

REVISÃO DE LITERATURA SOBRE O MECANISMO DE AÇÃO DA ARTEMISININA E DOS ENDOPERÓXIDOS ANTIMALÁRICOS – PARTE II

A REVIEW OF ARTEMISININ AND ANTIMALARIAL ENDOPEROXIDES ACTION MECHANISM: PART II

Laís Cardoso Almeida¹
Elisângela Santos²
Carine Sampaio Santana³
Janay Stefany Carneiro Araújo⁴
Alex Gutterres Taranto⁵
Franco Henrique Andrade Leite⁶

Artemisinina é uma lactona sesquiterpênica com um grupamento endoperóxido, a qual vem sendo usada contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes ao tratamento com cloroquina. Os compostos endoperóxidos agem supostamente no grupo heme levando à redução da ligação peróxido e produção de radicais que podem matar o parasito. Estudos recentes mostraram que a artemisinina pode inibir a enzima ATPase cálcio-dependente (PfATP6) localizada no retículo sarco/endoplasmático, ou seja, fora do vacúolo do parasito *Plasmodium falciparum*. Atualmente, a malária mata mais do que a AIDS e o pressuposto da crescente resistência adquirida pelo parasito aos fármacos atuais endossa a necessidade pela busca de novas alternativas terapêuticas. Para a realização do estudo foi feito um levantamento bibliográfico nos principais livros e periódicos indexados no portal CAPES. A artemisinina e os endoperóxidos são representantes de uma nova classe de fármacos antimaláricos. Devido à resistência adquirida pelo parasito aos derivados quinolínicos, a artemisinina e seus derivados estão sendo empregados como terapia de escolha para o tratamento de malária. O mecanismo de ação destas substâncias, embora ainda não totalmente esclarecido, é completamente diferente dos antimaláricos convencionais, sendo, portanto, uma nova esperança para o tratamento da malária. Este artigo é a segunda parte de uma revisão sobre o provável mecanismo de ação dos endoperóxidos antimaláricos.

Palavras-chave: Antimaláricos. Artemisinina. Endoperóxidos. Mecanismo de ação

Artemisinin (QHS) is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide function being currently used against strains of Plasmodium falciparum. Endoperoxides are supposed to act on heme leading to reduction of the peroxide bond and production of radicals that can kill the parasite. In addition, recent studies show that artemisinin can inhibit the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) orthologue (PfATP6) of P. falciparum in Xenopus oocytes. Nowadays, malaria kills more than AIDS and the assumption of increasing parasite resistance to current drugs endorse the search for new therapies. To conduct the study a literature review of major books and journals indexed by CAPES was conducted. Artemisinin and endoperoxide are a new class of antimalarial drugs. Because of the resistance acquired by the parasite to quinoline derivatives, artemisinin and its derivatives are being used as therapy of choice for treating malaria. Although their action mechanism is still not well known, it is completely different from conventional antimalarial drugs and it brings fresh hope for malaria treatment. This paper is the second part of a review, in which the mechanism of action of these compounds is presented in more detail

Keywords: Antimalarial drugs. Artemisinin. Endoperoxide. Mechanism of action.

¹Egresso do curso de Farmácia da Faculdade Maria Milza- FAMAM. Cruz das Almas-BA, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/5502776449602089>. E-mail: laaiscardoso@gmail.com;

²Egresso do curso de Farmácia da Faculdade Maria Milza- FAMAM. Cruz das Almas-BA, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/8784687374954903>. E-mail: ellifarma@hotmail.com;

³Egresso do curso de Farmácia da Faculdade Maria Milza- FAMAM. Cruz das Almas-BA, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/3921834171716676>. E-mail: carinesamp@gmail.com;

⁴Mestranda do Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/7054590020374910>. E-mail: janay@hotmail.com.br

⁵Professor Adjunto, Universidade São João Del Rey - UFSJ, Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Minas Gerais. <http://lattes.cnpq.br/4759006674013596>. E-mail: taranto@ufs.edu.br;

⁶Professor Adjunto do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, Brasil. <http://lattes.cnpq.br/6921231386745339>. E-mail: fhenrique@uefs.br.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos é emergencial, considerando-se a eficácia variável espécie-dependente, longo tempo de tratamento (em média de 3 a 14 dias), perfil de efeitos adversos graves (complicações gastrointestinais, tontura e efeitos psicológicos), e o surgimento de cepas multirresistentes (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008; LEITE et al., 2014).

No Brasil, três espécies principais são responsáveis pela doença em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Estes parasitos são transmitidos para o homem pelo mosquito vetor fêmea do gênero *Anopheles* através do repasto sanguíneo. O parasita responsável pela maioria das infecções fatais da malária, *Plasmodium falciparum*, é o principal causador da forma mais severa da doença e pode matar os pacientes em questão de horas.

Cerca de 214 milhões de casos de malária foram registrados no cenário mundial, com 438 mil mortes (WHO, 2015). Esta doença está presente em mais de 90 países com aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas em risco de contraírem a doença (WHO, 2014). No ano de 2013, foram registrados 177.783 casos de malária no Brasil, sendo que 99,7% ocorreram em estados da região da Amazônia Legal (DOS-SANTOS et al., 2014).

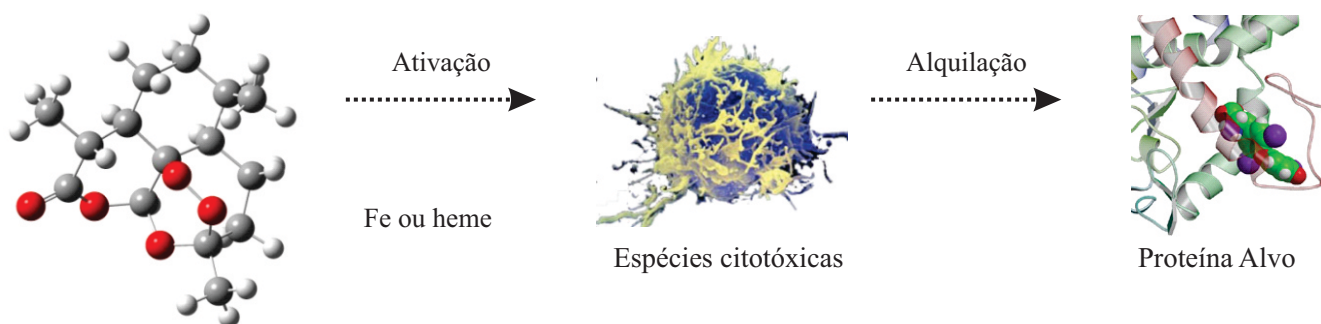
De acordo com Delrieu et al. (2015), desde 2000 houve aumento de medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento, o que resultou em uma redução da incidência de malária. Contudo, as medidas aplicadas são insuficientes para o controle eficaz da doença por alguns fatores, dentre os quais pode-se citar a resistência aos fármacos convencionais e a não adesão à terapia.

MECANISMO DE AÇÃO DA ARTEMISININA

Meshnick e colaboradores (1996) propuseram que o mecanismo de ação dos endoperóxidos antimaláricos deve ocorrer em duas etapas. Na primeira, a artemisinina é ativada pelo heme ou pelo íon ferro (II) livre, produzindo radicais livres e espécies citotóxicas. Na segunda etapa, estas espécies reagiriam com uma proteína específica associada à membrana do parasita levando-o à morte (Figura 1) (MESHNICK et al., 1996). Pandey et al. (1999) propuseram um possível mecanismo em três etapas, para explicar os efeitos dos endoperóxidos sobre o parasita. Estas etapas incluiriam inibição da degradação da hemoglobina, inibição da polimerização do heme e interação da artemisinina com a hemozoína, o que resultaria na quebra do pigmento malárico e formação de um complexo com as unidades de heme. Estas sugestões explicam a formação rápida de heme livre e a consequente geração de uma fonte transitória de heme, responsável pela ação da artemisinina e dos demais endoperóxidos antimaláricos. Isto explicaria a ação rápida destes fármacos quando comparados com os antimaláricos quinolínicos (PANDEY et al., 1999). Eckstein-Ludwing et al. (2003) apresentaram um novo alvo molecular para a artemisinina. Neste trabalho (RIDLEY 2003), foi demonstrado que além da formação de radicais livres que alquilam várias proteínas, a artemisinina atua inibindo irreversivelmente a enzima ATPase cálcio-dependente (PfATP6) localizada no retículo endoplasmático, ou seja, fora do vacúolo do parasita.

O mecanismo da reação entre a artemisinina e compostos contendo o íon ferro (II) foi estudado inicialmente por Posner et al. (1994). Em um trabalho inicial, ele empregou um derivado reativo 1,2,4 trioxano marcado isotopicamente e o reagiu com

Figura 1. Representação da ação da artemisinina proposto por Meshnick.



FeBr₂ (ácido de Lewis) em presença de THF, levando à formação de três produtos: dioxolona, aldeído e hidroxidioxolona, todos produtos de metabolismo (Figura 2). Em todos os casos ocorre inicialmente a quebra da ligação peróxido após transferência de um elétron do ferro (II) para a ligação O-O, seguida de desoxigenação, conforme mecanismo de ação dos

endoperóxidos descrito anteriormente (POSNER, 1992).

Em trabalhos subsequentes, ele avançou na interpretação do mecanismo propondo que este ocorria através de migração de hidrogênio do tipo 1,5 (POSNER, 1994), levando à formação de um radical secundário em C₄ (Figura 3).

Figura 2. Mecanismo inicial proposto por Posner. A rota A leva à formação da dioxolona. Na rota B forma-se o aldeído, enquanto na rota C ocorre a formação do derivado hidrodioxolona.

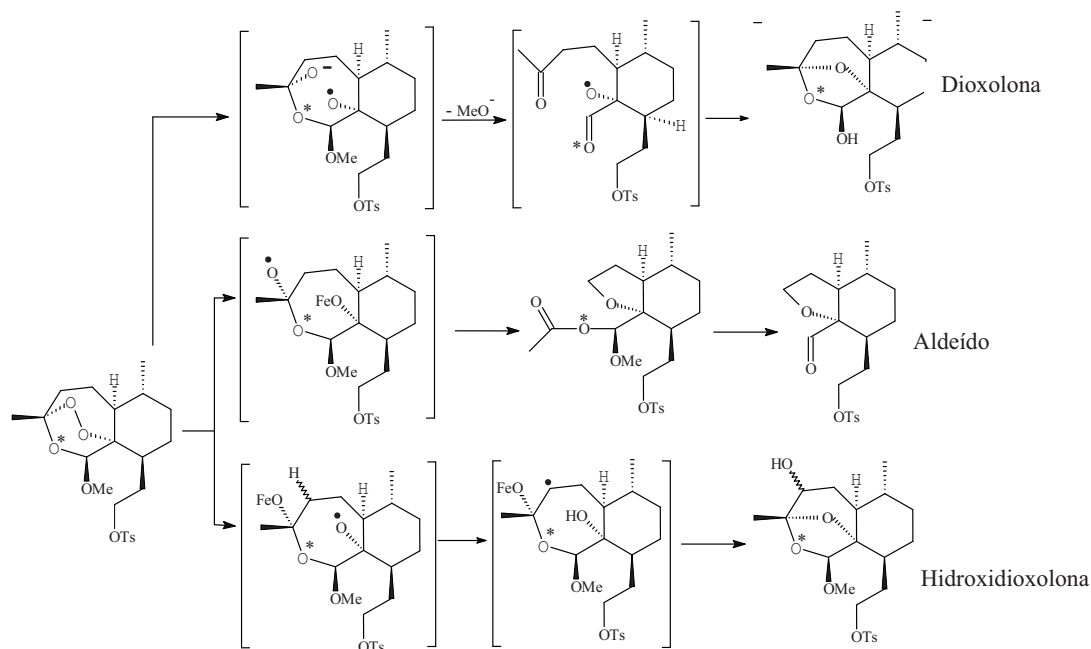
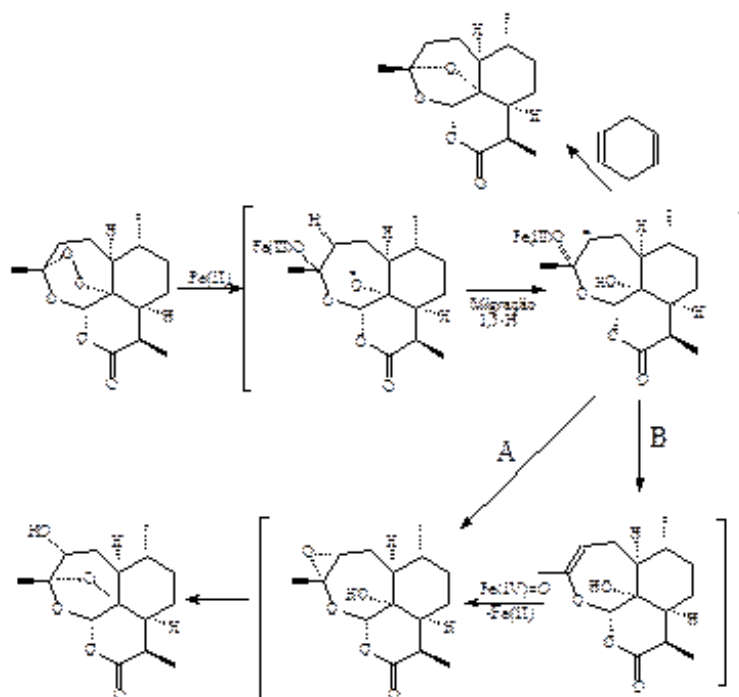


Figura 3. Mecanismo proposto por Posner passando pela migração 1,5 do H. Na rota A tem-se a saída direta de Fe(II) levando à formação do derivado epóxi e pela rota B forma-se o alceno correspondente que por oxidação origina a espécie epóxi.



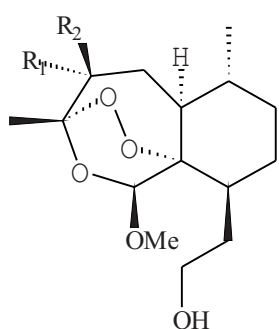
Esta conclusão estava relacionada à atividade de compostos substituídos na posição C₄, os quais apresentam baixa atividade biológica (Figura 4).

Posner sugeriu que, além da formação de um radical secundário, a atividade antimalárica da artemisinina poderia originar-se na formação de um intermediário eletrofílico do tipo epóxi (POSNER, 1995), sendo este um potente agente alquilante, ou na formação de uma espécie ferro-oxo de alta

valência.

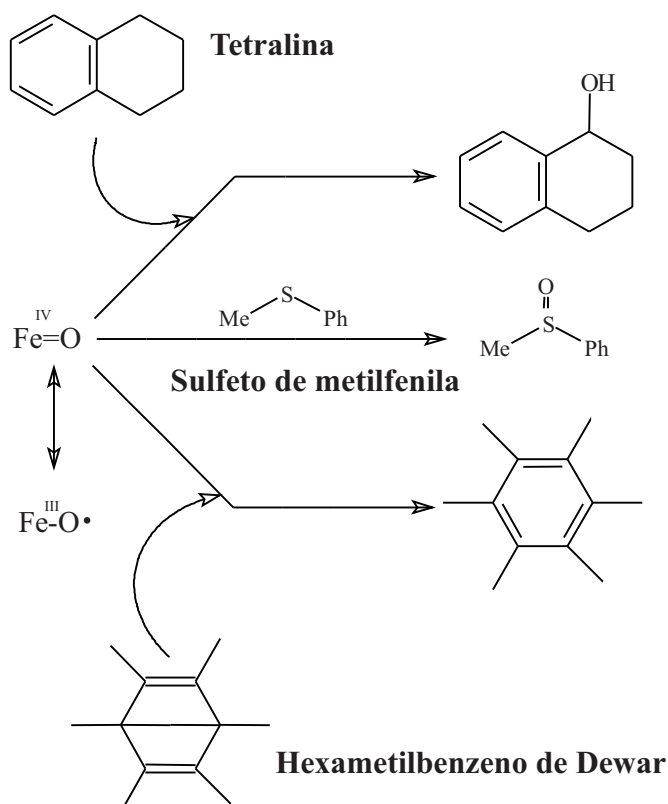
A presença desta última espécie foi demonstrada em reações de captura com hexametilbenzeno de Dewar, que rearranja para hexametilbenzeno, com sulfeto de metilfenila, que sofre oxidação para o sulfóxido correspondente, e com tetralina, que é oxidada para hidroxitetralina (Figura 5).

Figura 4. Importância da substituição em C₄. Compostos com R₁ = Me, substituição em C₄, possuem muito menor atividade do que compostos equivalentes com R₁ = H.



| Substituinte | | IC ₅₀ (ng/ml) | |
|----------------|----------------|--------------------------|----------------|
| R ₁ | R ₂ | W2 Indochina | D6 Africana |
| H | Me | 4,5 | 3,5 |
| Me | H | >500 | >500 |
| Me | Me | >500 | >500 |
| Artemisinina | | 8 | 8 |

Figura 5. Evidências da formação do intermediário ferro-oxo.



Outra observação importante está baseada no fato de que derivados da artemisinina que apresentam um bom grupo de saída na posição C₄ não formariam o intermediário ferro-oxo e, consequentemente, seriam compostos inativos (Figura 6).

Finalmente, Posner propôs que além dos fatos citados acima, ocorreria também a formação de um radical primário, oriundo da quebra homolítica da ligação C₃-C₄, com formação de dicetona e de formiato de metila (Figura 7), os quais também apresentam atividade antimalárica quando gerados *in situ* (CUMMING et al., 1998).

No entanto, Posner foi duramente criticado por Jefford (1996) quanto à formação das espécies radicalares e formação do produto intermediário do

tipo epóxi. Jefford (1996) propôs que a atividade antimalárica da artemisinina seria devida à interrupção do processo de desintoxicação do heme por transferência de um dos oxigênios do grupamento peróxido para o heme, levando à formação de um derivado oxiheme (Figura 8) (JEFFORD et al., 1995).

Propôs ainda, que a transferência de H₄ não poderia ocorrer devido à grande distância entre o hidrogênio de C₄ e o oxigênio O₂, acima de 2,1 Å, não havendo portanto a formação do radical secundário em C₄ (Figura 9).

Além disso, o agente redutor no meio reacional de Posner seria o íon Br⁻ e não o Fe⁺² (Figura 10) (JEFFORD, 1996).

Figura 6. Mecanismo de eliminação de grupos de saída na posição C₄.

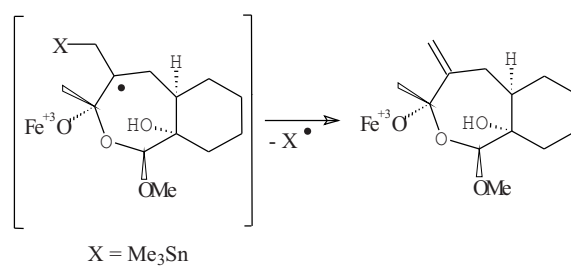


Figura 7. Mecanismo proposto por Posner explicando a formação de um radical primário, de uma dicetona, de formiato de metila e o derivado epoxidado.

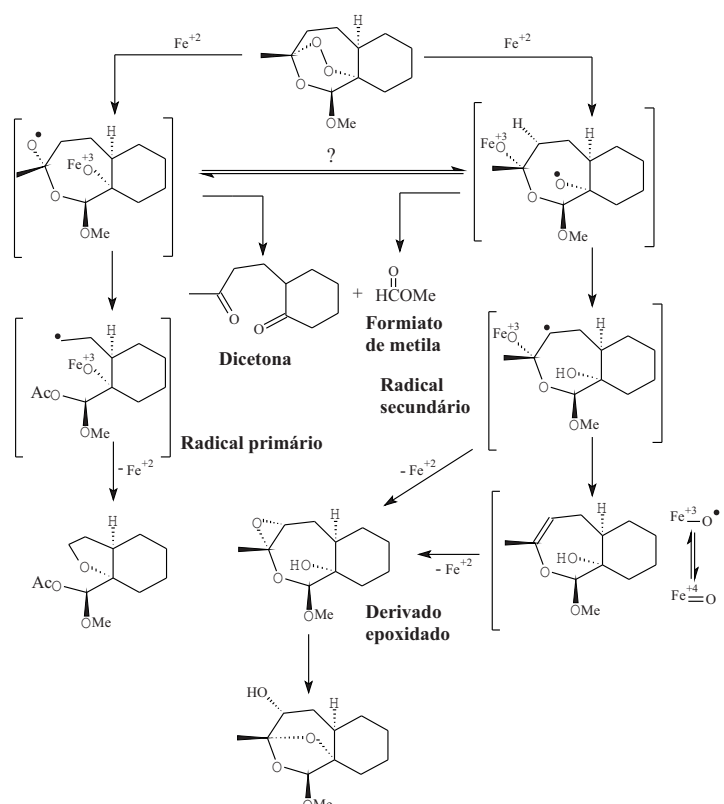


Figura 8. Formação do derivado oxiheme de por transferência de oxigênio da artemisinina para o heme.

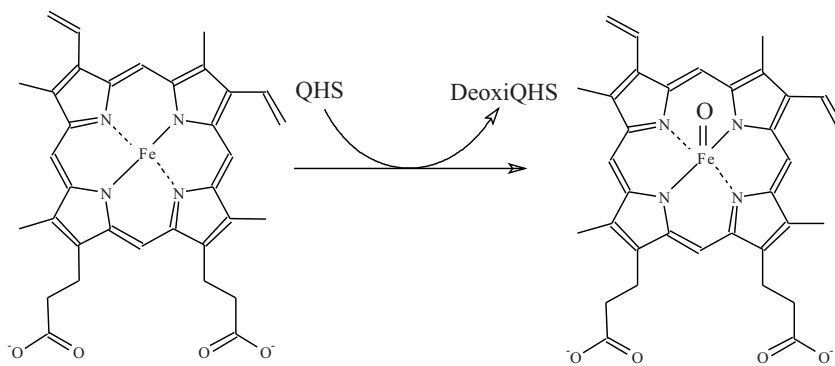


Figura 9. Mecanismo proposto por Jefford onde não há evidências da migração 1,5 H.

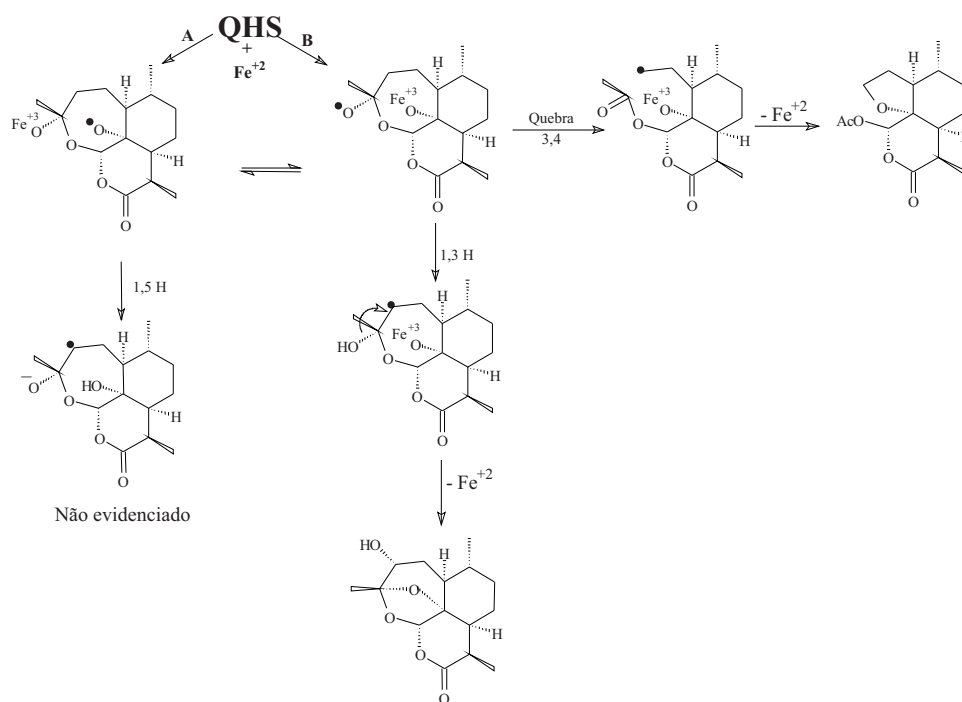
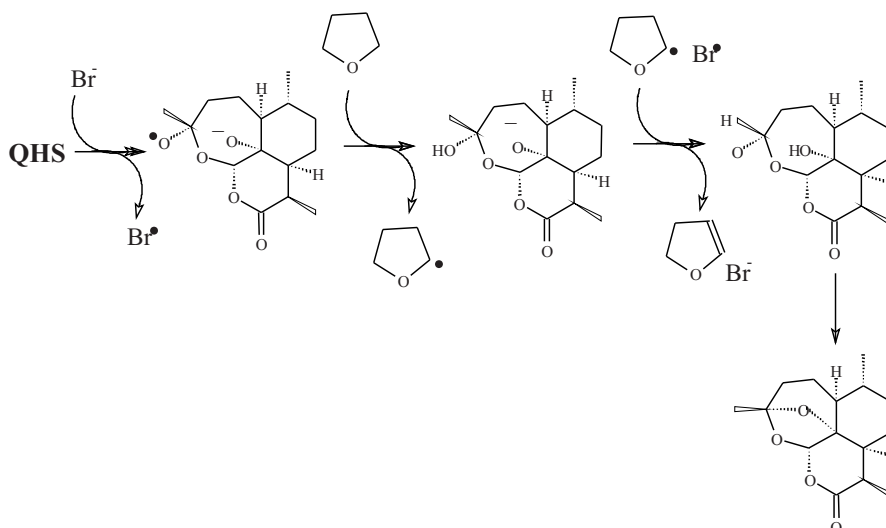


Figura 10. Mecanismo de rearranjo da artemisinina através da redução com Br⁻/THF.



Cálculos de orbitais moleculares usando metodologias *ab initio* ou semi-empíricos (TARANTO et al., 2002) mostraram que os anéis contendo o grupamento peróxido podem assumir uma conformação do tipo bote, com baixa energia de ativação, resultando em fácil migração do hidrogênio em C₄ para o radical em O₂. Porém, deve-se observar que os mesmos cálculos mostraram que a quebra homolítica da ligação C₃-C₄ pode ser competitiva com a migração 1,5 de hidrogênio.

Por sua vez, Avery (1996) tentou isolar o epóxido através da síntese de um análogo mais estável, onde o O₁₃ foi substituído por um grupo CH₂. Contudo, não houve evidências de que o epóxido havia sido formado durante o processo de rearranjo.

Adicionalmente, um epóxido sintético semelhante à artemisinina apresentou-se completamente sem atividade antimalárica (Figura 11).

Posner et al. (1994) propuseram um mecanismo via espécies radiculares e por carbocátions, que explicariam a formação dos produtos encontrados. Estes compostos seriam fontes de hidroperóxidos, os quais fornecem espécies eletrofilicas, radicais hidróxidos ou radicais alcóxidos, que seriam capazes de hidroxilar biomoléculas ou abstrair átomos de hidrogênio delas, levando conseqüentemente à morte do parasita (Figura 12) (HAYNES et al., 1999; OLLIARO et al., 2001).

Figura 11. Derivado epóxido destituído de atividade biológica.

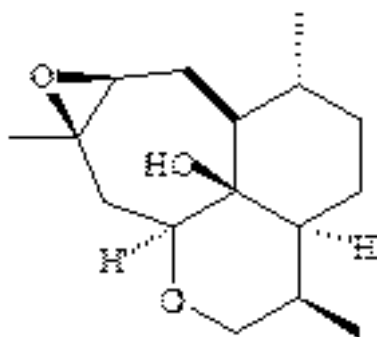
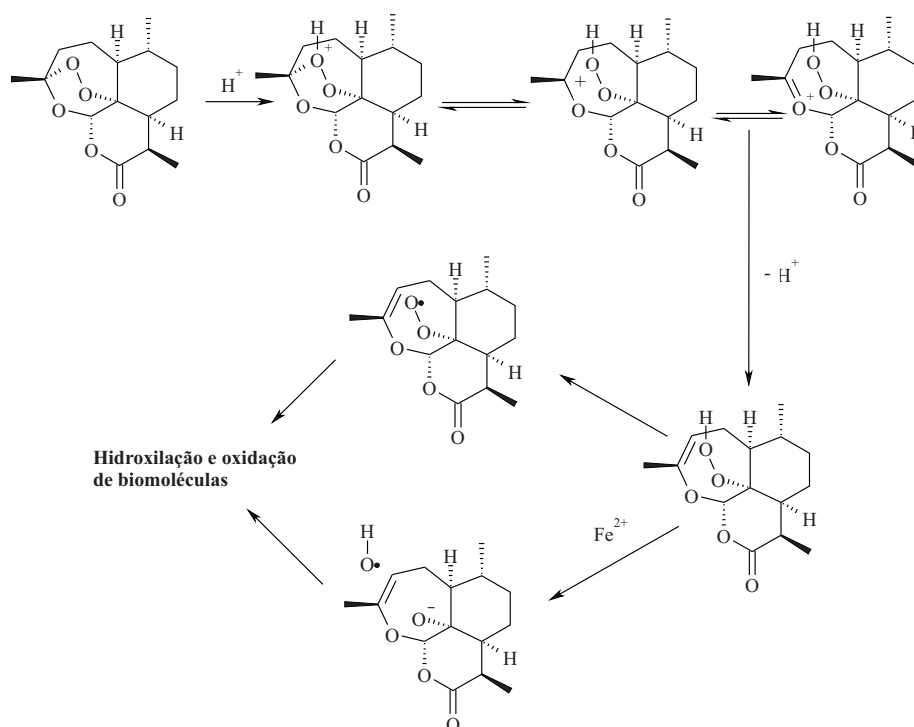


Figura 12. Mecanismo proposto por Haynes, no qual ocorre a abertura do anel peróxido gerando hidroperóxidos.



Algumas observações podem ser feitas a respeito dessa hipótese. (i) Se a reação de abertura do anel endoperóxido for rápida o suficiente para competir com a reação de geração do radical livre, não haveria pequenas concentrações de ROOH e, portanto, não poderia exercer um efeito fatal sobre o parasita. (ii) Ainda não foi caracterizada a biomolécula que sofreria a ação dos radicais gerados. (iii) Em princípio, o parasita seria capaz de eliminar esses radicais através de enzimas contra o estresse oxidativo (WU, 2002).

Finalmente, Wu et al. (1998) propuseram um mecanismo para a reação entre a artemisinina e o heme que contempla os demais mecanismos descritos na literatura, além de explicar a formação

de outros produtos identificados por eles. Estes autores estudaram o mecanismo de decomposição da artemisinina fazendo-a reagir com sulfato ferroso em acetonitrila, obtendo assim os produtos mostrados na Figura 13.

Similar ao mecanismo proposto por outros autores, a degradação da artemisinina começa com a transferência de elétrons do Fe (II) para a ligação endoperóxido, quebrando-a e levando à formação de dois ânions radicais (radical em O₁ ou radical em O₂), os quais podem ser interconvertidos. Estes, por sua vez, através de rotas isoladas, levam aos produtos finais conforme mostra a Figura 14.

Figura 13. Produtos isolados por Wu e colaboradores, como resultado da reação de decomposição da artemisinina na presença de FeSO₄.

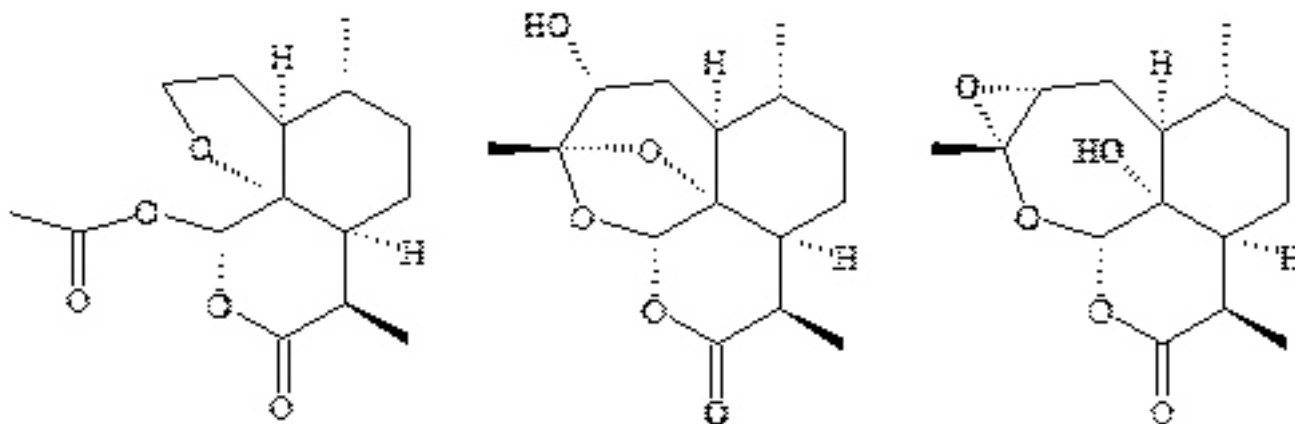
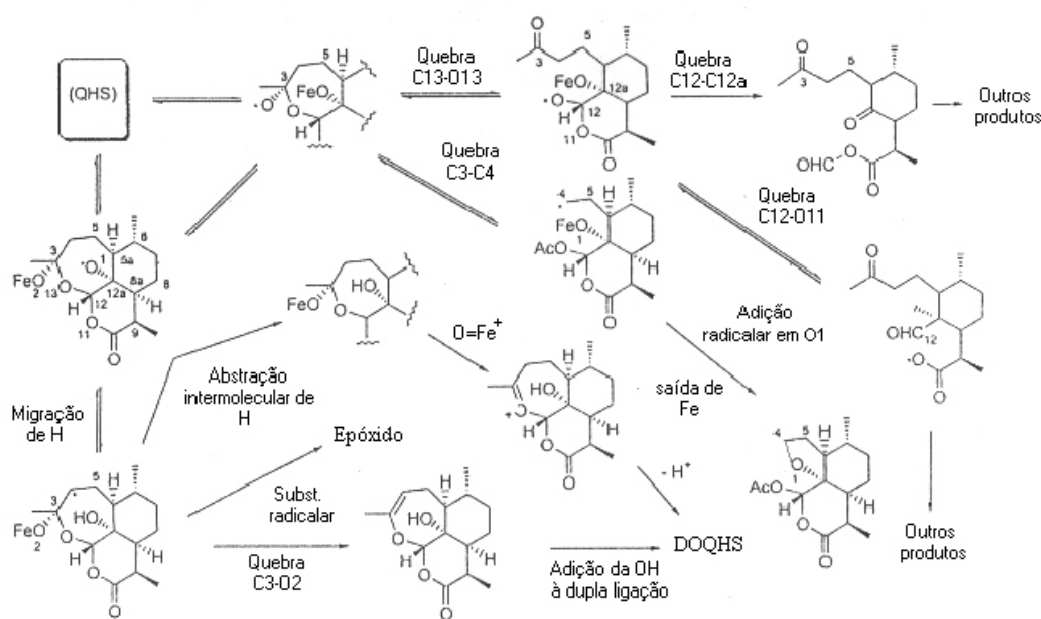


Figura 14. Mecanismo proposto por Wu e colaboradores.



Cabe ressaltar que durante o processo de redução com Fe_2SO_4 não foi obtida a deoxiartemisinina, embora este composto seja predominante na reação com outros agentes redutores (POSNER; OH, 1992; POSNER et al., 1994, 1995; CUMMING et al., 1998). Contudo, a sua formação foi proposta. Outro fato importante foi o isolamento do intermediário do tipo epóxido, obtido inicialmente por Posner (POSNER; OH, 1992; POSNER et al., 1994, 1995; CUMMING et al., 1998) e criticado por outros autores (AVERY et al., 1996). Entretanto, o próprio Wu (1998) descreve que este apresentou rendimento muito baixo (1 a 2%) e que foi isolado juntamente com outros produtos de alta polaridade e baixo ponto de fusão, sendo necessário uma reação de acetilação para que eles pudessem ser completamente isolados.

Atualmente, o mecanismo mais aceito para a ação da artemisinina envolve a formação do complexo de transição, por intermédio dos átomos de ferro do heme e O1 do endoperóxido. A posição relativa da artemisinina com respeito ao heme é determinada por interações estereoeletrônicas entre ambos, as quais afetam o rearranjo do complexo até o rompimento da ligação Fe-O. O fato desse mecanismo ainda não ter sido elucidado dificulta a compreensão da resistência aos medicamentos bem como a concepção de novas moléculas ativas (BU et al., 2016; GRUPTA; SAXENA, 2015). Portanto, a investigação em maior detalhe de tais interações no complexo é importante do ponto de vista do reconhecimento molecular do heme com respeito à artemisinina. (COSTA et al., 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura apresenta duas principais propostas para ação dos endoperóxidos, uma defendida por Haynes e a outra por Posner. Estas são divergentes entre si (OLLIARO et al., 2001). No entanto, a teoria apresentada por Posner, a qual foi defendida pelos argumentos apresentados por Olliaro é a mais aceita pela comunidade científica (POSNER; MESHNICK, 2001).

De qualquer forma, a melhor compreensão do mecanismo de ação é uma etapa fundamental para que se possa desenvolver fármacos mais eficazes, muito embora esse avanço seja mais afetado por questões econômicas e políticas do que por questões científicas (MESHNICK et al., 1996).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Suporte financeiro e físico da FAMAM - Faculdade Maria Milza, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, a Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB – PPP-2006).

REFERÊNCIAS

AVERY, M. A. et al, Structure-Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. Total Synthesis of (+)-13-Carbaartemisinin and related Tetra- and Tricyclic Structures. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 1885-1897, 1996.

BU, M.; YANG B. B.; HU, L. Natural Endoperoxides as Drug Lead Compounds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 383-405, 2016.

COSTA, M. S.; KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. **Quím. Nova**, v.30 n.1 São Paulo jan./fev., 2007.

CUMMING, J. N, et al, Design, Synthesis, Derivatization, and Structure-Activity Relationships of Simplified, Tricyclic, 1,2,4-Trioxane Alcohol Analogues of the Antimalarial Artemisinin. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 952-964, 1998.

DELRIEU, I. et al. Design of a Phase III cluster randomized trial to assess the efficacy and safety of a malaria transmission blocking vaccine. **Vaccine**, [S.l.], v. 33, n. 13, p. 1518-1526, 2015.

ECKSTEIN-LUDWING, et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. **Nature**, 2003, 424, 957-61.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

GRUPTA, A. K.; SAXENA, A. K. Molecular modelling based target identification for endo-peroxides class

- of antimalarials. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 18, n. 2, p. 199-207, 2015.
- HAYNES, R. K.; PAI, H. H. O.; VOERSTE, A.; Ring Opening of Artemisinin (Qinghaosu) and Dihydroartemisinin and Interception of the Open Hydroperoxides with Formation of N-Oxides – A Chemical Model for Antimalarial. Mode of Action. **Tetrahedron Lett.**, v. 40, p. 4715-4718, 1999.
- JEFFORD, C. H. et al. The Decomposition of cis-Fused Cyclopenteno-1,2,4-trioxanes induced by Ferrous Salts and Some Oxophilic Reagents. **Helv. Chim. Acta**, v. 78, p. 452-458, 1995.
- JEFFORD, C. H. et al, The Deoxygenation and Isomerization of Artemisinin and Artemether and Their Relevance to Antimalarial Action. **Helv. Chim. Acta**, v. 79, p. 1475-1487, 1996.
- LEITE, F. H. A et al. Malaria: from old drugs to new molecular targets. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 2, n.4, p 1-7, 2014.
- MESHNICK, S. R. et al. Second-generation Antimalarial Endoperoxides. **Parasitol. Today**, v. 12, p.79-82, 1996.
- OLLIARO, P. L. et al. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. **Trends Parasitol**, v. 17, n. 3, p. 122-126, 2001.
- PANDEY, A. V. et al. Artemisinin, an Endoperoxide Antimalarial, Disrupts the Hemoglobin Catabolism and Heme Detoxification Systems in Malarial Parasite. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 19383-19388, 1999.
- POSNER, G. H. et al. Evidence for Fe(IV)=O in the Molecular Mechanism of Action of the Trioxane Antimalarial Artemisinin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 5885-5886, 1995.
- POSNER, G. H.; MESHNICK, S. R. Radical mechanism of action of the artemisinin-type compounds. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 6, p. 266-267, 2001.
- POSNER, G. H.; OH, C. H. A Regiospecifically Oxygen-18 Labeled 1,2,4-Trioxane: A Simple Chemical Model System To Probe the Mechanism(s) for the Antimalarial Activity of Artemisinin (Qinghaosu). **J. Am. Chem. Soc.**, v. 114, p. 8328-8329, 1992.
- POSNER; H. G. et al. Mechanism-Based Design, Synthesis, and in Vitro Antimalarial Testing of New 4-Methylated Trioxanes Structurally Related to Artemisinin: The Importance of a Carbon-Centered Radical for Antimalarial Activity. **J. Med. Chem.**, v. 57, p. 1256-1258, 1994.
- RIDLEY, R. G. To kill a parasite. **Nature**, v. 424, n. 21, p. 887-889, 2003.
- TARANTO, A. G. et al. The role of C-centered radicals on the mechanism of action of artemisinin. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, n. 580, p. 207-215, 2002.
- WORLD HEALTHY ORGANIZATION.WHO. **World Malaria Report**. Geneva, 2014.
- WORLD HEALTHY ORGANIZATION.WHO. **World Malaria Report**. Geneva, 2015.
- WU, W. M. et al. Unified Mechanistic Framework for the Fe(II)-Induced Cleavage of Qinghaosu and Derivatives/Analogues. The First Spin-Trapping Evidence for the Previously Postulated Secondary C-4 Radical. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 3316-3325, 1998.
- WU, Y. How Might Qinghaosu (Artemisinin) and Related Compounds Kill the Intraerythrocytic Malaria Parasite? A Chemist's View. **Accounts Chem. Res.**, v. 35, n. 5, p. 255-259, 2002.