Skinner-Adams, T. S., C. M. Stack, K. R. Trenholme, C. L. Brown, J. Grembecka, J. Lowther, A. Mucha, M. Drag, P. Kafarski and S. McGowan (2010). " Plasmodium falciparum neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials." Trends in biochemical sciences **35**(1): 53-61.

Smith, T. G., D. Walliker and L. C. Ranford-Cartwright (2002). "Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa." Trends in parasitology **18**(7): 315-323.

Soni, S., S. Dhawan, K. M. Rosen, M. Chafel, A. H. Chishti and M. Hanspal (2005). "Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell." Blood Cells, Molecules, and Diseases **35**(2): 201-211.

Stocker, R., N. H. Hunt, G. D. Buffinton, M. J. Weidemann, P. H. Lewis-Hughes and I. A. Clark (1985). "Oxidative stress and protective mechanisms in erythrocytes in relation to Plasmodium vinckei load." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(2): 548-551.

Stratton, L., M. S. O'Neill, M. E. Kruk and M. L. Bell (2008). "The persistent problem of malaria: Addressing the fundamental causes of a global killer." Social Science & Medicine **67**(5): 854-862.

Su, X., V. M. Heatwole, S. P. Wertheimer, F. Guinet, J. A. Herrfeldt, D. S. Peterson, J. A. Ravetch and T. E. Wellems (1995). "The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of plasmodium falciparum-infected erythrocytes." Cell **82**(1): 89-100.

Subramanian, S., M. Hardt, Y. Choe, R. K. Niles, E. B. Johansen, J. Legac, J. Gut, I. D. Kerr, C. S. Craik and P. J. Rosenthal (2009). "Hemoglobin cleavage site-specificity of the Plasmodium falciparum cysteine proteases falcipain-2 and falcipain-3." PLoS One **4**(4): e5156.

Sugioka, Y. and M. Suzuki (1991). "The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex induced lipid peroxidation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) **1074**(1): 19-24.

Thierbach, G. and H. Reichenbach (1981). "Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain." *Biochim Biophys Acta* **638**(2): 282-289.

Thomson, R. (2012). *Naturally occurring quinones*, Elsevier.

Tilley, L., M. W. A. Dixon and K. Kirk (2011). "The Plasmodium falciparum-infected red blood cell." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**(6): 839-842.

Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." *Science (New York, NY)* **193**(4254): 673.

Turk, B. (2006). "Targeting proteases: successes, failures and future prospects." *Nature reviews Drug discovery* **5**(9): 785-799.

Turrens, J. F. (2004). "Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa." *Molecular aspects of medicine* **25**(1): 211-220.

Urban, S. and M. Freeman (2002). "Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution." *Current opinion in genetics & development* **12**(5): 512-518.

Uyemura, S. A., S. Luo, S. N. J. Moreno and R. Docampo (2000). "Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria." *Journal of Biological Chemistry* **275**(13): 9709-9715.

Vaidya, A. B., R. Akella and K. Suplick (1989). "Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite." *Molecular and biochemical parasitology* **35**(2): 97-107.

Wainwright, M. and L. Amaral (2005). "Review: The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs." *Tropical Medicine & International Health* **10**(6): 501-511.

Walker, N. F., B. Nadjm and C. J. M. Whitty (2010). "Malaria." *Medicine* **38**(1): 41-46.

Ward, G. E., L. H. Miller and J. A. Dvorak (1993). "The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes." *Journal of cell science* **106**(1): 237-248.

White, N. J., S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu and A. M. Dondorp (2014). "Malaria." *The Lancet* **383**(9918): 723-735.

Winstanley, P., S. Ward, R. Snow and A. Breckenridge (2004). "Therapy of falciparum malaria in sub-saharan Africa: from molecule to policy." *Clinical microbiology reviews* **17**(3): 612-637.

A family of compounds based on alkyl substituted synthetic Quinones oxidize membrane protein and arrest Plasmodium falciparum growth in vitro.
)

Winterbourn, C. C. (1985). "Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin." *Environmental health perspectives* **64**: 321.

Withers-Martinez, C., L. Jean and M. J. Blackman (2004). "Subtilisin-like proteases of the malaria parasite." *Molecular microbiology* **53**(1): 55-63.

Wood, Z. A., E. Schröder, J. Robin Harris and L. B. Poole (2003). "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins." *Trends in biochemical sciences* **28**(1): 32-40.

Yan, C. and D. D. Boyd (2006). "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." *Journal of cellular physiology* **211**(1): 19-26.

Zhang, J., M. Krugliak and H. Ginsburg (1999). "The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs." *Molecular and biochemical parasitology* **99**(1): 129-141.