UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

LETÍCIA TIBURCIO FERREIRA

INIBIDORES MULTIESTÁGIO DE *Plasmodium* spp DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE: DA DESCOBERTA NA QUIMIOINFORMÁTICA À DISSECÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Campinas

2023

LETÍCIA TIBURCIO FERREIRA

INIBIDORES MULTIESTÁGIO DE *Plasmodium* spp DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE: DA DESCOBERTA NA QUIMIOINFORMÁTICA À DISSECÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Imunologia.

Orientador: Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Coorientador: Dr. Gustavo Capatti Cassiano

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LETÍCIA TIBURCIO FERREIRA, ORIENTADA PELO PROF. DR. FABIO TRINDADE MARANHÃO COSTA E PELO DR. GUSTAVO CAPATTI CASSIANO.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F413i

Ferreira, Letícia Tiburcio, 1994-
Inibidores multiestágio de *Plasmodium* spp derivados da biodiversidade : da descoberta na quimioinformática à dissecção da atividade biológica e mecanismos de resistência / Letícia Tiburcio Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa.
Coorientador: Gustavo Capatti Cassiano.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Descoberta de drogas. 2. Malária. 3. Antimaláricos. 4. Resistência a medicamentos. 5. Aminoquinolinas. I. Costa, Fabio Trindade Maranhão, 1972-. II. Cassiano, Gustavo Capatti. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Biodiversity-derived multistage *Plasmodium* spp inhibitors : from discovery in chemoinformatics to the dissection of biological activity and resistance mechanisms
Palavras-chave em inglês:
Drug discovery
Malaria
Antimalarials
Drug resistance
Aminoquinolines
Área de concentração: Imunologia
Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular
Banca examinadora:
Fabio Trindade Maranhão Costa [Orientador]
Adriano Cappellazzo Coelho
Danilo Ciccone Miguel
Roberto Rudge de Moraes Barros
Carsten Wrenger
Data de defesa: 29-09-2023
Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-5590-3878
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/9825465914264155

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Prof. Dr. Roberto Rudge de Moraes Barros

Prof. Dr. Carsten Wrenger

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

A todos aqueles que, ano após ano, já perderam as contas de quantos episódios de malária lhes acometeram. Que estes resultados, pequenos tijolos diante da construção constante do conhecimento científico, possam representar um passo um pouquinho mais próximo de uma vida menos sofrida.

AGRADECIMENTOS

"A dissertation is, by its very definition, a single-author publication but doctoral research is by no means a solitary endeavor."

Ao Prof. Dr. Fabio Costa, por acreditar em meu potencial para desenvolver um projeto desafiador no doutorado e por me incentivar a ser uma pesquisadora pensante e independente, sem deixar de amparar nossa equipe com uma infraestrutura de destaque no Brasil.

To Dr. David Fidock, my BEPE scholarship supervisor, thank you for opening the doors of your team and trusting that my skills would allow me to navigate an Ivy League lab. Our rich discussions have taught me so much and shown me by example the importance of mastering the scientific basis of every step along the way. Your embrace of not only my career as a young researcher but also of my family is something we will never forget.

Ao meu co-supervisor, Dr. Gustavo Capatti Cassiano, querido Gusta, por topar orientar oficialmente quem sempre foi sua pupila. Muito da “mão na massa” que sei hoje se deve a você. Obrigada pelo esforço em otimizar processos e trazer tantos novos ensaios e ideias para o nosso “grupo das drogas”. Torço muito por você!

À professora Carolina Horta e à equipe do LabMol da UFG (especialmente Joyce e Teófilo) pelo cuidadoso planejamento e execução do racional *in silico* deste trabalho, que permitiu que a fase experimental tivesse sucesso.

Aos tantos colegas de LIPEX, Luis, Najara, Taty, Jessica, Juliana, Aline, Carla, Carol Kayano, João Conrado, Lari e Marcela pela parceria. A composição do laboratório é efêmera... Nós não mais dominamos a população da sala de alunos. Por mais que nossos períodos de bandejão em turma, rodadas de Catan até altas horas e happy hour no Estação já tenham passado, tenho orgulho dos caminhos tomados por cada um e agradeço o tempo juntos.

Aos *dez BR na ilha da maçã*, por tantos momentos inesquecíveis em Nova York. Quem diz que viver Manhattan é conviver com a solidão certamente não conheceu as pessoas certas. Vocês foram a cereja do bolo de uma experiência de vida que mudou os rumos da minha história. Quando a saudade bater, não esqueçam de checar com

o porteiro da 260 W 54th St... É possível que eu e o Alê já estejamos subindo pelo elevador com dois *six pack*.

To Katie, Laura, Talia, Anna, and Jin, for making an intimidating lab feel so welcoming. Thank you for showing me how to juggle so much work, for introducing me to the delight that is iced coffee, and for making every day much lighter. Toodles!

Às queridas Cris Nogueira e Jaqueline Ferreira, mais que terapeutas, por me mostrarem que só posso cuidar de todo o restante depois de cuidar de mim.

Aos meus amados padrinhos, Rita e Edson, pela generosidade de me proporcionarem um local confortável e uma grande preocupação a menos em um período tão decisivo e importante quanto o da finalização deste doutorado.

Aos meus pais, Edna e Ivan, e à minha irmã, Natália, por serem meu porto seguro e me lembrarem que eu sempre tenho para onde voltar, não importa o quão longe eu voe. Obrigada pelas chamadas de vídeo encorajadoras pelas manhãs e reconfortantes ao fim do dia. Saber que tenho vocês me deu forças para encarar desafios cada vez maiores. Se em outra vida eu puder escolher, são vocês de novo.

Ao Alessandro, moi, meu amigo, meu amor, minha rocha e meu marido. Começamos tão jovens e inexperientes e hoje cá estamos, doutores e casados buscando nosso lugar ao sol. Obrigada por seu meu maior *cheerleader* e por não soltar a minha mão em meio a tantas encruzilhadas nesta vida. Seguimos mais fortes, mais unidos e mais resilientes. Mal posso esperar pelo que os próximos anos reservam para nossa família!

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos nº 2019/02171-3 e 2021/13809-9) pelo financiamento que me permitiu executar esta pesquisa sem quaisquer tipos de limitações. Obrigada por resistirem bravamente aos incessáveis ataques à ciência brasileira nos últimos anos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ao Instituto de Biologia e à UNICAMP pela infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

A Deus, pela disposição ao me levantar e pela gratidão ao me deitar. Obrigada pela saúde tanto física quanto mental que me permitiu concluir com sucesso esta etapa divisora de águas em minha vida.

I stand
on the sacrifices
of a million women before me
thinking
what can I do
to make this mountain taller
so the women after me
can see farther
- legacy
(Rupi Kaur, the sun and her flowers)

RESUMO

Responsável por mais 600 mil mortes em 2021, a malária sobrecarrega sistemas de saúde e gera significativa morbidade para países endêmicos. A circulação de cepas do parasita resistentes aos fármacos disponíveis, especialmente aquelas com suscetibilidade diminuída às terapias combinadas à base de artemisinina, dificulta o controle da doença e ressalta a necessidade de buscar por novas alternativas terapêuticas. Dentro deste contexto, o emprego de estratégias *in sílico* otimiza a identificação de potenciais moléculas bioativas, reduzindo o ônus de triagens fenotípicas e aumentando as chances de êxito. Combinando, portanto, estratégias de quimioinformática e experimentais, empregou-se uma biblioteca de produtos naturais e derivativos – classe que se destaca como fonte abundante e diversa de compostos bioativos – com objetivo de identificar novos candidatos a antimaláricos. A partir de triagem virtual e análises de similaridade química, identificou-se LDT-623, uma 4-aminoquinolina com relevante atividade antiplasmodial *in vitro* (IC_{50} *Pf*Dd2: 300 nM, índice de seletividade: 10). Atividade de bloqueio de transmissão em gametócitos de *P. falciparum* (61.7% de inibição de estágio V a 5 μM) e oocinetos de *P. berghei* (IC_{50}: 1.5 μM) também foi observada, além de atividade significativa contra esquizontes hepáticos de *P. berghei* (IC_{50}: 983 nM) *in vitro*. Em consonância com características de seu *scaffold* quinolínico, o composto demonstrou significativa inibição da via de biossíntese de hemozoína no vacúolo digestivo do parasita, além de ligar-se diretamente a diferentes isoformas do transportador de resistência à cloroquina (PfCRT), marcador bem estabelecido de resistência a quinolinas. Diferentes abordagens para avaliar fenômenos de resistência cruzada ressaltaram a habilidade de LDT-623 de evadir mecanismos de resistência bem estabelecidos no campo. Primeiramente, um painel de cepas de *P. falciparum* geneticamente editadas mostrou que diversas mutações em *pfcrt* e *pfmdr1*, responsáveis pela resistência principalmente à cloroquina e piperaquina, não alteram significamente IC_{50} ou área sob a curva (AUC) na resposta fenotípica de LDT-623. Ainda, um *pool* de clones de *P. falciparum* quimiorresistentes com “códigos de barra” genômicos distintos mostrou que a pressão seletiva gerada pela incubação com LDT-623 *in vitro* não enriquece nenhuma das populações de parasitas, evidenciando a ausência de resistência cruzada com importantes marcadores de resistência antimalárica. Finalmente, tentativas sem sucesso de selecionar *in vitro* parasitas resistentes a LDT-623 o sugerem como fármaco “irresistível”. Os resultados não apenas ilustram a moderada, porém incomum, atividade antimalárica multiestágio de LDT-623, mas também reiteram a relevância da classe de 4-aminoquinolinas como opção terapêutica viável mesmo frente o ameaçador cenário de resistência antimalárica.

Palavras-chave: descoberta de fármacos, malária, antimalárico, resistência, 4-aminoquinolinas.

ABSTRACT

Responsible for over 600,000 deaths in 2021, malaria burdens health systems and causes significant morbidity in endemic countries. The circulation of parasite strains resistant to available drugs, especially those with reduced susceptibility to artemisinin-based combination therapies, makes it difficult to control the disease and highlights the need to search for new therapeutic alternatives. Within this context, the adoption of *in silico* strategies optimizes the identification of potential bioactive molecules, reducing the burden of phenotypic screening and increasing the chances of success. Therefore, combining chemoinformatics and experimental strategies, we employed a library of natural products and derivatives – a class that stands out as an abundant and diverse source of bioactive compounds – with the aim of identifying new antimalarial candidates. From virtual screening and chemical similarity analysis, we identified LDT-623, a 4-aminoquinoline with relevant *in vitro* antiplasmodial activity (IC_{50} PfDd2: 300 nM, selectivity index: 10). Transmission blocking activity on *P. falciparum* gametocytes (61.7% stage V inhibition at 5 μM) and *P. berghei* ookinetes (IC_{50}: 1.5 μM) was also observed, in addition to significant activity against *P. berghei* hepatic schizonts (IC*50*: 983 nM) *in vitro*. In agreement with quinolinic characteristics, the compound demonstrated significant inhibition of the hemozoin biosynthesis pathway in the parasite digestive vacuole, besides binding directly to different isoforms of the chloroquine resistance transporter (PfCRT), a well-established marker of quinoline resistance. Different approaches to evaluating the cross-resistance phenomena have highlighted the ability of LDT-623 to evade well-established resistance mechanisms in the field. First, a panel of genetically edited *P. falciparum* strains showed that diverse *pfcrt* and *pfmdr1* mutations, primarily responsible for resistance to chloroquine and piperaquine, do not significantly shift IC_{50} or area under the curve (AUC) in LDT-623's phenotypic response. Furthermore, a pool of chemoresistant *P. falciparum* clones genetically barcoded showed that the selective pressure generated by LDT-623 treatment *in vitro* does not enrich any of the parasite populations, evidencing the absence of cross-resistance with important markers of antimalarial resistance. Finally, failed attempts to select LDT-623-resistant parasites *in vitro* identify it as an "irresistible" drug. The results not only illustrate the moderate, yet unusual, multistage antimalarial activity of LDT-623 but also reiterate the relevance of the 4-aminoquinoline class as a viable therapeutic option even in the face of the threatening scenario of antimalarial resistance.

Keywords: drug discovery, malaria, antimalarial, resistance, 4-aminoquinolines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIAÇÕES, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

4-AQ	4-aminoquinolina
ACT	Tratamento combinado à base de artemisinina
AL	Arteméter + Lumefantrina
AQ	Amodiaquina
ASAQ	Artesunato + Amodiaquina
ASMQ	Artesunato + Mefloquina
ASSP	Artesunato + Sulfadoxina + Pirimetamina
CADD	Planejamento de fármacos assistido por computador (*computer aided drug design*)
CQ	Cloroquina
CSP	Proteína circunsporozoíta (*circumsporozoite protein*)
DHA-PPQ	Dihidroartemisinina + Piperaquina
dhfr	Gene que codifica a proteína dihidrofolato redutase
dhps	Gene que codifica a proteína dihidropteroato sintase
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FDA	Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drugs Administration Agency*)
IVIEWGA	evolução *in vitro* e análise do genoma (*in vitro* evolution and whole genome analysis)
MTT	Ensaio de redução de brometo de tetrazólio
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HTS	Ensaio de alta vazão (*highthroughput screening*)
k13	Gene que codifica a proteína kelch13

LMF	Lumefantrina
MFQ	Mefloquina
MIR	Mínimo inóculo de resistência
MMV	Medicines for Malaria Venture
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pironaridina + Artesunato
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Pf	*Plasmodium falciparum*
Pfcrt	Gene que codifica o transportador de resistência à cloroquina de *P. falciparum*
Pfmdr1	Gene que codifica a proteína 1 de multirresistência a drogas de *P. falciparum*
pH	Potencial hidrogeniônico
PND	Pironaridina
PPQ	Piperaquina
Pv	*Plasmodium vivax*
Pvcrt	Gene que codifica o transportador de resistência à cloroquina de *P. vivax*
QN	Quinino
QSAR	Relação quantitativa de estrutura e atividade (*quantitative structure-activity relationship*)
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SI	Índice de seletividade (*selectivity index*)
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polimorphism*)

TACT	Triplo tratamento combinado à base de artemisinina
TCP	Perfil alvo de candidato (*target candidate profile*)
TPP	Perfil alvo de produto (*target product profile*)
TRAP	Proteína adesiva relacionada à trombospondina
VD	Vacúolo digestivo
VS	Triagem virtual (*virtual screening*)
CO_2	Dióxido de carbono
CC_{50}	Concentração citotóxica
g	Gramas
h	Horas
IC_{50}	Concentração do composto que inibe 50% do crescimento da população de células
L	Litros
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitros
Min	Minutos
nM	Nanomolar
µM	Micromolar
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRIA DA DOENÇA E EPIDEMIOLOGIA

Provavelmente tão antiga quanto a humanidade, sabe-se que o primeiro registro de malária data do ano de 450 DC. Em 2001, cientistas identificaram traços de material genético do parasita causador da malária em um cemitério de crianças na região de Roma. Acredita-se que uma epidemia tenha devastado a região. Fazendo jus à severidade da doença que dizima a vida de centenas de milhares de indivíduos todos os anos, estudos estimam que a malária pode ter ceifado metade da população que já existiu em todo mundo (WHITFIELD, 2002). Até meados do século XIX, estudiosos acreditavam que a doença era associada a gases nocivos e pútridos advindos de regiões pantanosas – daí a etimologia do nome malária (em italiano, *mal'aria*, ou "mau ar").

A primeira descoberta experimental aconteceu em 1880, quando o médico francês Charles Alphonse Laveran reportou, pela primeira vez, parasitas no sangue de uma pessoa doente. O impacto científico das descobertas de Laveran lhe rendeu, em 1907, o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina por seu trabalho com protozoários causadores de doenças (HARRISON, 1978). De fato, a importância das descobertas científicas relacionadas à malária é refletida na quantidade de prêmios Nobel em Fisiologia e Medicina obtida por pesquisadores envolvidos neste campo no início do século XX. Além de Laveran, Camillo Golgi foi agraciado com o prêmio em 1906 por diferenciar formas da doença por periocidades febris distintas e Ronald Ross, em 1902, por identificar a transmissão do parasita entre humanos e mosquitos.

A malária inflige um significativo impacto socioeconômico nos países onde é endêmica (SACHS; MALANEY, 2002). Portanto, a doença tem sido uma das mais exploradas e estudadas no curso da humanidade. Grande parte de sua incidência ainda decai sobre regiões tropicais e subtropicais, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Com cerca de 619 mil mortes relacionadas à doença, estima-se que, em 2021, ocorreram cerca de 247 milhões de casos de malária em todo mundo, com aproximadamente 95% destes concentrados no continente africano, seguido do sudoeste asiático com 2% das ocorrências (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). A distribuição geográfica da incidência de casos de malária por país é mostrada na Figura 1.

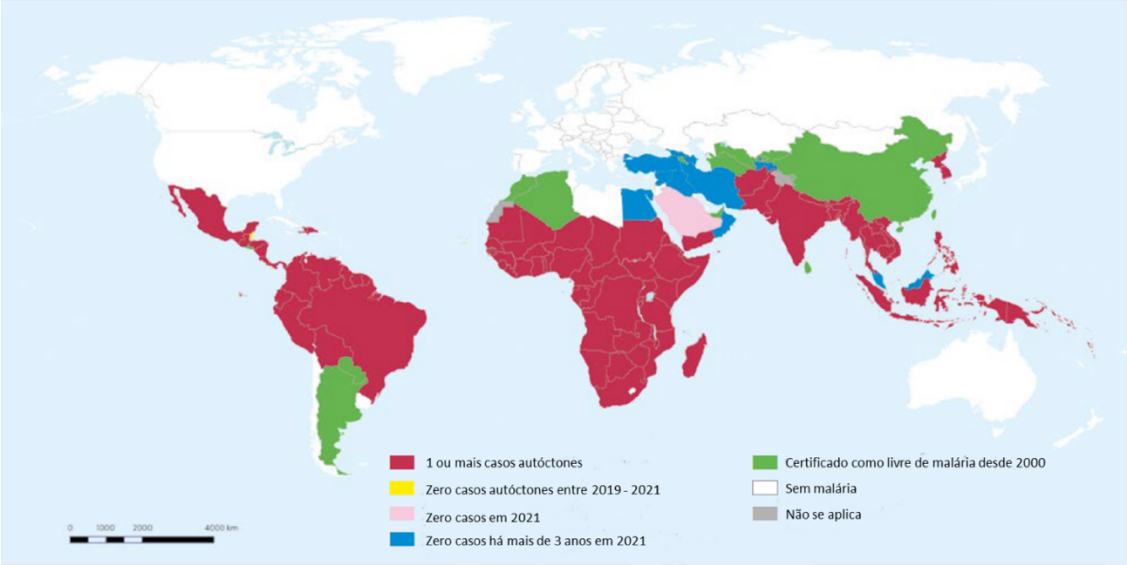


Figura 1. Países com casos de malária autóctones em 2000 e seu status em 2021. Adaptado de WHO 2022.

É importante ressaltar que conquistas alcançadas no controle da doença como a diminuição do número de países endêmicos de 108 para 84 entre 2000 e 2021 (GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022) são bastante frágeis e os significativos ganhos no combate à doença vistos no início do século acabaram sendo interrompidos nos últimos anos. Tal tendência pode ser explicada pelos diversos obstáculos no controle e redução de casos de malária a nível mundial como, por exemplo, a pandemia de COVID-19 que se instalou a partir do fim do ano de 2019. Correspondendo a previsões feitas com estudos matemáticos, a pandemia de COVID-19 estagnou significativamente esses ganhos à medida que a disseminação do vírus SARS-CoV-2 levou a uma sobrecarga nos sistemas de saúde, especialmente em ambientes com poucos recursos (ROGERSON et al., 2020). Durante os dois primeiros anos da pandemia de COVID-19, estima-se que 13,4 milhões de casos adicionais foram atribuídos a prejuízos causados pela pandemia (GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

No Brasil, o Ministério da Saúde reportou uma estimativa de aproximadamente 140 mil casos de malária em 2021, com mais de 80% destes causados por *Plasmodium vivax*. A região amazônica responde por 99% dos casos da doença no país, e certas regiões no Norte são consideradas de alto risco de transmissão (Figura 2). Fora da região amazônica, a maior parcela dos casos registrados é importada de outros estados ou até mesmo outros países.

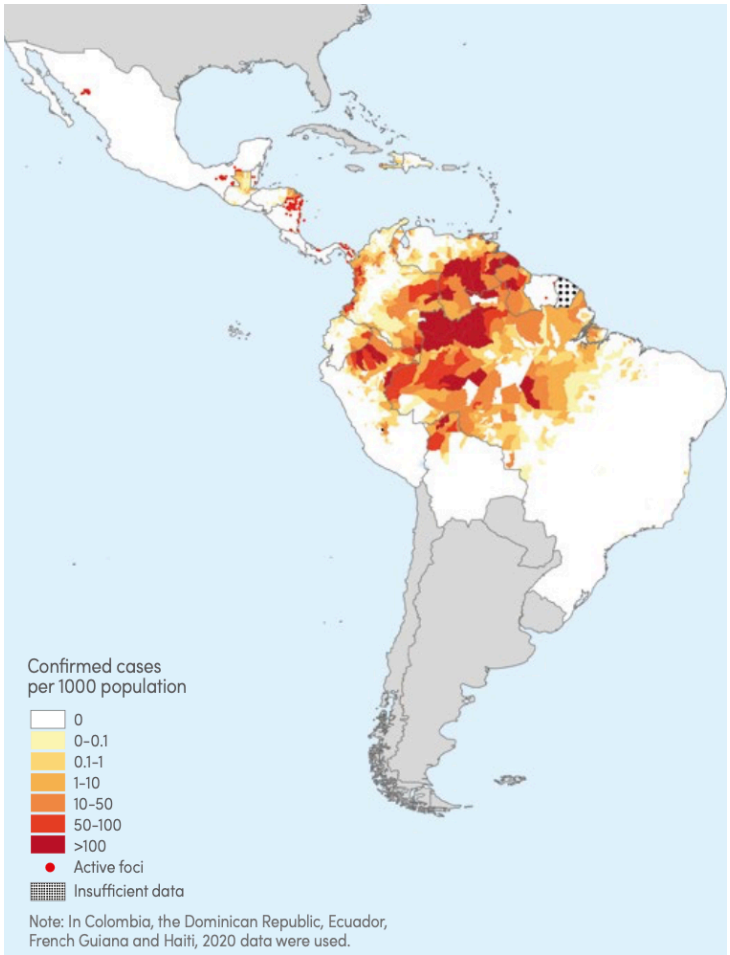


Figura 2. Incidência de malária por 1.000 habitantes no Brasil em 2021. Adaptado de (GENEVA: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

1.2. CICLO BIOLÓGICO DA MALÁRIA

A partir do repasto sanguíneo, fenômeno no qual o mosquito fêmea do gênero *Anopheles* injeta formas esporozoíticas do parasita na derme humana, o ciclo biológico do parasita se inicia em seu hospedeiro intermediário. Dentro de 30 a 60 minutos, estes esporozoítos invadem e alojam-se em hepatócitos, onde se multiplicam. A invasão de hepatócitos pelos esporozoítos é mediada por proteínas como a proteína circunsporozoíta (CSP) e a proteína adesiva relacionada à trombospondina (TRAP), cujos domínios ligam-se especificamente a proteoglicanos de heparina sulfato na superfície das membranas de hepatócitos (FREVERT et al., 1993). Quando o crescimento do parasita rompe o hepatócito, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e estão aptos a invadir hemácias, iniciando a fase sanguínea assexuada do ciclo na qual são desencadeados os sintomas clínicos da doença.

A invasão de eritrócitos pelos merozoítos de *Plasmodium* spp é um processo complexo que envolve diversos ligantes e receptores no parasita e na célula hospedeira. Os merozoítos primeiramente ligam-se à membrana do eritrócito utilizando-se de proteínas do tipo micronemas e secretando material de suas roptrias. Assim, o merozoíto inicia a penetração do eritrócito com sua extremidade apical. A partir da formação da estrutura de junção móvel, uma conexão estreita entre o parasita e a membrana do eritrócito, este progressivamente adentra a célula hospedeira a partir do pólo apical e a finaliza em sua extremidade posterior. A penetração ativa do parasita na célula do hospedeiro é acompanhada pela simultânea formação do vacúolo parasitóforo dentro do eritrócito (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011).

A depender da espécie de parasita em questão, o ciclo de replicação dos merozoítos dentro dos eritrócitos varia entre 24 a 72h desde a invasão até a hemólise. O merozoíto desenvolve-se em formas jovens que contém apenas uma cópia haploide do genoma nuclear (denominadas anéis) e, por conseguinte, formas maduras mais metabolicamente ativas (chamadas trofozoítos e esquizontes) (Figura 3) durante o processo denominado de esquizogonia, no qual um único parasita é capaz de multiplicar seu material genético, produzindo de 16 a 32 novos merozoítos.

As manifestações clínicas características de um quadro não-grave da doença (como febre, calafrios, cefaleia, náuseas e vômito) estão intimamente ligadas ao ciclo intraeritrocítico do parasita no hospedeiro humano, uma vez que episódios febris coincidem com períodos de pico de lise de eritrócitos pelo parasita e consequente liberação de toxinas e citocinas pró-inflamatórias.

Merozoítos liberados na corrente sanguínea após a ruptura dos eritrócitos podem infectar novas células e continuar seu ciclo de replicação assexuada no sangue. No entanto, em alguns casos, os parasitas podem diferenciar-se em formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos. Um dos principais fatores estabelecidos como cruciais no comprometimento dos parasitas com a gametocitogênese é o AP2-G, fator de transcrição essencial para a produção de gametócitos em *Plasmodium* spp (KAFSACK et al., 2014). Estes parasitas que se desenvolvem em gametócitos concentram-se em capilares da pele para que possam ser alcançados pelo mosquito num próximo episódio de repasto sanguíneo.

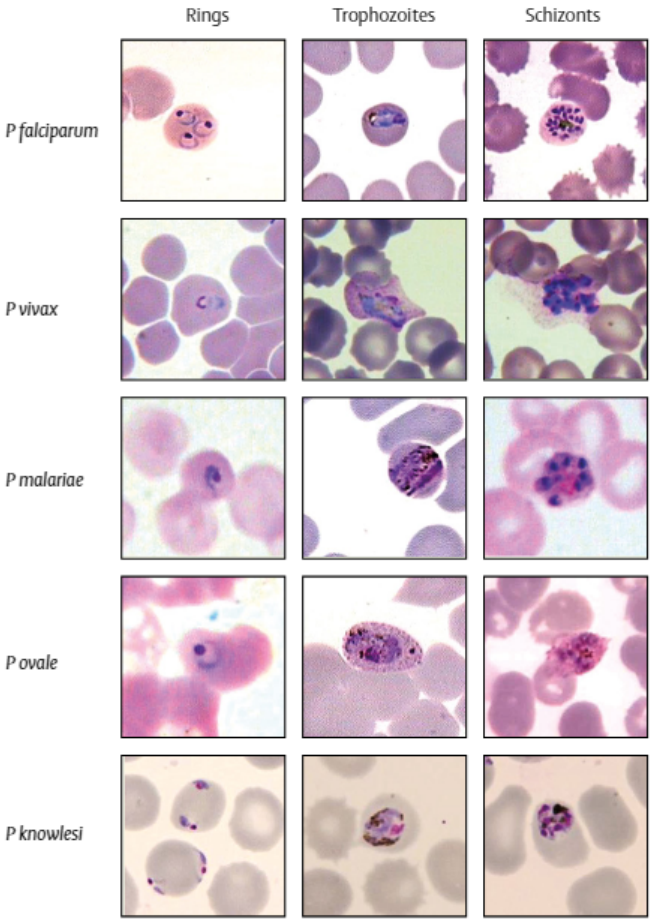


Figura 3. Esfregaços sanguíneos mostrando morfologia de diferentes formas da fase intraetritrocítica das cinco espécies de *Plasmodium* spp que causam malária em humanos (*P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale* e *P. knowlesi*). A primeira coluna destaca formas jovens do parasita (anéis de 0 a ~12h pós-invasão), enquanto a segunda coluna mostra trofozoítos maduros (de 12 a ~36h) e a última coluna, esquizontes (de 24 a 72h). Adaptado de (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

As fases sexuadas conseguintes ao ciclo do parasita no mosquito foram primeiramente observadas por Ronald Ross no século XIX utilizando o modelo de malária aviária (ROSS, 1897). Desta maneira, foi iniciada a elucidação do ciclo esporogônico da doença, associando sua transmissão de pessoas para mosquitos. Quando em circulação no hospedeiro humano, os gametócitos estão presos na fase G_0 do ciclo celular. Assim, a ativação de sua gametogênese no intestino do mosquito anofelino após o repasto sanguíneo ocorre mediante queda de temperatura combinada a um aumento de pH e presença de ácido xanturênico (BILLKER et al., 1998). Dentro de cerca de 10 minutos, cada gametócito masculino produz oito microgametas após três rodadas de mitose e os libera durante a exflagelação,

enquanto o gametócito feminino amadurece em um macrogameta. Macrogameta e microgameta se fundem para formar um zigoto diploide que, por sua vez, se elonga para tornar-se um oocineto móvel capaz de atravessar o lúmen do intestino do mosquito e alcança o epitélio já na forma de oocisto (SINDEN, 1983). Os oocistos passam por ciclos de replicação e formam esporozoítos, formas infectantes que, uma vez nas glândulas salivares do mosquito, o tornam apto a infectar um novo humano e continuar o ciclo biológico do parasita.

Vale ressaltar que o ciclo biológico de *P. vivax* (Figura 4) apresenta peculiaridades que o diferem daquele das demais espécies e impactam diretamente sua patogenicidade. Ao contrário de *P. falciparum*, que invade eritrócitos maduros, *P. vivax* apresenta uma preferência por reticulócitos (HEGNER, 1938), tropismo direcionado a reticulócitos CD71+ (MALLERET et al., 2015) e ainda, aqueles reticulócitos infectados apresentam capacidade de deformação para que possam evadir mecanismos da imunidade no baço (HANDAYANI et al., 2016). *Plasmodium vivax* apresenta uma capacidade de transmissão ainda maior, uma vez que gametócitos estão submicroscopicamente presentes na circulação poucos dias após o repasto sanguíneo (BOYD; KITCHEN, 1937). Ainda, indivíduos frequentemente expostos à infecção por *P. vivax* podem apresentar, seja mediante reinfecção ou recaída, casos assintomáticos mesmo com parasitemia periférica significativa (AUBURN et al., 2021). Ambos os casos mostram como a malária vivax possui mecanismos de tornar seu hospedeiro um *reservoir* de infecção. Finalmente, uma das características mais marcantes do ciclo de *P. vivax* é a presença de formas latentes no fígado, denominadas hipnozoítos, que são capazes de gerar nova infecção sem a necessidade de um novo repasto sanguíneo pelo mosquito (WELLS; BURROWS; BAIRD, 2010).

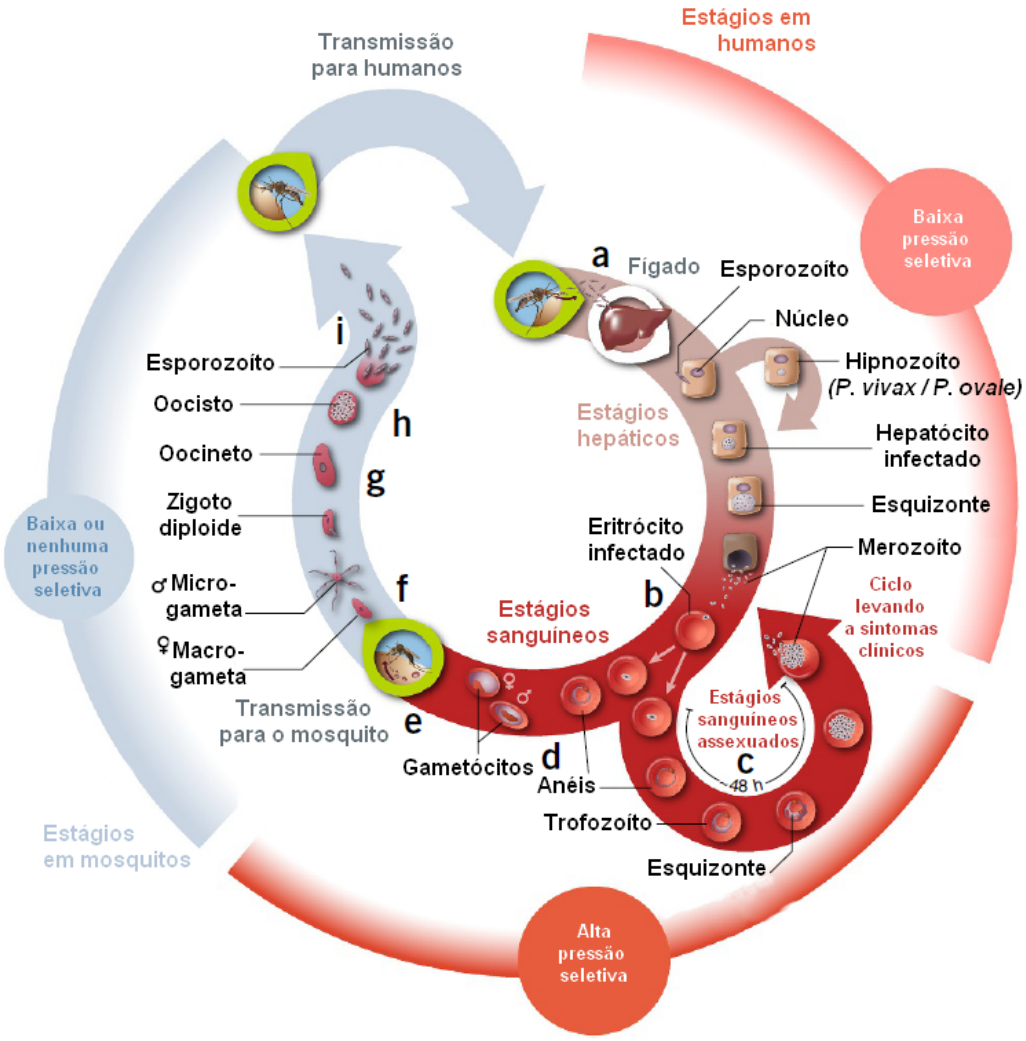


Figura 4. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*. (a) Na fase pré-eritrocítica do ciclo, esporozoítos são injetados na derme humana e alcançam o fígado para multiplicar-se em merozoítos que serão, mais tarde, (b) liberados na corrente sanguínea, iniciando a fase intraeritrocítica, ou entrarão em dormência, mantendo-se inativos no fígado como hipnozoítos. (c) Dentro das hemácias, os parasitas multiplicam-se assexuadamente em ciclos de crescimento parasitário, egresso e reinvasão. Nesta fase os sintomas clínicos da malária se apresentam. (d-e) Uma fração dos parasitas compromete-se com a reprodução sexuada, transformando-se em gametócitos que serão capturados pelo mosquito em um novo repasto sanguíneo. (f) No mosquito, gameteócitos são ativados em maturados em micro e macrogametas, que fundem-se formando um zigoto diploide (g) e, mais tarde, um oocineto móvel. O oocineto se desloca até o epitélio onde se aloja como oocisto (h), que se multiplica em esporozoítos infectantes capazes de alcançar as glândulas salivares do mosquito para que o ciclo seja mantido a partir de novo repasto sanguíneo. Adaptado de (BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017).

Além de suas singularidades patofisiológicas, *P. vivax* destaca-se pelo registro de infecções cada vez mais graves, quebrando o paradigma da malária vivax como

condição “benigna”. Em comparação à malária falciparum, *P. vivax* têm menos chances levar à morte, mas infecções recorrentes aumentam significativamente sua morbidade e podem causar retardo de crescimento, anemia e atraso de desenvolvimento em crianças (PRICE et al., 2007), além de perda fetal e peso reduzido ao nascer (NOSTEN et al., 1999), levando a um comprometimento direto do desenvolvimento infantil.

1.3. TRATAMENTO ANTIMALÁRICO

O tratamento quimioterápico constitui uma das principais estratégias de combate à malária e, uma vez que seu objetivo é a morte do parasita, a complexidade do ciclo biológico de *Plasmodium* spp permite diversos tipos de intervenções, como por exemplo: (I) interrupção da esquizogonia intraeritrocítica, (II) bloqueio da transmissão por formas sexuadas e, ainda, (III) destruição de formas hepáticas dormentes, no caso de *P. vivax* e *P. ovale*. Para tanto, diversas novas moléculas e combinações destas têm sido aprovadas para uso no tratamento antimalárico (Figura 5).

Diversas são as classes dos antimaláricos aprovados e disponíveis no mercado. Dentre estas, destacam-se algumas como as quinolinas, antibióticos, antifolatos, endoperóxidos etc. A classe das quinolinas é representada por 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), 8-aminoquinolinas (primaquina e tafenoquina), 4-quinolinametanol (mefloquina) e alcaloides contendo quinolina (quinina e quinidina). Uma das quinolinas de maior importância na quimioterapia antimalárica é a cloroquina. Considerada padrão-ouro no tratamento da malária durante mais de 40 anos devido a seu baixo custo e alta eficácia, seu extensivo uso selecionou cepas menos suscetíveis à sua ação em diversas regiões do mundo (COATNEY, 1963). O mecanismo de ação da cloroquina em *Plasmodium* spp é baseada na ação da droga sobre a detoxificação do heme, que acontece no vacúolo parasitóforo. Os estágios assexuados maduros do parasita metabolizam a hemoglobina e a transformam em um subproduto tóxico, o heme. Para subverter a toxicidade do heme, estes o polimerizam em hemozoína, estrutura inerte. Como base fraca, a cloroquina é desprotonada e se acumula no vacúolo parasitóforo, um compartimento ácido, sequestrando heme e impedindo sua polimerização em hemozoína, consequentemente aumentando a concentração do subproduto tóxico dentro do vacúolo parasitóforo e levando à morte do parasita (CRAVO et al., 2006).

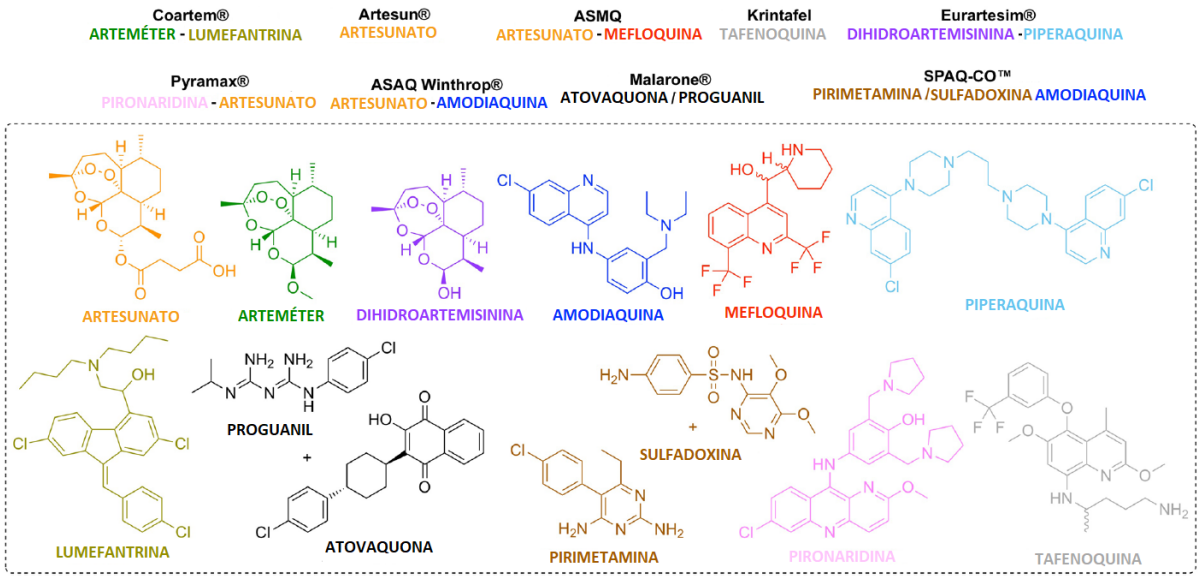


Figura 5. Novas combinações/formulações de medicamentos que foram aprovadas para uso. A marca do medicamento (em negrito) e a combinação do medicamento (com código de cores para as estruturas) são listadas. Adaptado de (TSE; KORSIK; TODD, 2019).

Outra classe de antimaláricos bastante importante é a dos antifolatos. Diferentemente de humanos, parasitas do gênero *Plasmodium* spp são capazes de biossintetizar folato e, assim, a via de síntese de folato é um alvo terapêutico bastante interessante. Assim, esta classe de antimaláricos, os antifolatos, são drogas que agem inibindo de forma competititva a biossíntese de folato, que é essencial para a síntese de pirimidinas e consequentemente, para a replicação do DNA no parasita. Dentre os principais representantes dos antifolatos estão a combinação de sulfadoxina-pirimetamina, que são medicamentos que agem inibindo, respectivamente, a dihidropteroato sintase (*dhps*) e a dihidrofolato redutase (*dhfr*), enzimas essenciais para a via de síntese de folato (ABDUL-GHANI; FARAG; ALLAM, 2013).

A classe de antimaláricos mais eficazes atualmente é a de terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs) (Tabela 1), que usam um derivado de artemisinina (molécula de ação rápida) em combinação com um composto complementar (molécula de ação longa com mecanismo de ação distinto). O uso de terapias combinadas, que diminui a possibilidade da seleção de cepas de parasita quimiorresistentes, explica o quase total abandono da monoterapia no tratamento contra a malária (ORGANIZATION, 2010).

Tabela 1. ACTs aprovados pela EMA ou FDA.

Princípios ativos	Nome do produto	Formulação
Arteméter (20 mg), Lumefantrina (120 mg)	Coartem; Coartem-Dispersível	Comprimido (adulto), comprimidos dispersíveis com sabor (pediátrico)
Artesunato (100 mg), Amodiaquina (270 mg)	Coarsucam; ASAQ-Winthrop	Comprimidos dispersíveis para todas as idades
Diidroartemisina (40 mg), Piperaquina (320 mg)	Eurartesim; Artekin; Duo-Cotecxin	Comprimido (adulto, pediátrico), formulação dispersível para crianças
Pironaridina (180 mg), Artesunato (60 mg)	Pyramax	Comprimido (adulto), sachê com grânulos (pediátrico)
Mefloquina, (200 mg), Artesunato (100 mg),	ASMQ; Artequin	Comprimido (adulto, pediátrico)

Adaptado de (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015).

Além do tratamento a pacientes com quadros de malária já estabelecidos, o arsenal antimalárico também conta com medicamentos profiláticos como o Malarone, combinação de atovaquona e proguanil para prevenção da doença em viajantes com destino a áreas endêmicas. A prevenção se dá pela ação da atovaquona contra estágios hepáticos do parasita, impedindo o estabelecimento da fase sanguínea da doença. A atovaquona, por sua vez, age inibindo especificamente a cadeia de transporte de elétrons no complexo bc1 (FRY; PUDNEY, 1992), resultando na perda de função mitocondrial.

Em relação à malária causada por *P. vivax*, desde meados da década de 1940 a cloroquina tem sido o tratamento de escolha para infecções causada por esta parasita. A cloroquina segue sendo um eficiente esquizonticida contra a malária vivax, exceto na Indonésia e Papua Nova Guiné, onde a resistência à cloroquina já está bem estabelecida. Contra a malária vivax, ACTs também são altamente efetivos e constituem uma alternativa à cloroquina (CHU; WHITE, 2021). O tratamento para a malária vivax impõe ainda o desafio adicional de controlar formas hepáticas dormentes – os chamados hipnozoítos - que são insensíveis a grande parte dos medicamentos antimaláricos e, adicionalmente, não são formas parasitárias passíveis

de fácil diagnóstico (VON SEIDLEIN; WHITE, 2021). Assim, apenas primaquina e tafenoquina, 8-aminoquinolinas, são moléculas capazes de combater estas formas dormentes e evitar recaídas, levando à chamada “cura radical”. No entanto, a capacidade das 8-aminoquinolinas de causar significativa hemólise em indivíduos com deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (RECHT et al., 2015)limita a implementação da cura radical, uma vez que a frequência genética desta enzimopatia pode variar de 3% até 35% em países endêmicos para a malária vivax (HOWES et al., 2015).

O tratamento da malária no Brasil é guiado por diretrizes estabelecidas pelo Ministério da Saúde, que podem ser consultadas no *Guia prático de tratamento da malária no Brasi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2010). Seguindo o guia, a decisão de como tratar o indivíduo acometido pela malária deve ser precedida de anamnese e diagnóstico precisos que identifiquem fatores como espécie infectante, idade do paciente, histórico de exposição anterior, gravidade da doença e condições associadas como gravidez e outros problemas de saúde.

1.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS

Assim como grande parte dos antimicrobianos, o sucesso do emprego de antimaláricos têm muitos desafios: seu uso extensivo e, às vezes, em doses subterapêuticas tem favorecido a evolução e disseminação de linhagens de *Plasmodium* quimiorresistentes. Dentre as cinco espécies do parasita capazes de infectar humanos, três delas (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*) já são conhecidas por apresentarem registros de resistência a medicamentos antimaláricos. De acordo com a OMS, este fenótipo de resistência é caracterizado, *in vitro*, pela habilidade do parasita de sobreviver a uma certa concentração de antimalárico sob condições-padrão de cultura. A resistência pode também se manifestar clinicamente como um tempo mais longo de remoção dos parasitas do organismo de um paciente infectado ou até mesmo, em casos de maior severidade, como falha no tratamento após administração de medicamentos antimaláricos.

O curto intervalo de tempo entre a introdução de antimaláricos no mercado e os primeiros registros de surgimento de resistência mostram a dimensão do desafio que a quimiorresistência representa ao controle da doença (Figura 6). Enquanto no caso

da cloroquina, mais de uma década separaram sua introdução do primeiro relato de cepas resistentes no campo, a resistência ao proguanil apareceu no ano seguinte de sua disponibilidade. Em casos ainda mais alarmantes, notificações de resistência à atovaquona e à combinação de sulfadoxina-pirimetamina apareceram no mesmo ano em que estes medicamentos foram liberados para uso clínico (BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017).

A sensibilidade de isolados de *Plasmodium* spp a medicamentos antimaláricos é geralmente avaliada por testes de eficácia terapêutica. No entanto, estes testes já não são os mais adequados para estudos epidemiológicos de larga escala. Assim, o uso de marcadores moleculares para identificar alterações genéticas relacionadas à resistência a antimaláricos (Tabela 2) permite a análise de um número muito maior de amostras em menos tempo, facilitando o monitoramento de taxas de susceptibilidade a diversos medicamentos disponíveis nas áreas endêmicas.

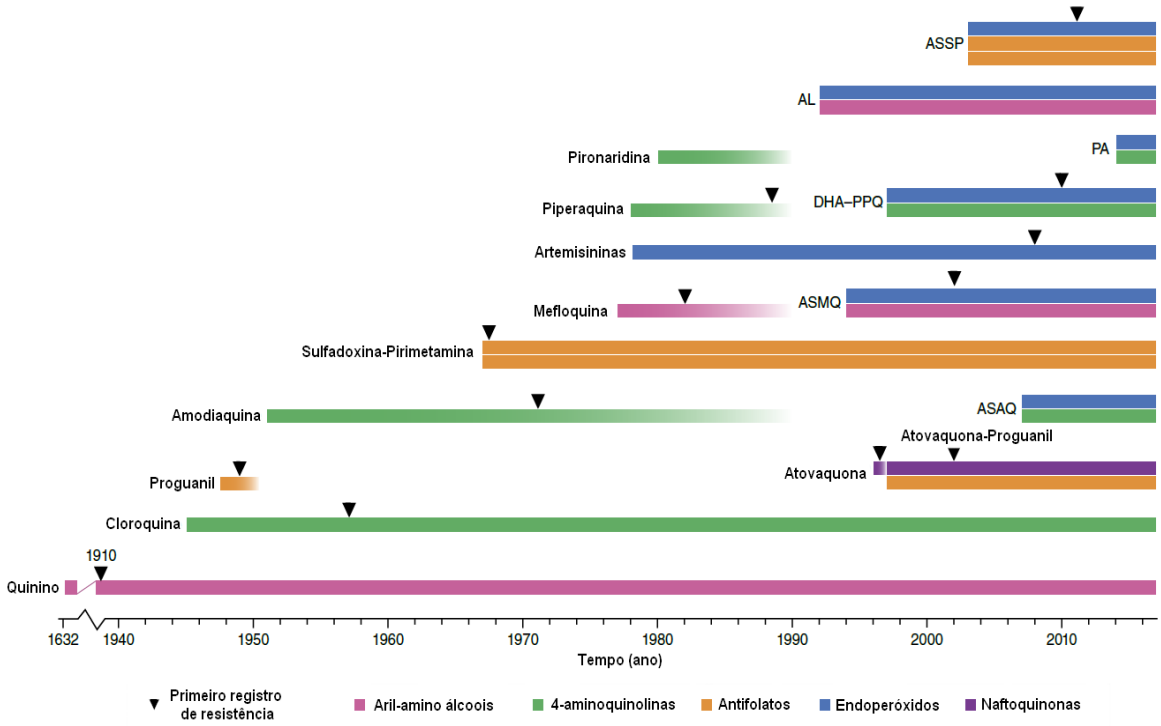


Figura 6. Histórico da introdução dos principais antimaláricos e do primeiro surgimento de resistência. Barras simples referem-se a monoterapias; barras duplas e triplas denotam terapias combinadas. As cores referem-se às classes químicas às quais pertencem os antimaláricos. AL, arteméter + lumefantrina; ASMQ, artesunato + mefloquina; ASAQ, artesunato + amodiaquina; DHA-PPQ, di-hidroartemisinina + piperaquina; PA, artesunato + pironaridina; ASSP, artesunato + SP. Adaptado de (BLASCO; LEROY; FIDOCK, 2017).

Tabela 2. Medicamentos antimaláricos e marcadores associados de resistência em parasitas de estágio sangüíneo assexuado de *Plasmodium falciparum*.

Antimalárico (abreviação)	**Vias afetadas ou mecanismos**	**Alteração genética associada à resistência clínica**
Endoperóxidos		
Artemisininas (ARTs): artesunato (AS), arteméter (ATM), dihidroartemisinina (DHA)	Pleiotrópico; desencadeia resposta ao estresse; alquila e oxida heme e lipídios	Mutações em *k13*
4-aminoquinolinas		
Cloroquina (CQ)	Detoxificação do heme no vacúolo digestivo	Mutações em *pfcrt* e *pfmdr1*
Amodiaquina (AQ)	Detoxificação do heme no vacúolo digestivo	Mutações em *pfcrt* e *pfmdr1*
Piperaquina (PPQ)	Detoxificação do heme no vacúolo digestivo	Amplificações de plasmepsinas I e II, mutações em *pfcrt*
Pironaridina (PND)	Detoxificação do heme no vacúolo digestivo	Nenhuma observada
Aril-amino álcoois		
Quinina (QN)	Inibição da importação de hemoglobina e/ou detoxificação do heme	Mutações em *pfcrt*
Lumefantrina (LMF)	Inibição da importação de hemoglobina e/ou detoxificação do heme	Amplificação de *pfmdr1*
Mefloquina (MFQ)	Inibição da importação de hemoglobina e/ou detoxificação do heme	Amplificação de *pfmdr1*
Antifolatos		
Pirimetamina (PYR) + Sulfadoxina (SDX)	Biossíntese de folato no citosol	Mutações em *dhfr* e *dhps*
Proguanil (PG)	Biossíntese de folato no citosol	Mutações em *dhfr* e *dhps*
Naftoquinonas		
Atovaquona (ATQ)	Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial para síntese de pirimidina	Mutações em *cytb*
8-aminoquinolinas		
Primaquina (PQ)	Desconhecido	Nenhuma observada
Tafenoquina	Desconhecido	Nenhuma observada

k13: gene *Kelch-like*; *cytb*: citocromo b; *dhfr*: dihidrofolato redutase; *dhps*: dihidropteroato sintase; *pfcrt*: transportador de resistência à cloroquina de *P. falciparum*; *pfmdr1*: gene de resistência a multidrogas-1 de *P. falciparum*. Adaptado de (ROSS; FIDOCK, 2019).

Para melhor entender como a resistência parasitária funciona a nível molecular, investiga-se alterações genéticas e consequentes disfunções proteicas em cepas de parasita resistentes a determinado fármaco. Assim, o principal marcador molecular associado à resistência à cloroquina são mutações no gene *pfcrt* (gene que codifica o transportador de resistência à cloroquina em *P. falciparum*) (Figura 7). Em parasitas resistentes, este transportador sofre, dentre outras, uma mutação no códon 76 que troca a lisina, um aminoácido positivo, por uma treonina, um aminoácido neutro (FIDOCK et al., 2000), tornando-o capaz de transportar cloroquina na forma protonada. Portanto, o CRT mutado é capaz de bombear cloroquina para fora do vacúolo digestivo, diminuindo sua concentração interna e permitindo que o parasita converta o heme, que lhe é tóxico, em hemozoína (KROGSTAD et al., 1987), corrompendo a ação da droga. Este mecanismo de resistência, embora desencadeado por outro conjunto de mutações pontuais, é também compartilhado pela piperaquina, uma bisquinolina que compõe uma das alternativas terapêuticas dentro dos ACTs. Outra importante proteína envolvida em mecanismos de resistência associados a diversos antimaláricos, entre eles quinolinas como a cloroquina, é o transportador *pfmdr1*, gene de multirresistência a drogas 1 de *P. falciparum* (SIDHU et al., 2006).

Sabe-se também que mutações pontuais nos genes *dhfr* e *dhps* de *P. falciparum* são associadas à resistência ou falha no tratamento antimalárico com fármacos da classe de antifolatos, confirmando a importância destes genes como marcadores moleculares de resistência. Diversas mutações do tipo polimorfismos de um nucleotídeo (SNPs) são reportadas no gene que codifica a *pfdhfr*. A troca de uma serina do códon 108 por uma asparagina (mutação S108N), é responsável pela diminuição da afinidade de ligação de drogas inibidoras (SIRAWARAPORN et al., 1997) e está diretamente relacionada à resistência à pirimetamina (ZOLG et al., 1989).

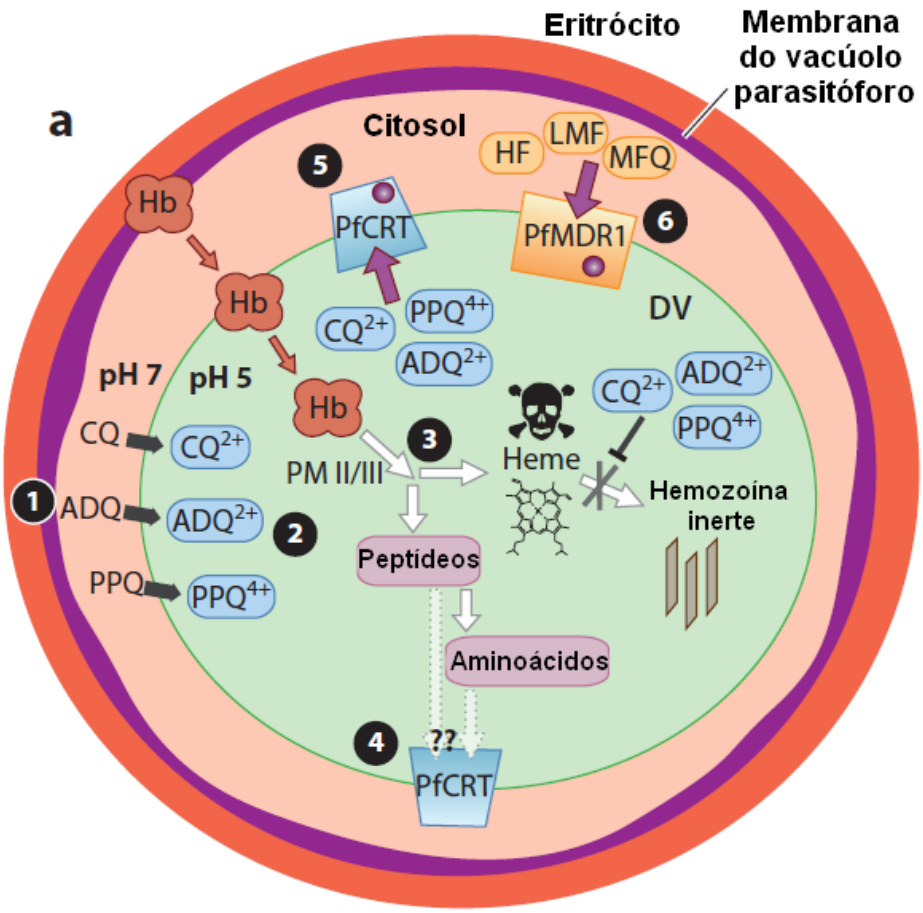


Figura 7. Mecanismo de ação de quinolinas e mecanismos de resistência mediados por PfCRT e PfMDR1 em estágio sanguíneo assexuado de *P. falciparum*. (1) Antimaláricos à base de quinolina, incluindo cloroquina, amodiaquina e piperaquina, concentram-se do citosol do parasita (pH neutro de ~7) para o vacúolo digestivo (pH ácido de ~5,2). (2) Uma vez dentro do vacúolo digestivo (VD), estas drogas tipo base fraca são protonadas, tornando-se incapazes de se difundir passivamente através da membrana do VD. (3) À medida que moléculas adicionais se difundem em direção ao VD, suas formas protonadas ligam-se às altas concentrações de heme livre (subproduto tóxico que resulta da degradação da hemoglobina do hospedeiro), bem como aos sulcos nas superfícies dos cristais de hemozoína. A combinação de retenção pelo pH e ligação ao heme é responsável pelo acúmulo de drogas quinolínicas dentro do VD. (4) Acredita-se que PfCRT esteja envolvida no transporte de peptídeos liberados pela digestão da hemoglobina no citosol do parasita. (5) Em parasitas resistentes a drogas, as mutações em PfCRT permitem o efluxo de moléculas de drogas protonadas para fora do VD. (6) Mutações no transportador de membrana PfMDR1 também podem influenciar a suscetibilidade do parasita a esses compostos. ADQ, amodiaquina; CQ, cloroquina; VD vacúolo digestivo; Hb, hemoglobina; HF, halofantrina; LMF, lumefantrina; MFQ, mefloquina; PfCRT, transportador de resistência à cloroquina de *P. falciparum*; PfMDR1, transportador de resistência 1 a múltiplas drogas de *P. falciparum*; PPQ, piperaquina. Adaptado de (WICHT; MOK; FIDOCK, 2020).

Mesmo a linha de frente para o tratamento contra *P. falciparum* já enfrenta problemas relacionados a suscetibilidade parasitária diminuída. Os primeiros sinais do surgimento de parasitas *P. falciparum* menos suscetíveis à artemisinina foram registrados na província de Pailin, no Camboja, há mais de uma década (NOEDL et al., 2008). Polimorfismos na proteína K13 que carrega o domínio kelch estão associados com resistência à artemisinina (ARIEY et al., 2014). Em recentes ensaios clínicos para avaliar eficácia de ACTs em Ruanda, foram identificadas amostras pré-tratamento que possuíam mutações em *pfkelch13* que, mais tarde, foram confirmadas como capazes de levar à resistência à artemisinina *in vitro* (UWIMANA et al., 2020). Estes dados recentes fornecem evidências do provável surgimento de resistência à artemisinina na África, o que pode comprometer seriamente o sucesso da quimioterapia antimalárica contra *P. falciparum* na região Subsaariana.

Em relação a *P. vivax*, cepas menos suscetíveis à ação da cloroquina já foram identificadas no início do século (BAIRD, 2004). No Brasil, onde a cloroquina é o tratamento de escolha para casos de malária vivax (COATNEY, 1963)a ocorrência simultânea de resistência à cloroquina e casos de malária vivax severa sugerem uma possível associação entre gravidade e resistência (LACERDA et al., 2012). Sugere-se que esta resistência esteja associada à alta frequência de expressão de *pvcrt* (SILVA et al., 2018) gene ortógolo de *pfcrt*, marcador molecular bem definido para resistência à cloroquina em *P. falciparum* (SINGH; SINGH; URHEHAR, 2016). Adicionalmente, foram estabelecidas correlações entre resistência à cloroquina em *P. vivax* e polimorfismos de sequência no gene *pvmdr1* (gene de multirresistência a drogas 1 de *P. vivax*) - um polimorfismo em *pvmdr1* conferindo uma mutação Y976F (alteração de aminoácido tirosina para fenilalanina) mostrou-se presente em todos os pacientes estudados na Papua Nova Guiné, área de alta prevalência de resistência à cloroquina. Em contraste, o mesmo polimorfismo foi identificado em apenas 25% dos isolados estudados na região da Tailândia, onde o tratamento com cloroquina ainda apresenta alguma eficácia (PRICE et al., 2012) – o que corrobora o papel desta proteína no estabelecimento da resistência à cloroquina em *P. vivax*.

O problema da resistência aos antimaláricos disponíveis é agravado pela resistência cruzada, fenômeno possível entre drogas que pertencem a uma mesma classe química ou que possuem modos de ação similares. Adicionalmente, a

multirresistência de *P. falciparum* é observada quando o parasita é resistente a mais de dois compostos antimaláricos de diferentes classes químicas e modos de ação distintos. Com o objetivo de identificar estes modos de ação distintos, uma abordagem que tem sido utilizada com sucesso para identificar alvos de fármacos no parasita é conhecido como evolução *in vitro* e análise do genoma completo (IVIEWGA) (LUTH et al., 2018). Neste método, culturas de *P. falciparum* são expostas a pressão de drogas até que populações de parasitas resistentes a drogas emerjam, levando a deslocamentos nas curvas fenotípicas de dose-resposta que caracterizam a resistência *in vitro*. Os genomas de parasitas resistentes são sequenciados e comparados ao de linhagem parental sensível, com o objetivo de identificar alterações genômicas (polimorfismos de nucleotídeo único e/ou variações no número de cópias) que possam estar envolvidas em alvos de drogas (OKOMBO et al., 2021). Essa metodologia já revelou diversos alvos "drogáveis" em *P. falciparum*, como PfATP4 (JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2014), PI4K (PAQUET et al., 2017), farnesiltransferase (COWELL; WINZELER, 2018), acetil-CoA sintetase (SUMMERS et al., 2022), entre outros. No entanto, essa abordagem é passível de falha na geração de populações de parastias resistentes – o que não é necessariamente um resultado negativo. Neste caso, a molécula investigada pode ser chamada de "irresistível" (COREY et al., 2016; YANG et al., 2021), pois é menos provável que resulte na seleção de resistência em contexto clínico.

Frente, portanto, à rápida e constante seleção de cepas quimiorresistentes, destaca-se a importância de desvendar os mecanismos moleculares de resistência desenvolvidos pela parasita afim de auxiliar no desenvolvimento de potenciais novos fármacos antimaláricos com mecanismos de ação ou alvos moleculares nunca propostos.

1.5. DESCOBERTA DE FÁRMACOS NA MALÁRIA

A meta de alcançar a erradicação da malária estimulou o desenvolvimento de novos métodos de triagem de alto vazão (*high-throughput screening*), buscando por drogas que são ativas não apenas no estágio sanguíneo assexuado, mas também nos estágios exoeritrocíticos e de transmissão (HOVLID; WINZELER, 2016). O sucesso destas triagens baseia-se na implementação de ensaios robustos, escaláveis

e reprodutíveis. Estratégias atuais de descoberta de novos fármacos integram diferentes abordagens: enquanto o enfoque molecular apoia-se predominantemente em hipóteses baseadas em alvos proteicos pré-definidos, a perspectiva empírica é também denominada fenotípica e analisa parâmetros fenotípicos como sobrevivência após a exposição de culturas de parasitas a potenciais candidatos a drogas (SWINNEY, 2013).

No *pipeline* de descoberta de novos fármacos antimaláricos, as primeiras grandes triagens de potenciais drogas candidatas foram realizadas em estágio sanguíneo assexuado de *P. falciparum* principalmente devido à facilidade de sua manutenção *in vitro* por longos períodos e pelo fácil manuseio do cultivo, feito em suspensões de eritrócitos. Diversos compostos identificados neste tipo de triagens têm sido avaliados e otimizados chegando até mesmo a ensaios clínicos, como é o caso da espirindolona KAE609 – cujo alvo molecular acredita-se ser a ATPase4 de *P. falciparum.* Hoje em ensaios clínicos avançados, esta molécula tem o potencial de ser a primeira nova classe de *scaffold* estrutural a ser introduzida no espaço químico dos antimaláricos nas últimas década (BOUWMAN et al., 2020; GOLDGOF et al., 2016). Atualmente, existem trezepotenciais moléculas antimaláricas candidatas nas fases translacional e exploratória de pacientes em ensaios clínicos (Medicines for Malaria Venture - MMV, 2023). Embora à primeira vista isso possa parecer encorajador, estima-se que dezoito moléculas candidatas devam ser avaliadas clinicamente para cada uma lançada no mercado (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015).

Apesar de os esforços iniciais de HTS concentraram-se majoritariamente na fase assexuada e facilmente cultivável do parasita, há um interesse cada vez maior na identificação de drogas com atividade em fases diferentes ou múltiplas do ciclo de vida do parasita (POONAM et al., 2018). Um foco, portanto, em erradicação da malária em detrimento do controle da doença requer a priorização de diferentes tipos de medicamentos. Para tanto, o estabelecimento de *target candidate profiles* (TCPs) e *target product profile* (TPPs) é uma ferramenta estratégica para guiar a descoberta de novos fármacos antimaláricos, uma vez que cria uma linguagem comum para o desenvolvimento de compostos líderes e candidatos pré-clínicos (BURROWS et al., 2017).

Considerando-se etapas iniciais ou intermediárias do *pipeline* de desenvolvimento de antimaláricos, os TCPs são tipos de moléculas individuais que constituem candidatas aos ensaios pré-clínicos (Figura 8). Estas dividem-se em diversas classes, que variam de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita na qual atuam. Enquanto TCP-1 classifica moléculas que produzem cura esterilizante, ou seja, eliminem por completo a parasitemia em estágios sanguíneos assexuados, TCP-3 trata de moléculas com atividades contra formas hipnozoítos, as formas dormentes, principalmente de *P. vivax*. TCP-4, por sua vez, são moléculas com atividades contra esquizontes hepáticos. Em relação à capacidade de bloqueio de transmissão, TCP-5 concentra moléculas capazes de inibir gametócitos e gametas do parasita e TCP-6 foca naquelas que têm como alvo o mosquito vetor da doença (BURROWS et al., 2017). Idealmente, novos compostos devem ter como alvo mais de um estágio do ciclo de vida de *Plasmodium* spp.

Os tipos de TPPs, ou medicamentos finais com formulação apropriada, por sua vez, se dividem em duas categorias: TPP-1, que maneja casos já existentes a partir do tratamento de malária não-complicada e aguda em crianças e adultos; e TPP-2, que prioriza a prevenção da doença em indivíduos migrando para áreas de alta endemicidade ou durante epidemias.

Frente à alta taxa de surgimento de resistência a medicamentos antimaláricos, a OMS determinou novas práticas terapêuticas que praticamente levaram ao abandono de monoterapias no tratamento da malária. Assim, quaisquer novos medicamentos antimaláricos introduzidos no mercado devem constituir terapia combinada com um antimalárico já estabelecido e seguro, a fim de evitar possíveis efeitos adversos desconhecidos oriundos da combinação de dois novos medicamentos. Assim, qualquer nova combinação de antimaláricos deve ter eficácia em bloqueio de transmissão por si só ou ser compatível com baixa dose de primaquina, que é o regime aprovado pela OMS para bloqueio de transmissão da malária (BURROWS et al., 2017).

Em suma, TCPs e TPPs correlacionam-se de maneira que ambos tipos de TPPs, ou medicamentos antimaláricos, requerem uma combinação de atividades biológicas que são definidas pelos TCPs. Mesmo que uma única molécula possa alcançar mais do que um TCP por apresentar atividade em mais de uma fase do ciclo do parasita,

quaisquer novos medicamentos combinados devem ter atividade suficiente para juntos alcançarem um TPP de alto nível.

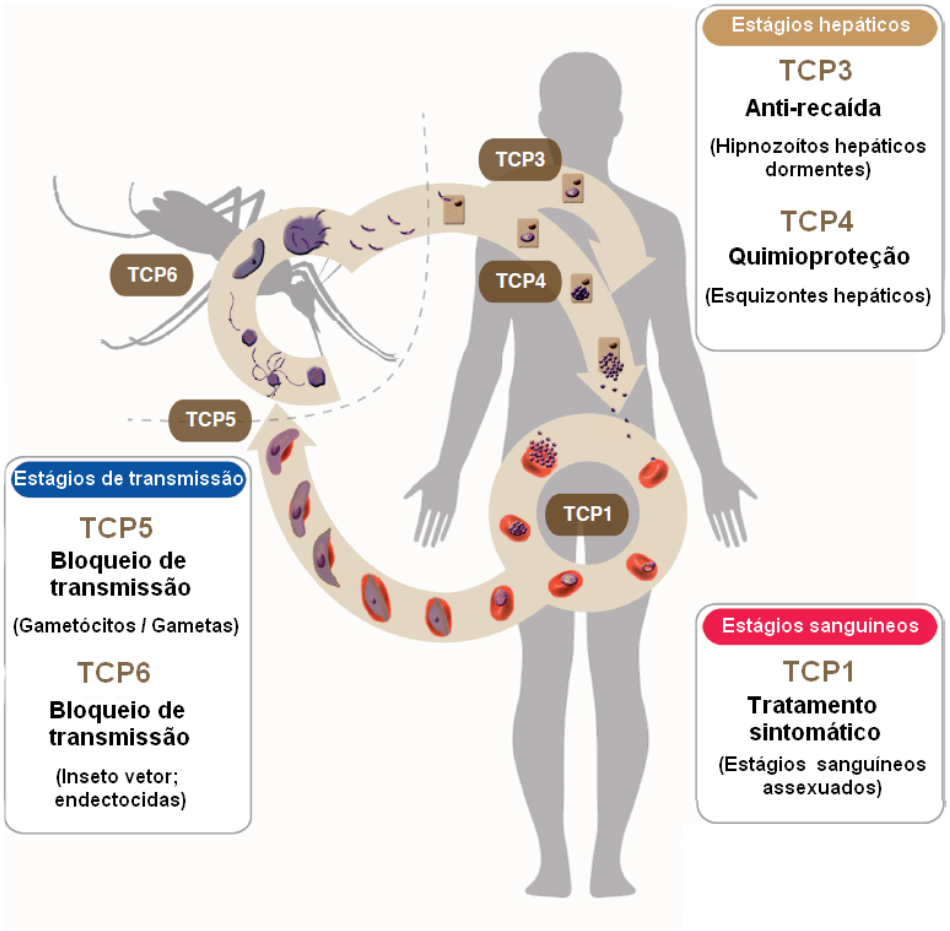


Figura 8. O ciclo de vida do parasita *P. vivax* com destaque a possíveis intervenções antimaláricas relacionadas com seus perfis de candidato alvo (*target candidate profile*, TCP) para o desenvolvimento de novas drogas. Adaptado de (YAHIYA et al., 2019).

1.6. ESTRATÉGIAS COMPUTACIONAIS

Nas últimas décadas, novas moléculas com potencial antimalárico foram mais comumente descobertas utilizando abordagens de triagem fenotípica (GAMO et al., 2010b). Acredita-se que mais de 7 milhões de moléculas já tenham sido testadas contra estágio assexuados de *P. falciparum* (YANG et al., 2021). De fato, por muito tempo a descoberta de novos fármacos com potencial atividade biológica dependeu exclusivamente de ciclos de testes fenotípicos.

No entanto, o desenvolvimento e expansão da química medicinal aliados ao planejamento de fármacos auxiliado por computador (*computer-aided drug design*) levaram a uma significativa otimização do processo de descoberta de fármacos a partir da combinação de desenho racional de moléculas *in silico* com triagens experimentais *in vitro*. Uma das técnicas de CADD mais difundidas utilizadas na descoberta de novos fármacos é conhecida como relações quantitativas entre estrutura química e atividade (QSAR, do inglês *quantitative structure-activity relationships*), que lança mão da inteligência artificial para predizer potencial atividade biológica de compostos químicos (Figura 9). De maneira simplificada, QSAR é um método eficiente para construir modelos matemáticos que correlacionam estrutura química de uma molécula com propriedades biológicas ou toxicológicas utilizando regressão e técnicas de classificação (CHERKASOV et al., 2014). As principais aplicações de estudos de QSAR em química medicinal consistem na identificação e priorização de novos compostos bioativos nas fases iniciais de pesquisa e descoberta de fármacos, evitando, assim, falhas posteriores nas fases mais avançadas de estudos pré-clínicos e clínicos. Assim, o emprego de CADD no contexto da descoberta de fármacos não apenas reduz custos e tempo bem como aumenta probabilidade de sucesso e segurança (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

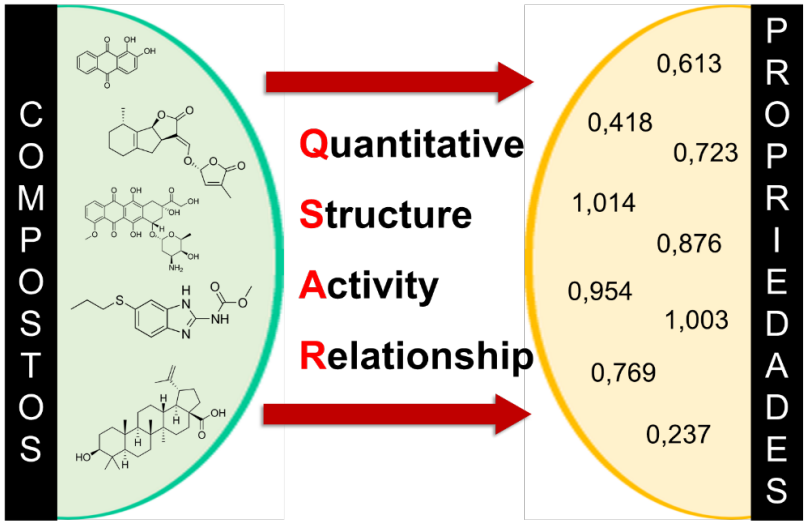


Figura 9. O processo de desenvolvimento do modelo QSAR. Adaptado de (TROPSHA, 2010).

A triagem virtual (*virtual* screening, VS) permite predizer o potencial de uma molécula em se tornar um fármaco efetivo a partir da análise de características físico-químicas como estrutura molecular, coeficientes de partição, área de superfície polar topológica, entre outras que podem influenciar diretamente sua atividade biológica (PILON et al., 2017). Basicamente, a VS pode ser comparada a um funil no qual uma extensa base de dados de estruturas químicas é reduzida a um número seleto e mais palpável de compostos que podem ser testados experimentalmente com maior chance de sucesso (NEVES et al., 2018). Vale ressaltar que o desenvolvimento de modelos de QSAR, que são retroalimentados e construídos com base em dados experimentais, só foi possível a partir da explosão de quantidade de dados resultante de tecnologias de triagens de alto rendimento) em ensaios fenotípicos. E, uma vez que a aplicação de triagens virtuais baseadas em modelos de QSAR permite avaliar experimentalmente melhores moléculas, este sistema de integração de dados se retroalimenta, levando à otimização da descoberta de novos fármacos (Figura 10).

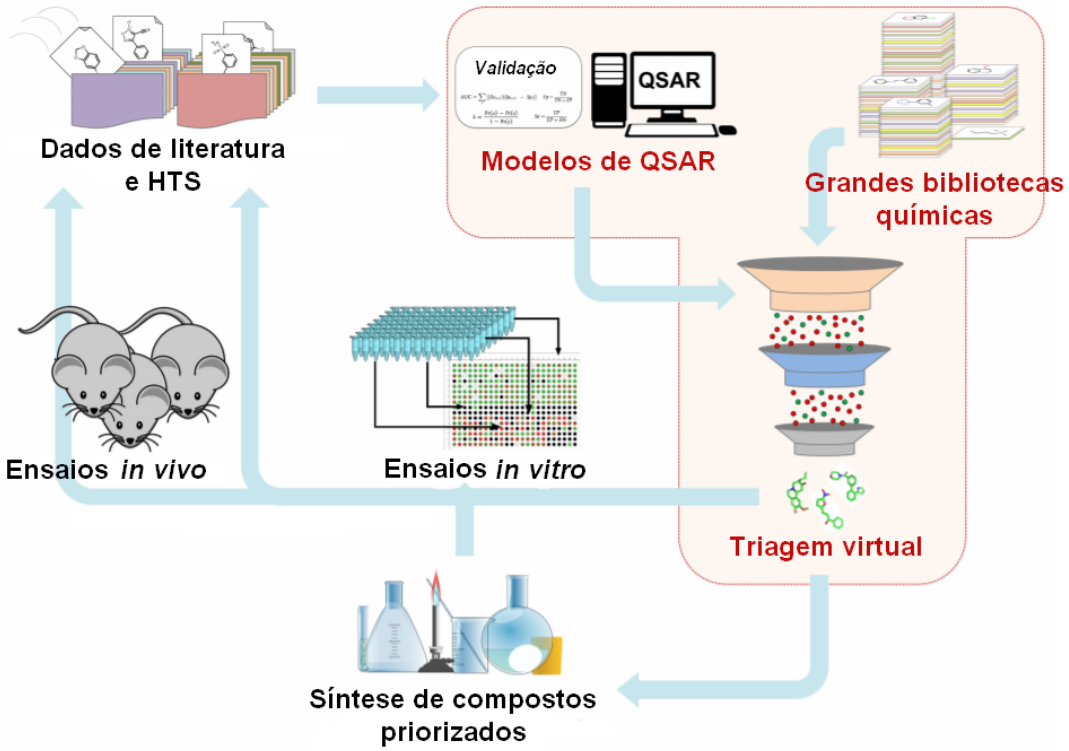


Figura 10. Fluxo de trabalho de triagem virtual baseado em QSAR. Adaptado de (NEVES et al., 2018).

1.7. PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES DE NOVAS DROGAS

Produtos naturais são fonte diversa e abundante de estruturas com atividade biológica para a descoberta de novos fármacos (KINGSTON, 2012), por isso são responsáveis por cerca de um terço das drogas introduzidas nos últimos trinta anos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A história de produtos naturais aliada ao tratamento da malária é conhecida antes mesmo do conhecimento estabelecido sobre a própria doença. O uso da casca de *Chinchona* spp é um dos primeiros registros que se têm de tratamento da malária, que data do século XII. Chamada de “casca sagrada” devido ao seu uso popularizado por Jesuítas missionários na América do Sul, acredita-se que esta já era utilizada por nativos peruanos antes mesmo da invasão europeia (ACHAN et al., 2011). Os alcaloides quinolínicos quinino e quinidino são os princípios ativos presentes no extrato de casca de árvores do gênero *Chinchona* e são, portanto, considerados os primeiros antimaláricos da história. O quinino desempenhou um papel crucial na Primeira Guerra Mundial, período no qual a malária acometeu mais de 1,5 milhão de soldados (BRABIN, 2014). No entanto, o reinado do quinino sofreu um duro golpe durante a Segunda Guerra Mundial: a ilha de Java, na Indonésia – até então responsável por cerca de 90% da produção mundial de quinino, foi invadida e tomada pelo Exército Imperial Japonês na década de 40, limitando sua disponibilidade (ELYAZAR; HAY; BAIRD, 2011). A partir de então, a descoberta e o desenvolvimento de terapias alternativas ao quinino tornaram-se uma meta de importância estratégica, levando os Estados Unidos a lançar uma campanha de busca por novos antimaláricos jamais vista até então.

Esforços científicos impulsionando o desenvolvimento de novos antimaláricos sintéticos acabaram tornando o quinino não mais valioso como *commodity*. Assim, o pontapé inicial na fundamentação do desenvolvimento de antimaláricos sintéticos foi dada por Paul Erlich. Ao perceber que o composto azul de metileno se mostrava particularmente efetivo em corar parasitas da malária, Erlich racionalizou que este poderia ser seletivamente tóxico ao parasita (SCHLITZER, 2007). Mesmo não sendo utilizado por muito tempo, o azul de metileno constituiu a base dos antimaláricos sintéticos – modificações em sua estrutura levaram, entre outras, ao desenvolvimento da primaquina e da cloroquina, medicamentos de extrema importância até os dias de hoje no rol de antimaláricos.

Assim como a história da descoberta do quinino e da cloroquina envolveu invasões e guerras, a descoberta da artemisinina não poderia ter sido diferente. Durante a Guerra do Vietnam, grande parte dos soldados vietnamitas foi severamente acometida pela malária, levando a um elevado número de baixas. Assim, em resposta a um pedido de ajuda de líderes vietnamitas, a China estabeleceu um projeto militar secreto visando descobrir novos antimaláricos eficientes. Após testar mais de 100 extratos de diferentes plantas no modelo murino de malária *P. berghei*, este extenso trabalho de triagem da farmacopeia chinesa tradicional levou à identificação de extratos com significativa atividade contra o parasita – dentre elas, a *qinghao* (*Artemisia annua*) (CUI; SU, 2009). Uma vez que as preparações de *Artemisia* se mostravam instáveis e com atividade inconsistente, um grupo de cientistas liderados por Youyou Tu otimizou o processo de extração do princípio ativo, levando-o a uma alta eficácia contra o parasita em roedores. Tal descoberta científica foi provavelmente um dos maiores avanços da medicina do século XX, o que abriu caminhos para que a pesquisadora Youyou Tu recebesse o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia no ano de 2015 (LIU; LIU, 2016).

Existe um debate cada vez mais expressivo sobre a necessidade de se revisitar os produtos naturais como pontos de partida para a descoberta de novos fármacos. A história do desenvolvimento de fármacos fundamenta este debate. Segundo a FDA, a cada 3 medicamentos anti-infecciosos baseados em pequenas moléculas desenvolvidos entre 1981 e 2014, apenas 1 destes tem origem sintética - ou seja, cerca de dois terços têm sua origem em produtos naturais ou derivativos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Por algum tempo, a atenção da indústria farmacêutica desviou-se dos produtos naturais em função da automatização de processos de triagem em alta escala e síntese orgânica (BUTLER, 2004). Ainda, o foco distanciado dos produtos naturais na descoberta de fármacos foi relacionado diretamente a um declínio no número de aprovações de novos medicamentos (LI; VEDERAS, 2009).

Diversas vantagens têm feito a ciência progressivamente voltar seu olhar às fontes de produtos naturais para descoberta de fármacos. Tão expressiva contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos é justificada pela diversidade de grupos funcionais encontrada em *scaffolds* de produtos naturais, que fornece propriedades biologicamente ativas e ligantes seletivos para alvos celulares distintos (FERNÁNDEZ-ÁLVARO et al., 2016), ou seja, complexos processos

evolutivos de adaptação de um organismo ao seu ambiente levam à biossíntese de moléculas com propósito biológico específico (KOCH et al., 2005). Características intrínsecas a conjuntos de produtos naturais como ampla variedade de farmacóforos e alto grau de estereoquímica aumentam a probabilidade de encontrar *hits*, o que torna este tipo de biblioteca química bastante atrativo (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Exemplo disto é a maior e mais distinta cobertura do espaço químico por coleções de produtos naturais: estima-se que cerca de 83% dos *scaffolds* de anéis presentes em produtos naturais estão ausentes em moléculas comercialmente disponíveis e, consequentemente, bibliotecas de triagem (HERT et al., 2009). Uma vez que o *scaffold* molecular determina a orientação espacial do fármaco quanto à sua ligação a um alvo biológico, quanto maior o número de *scaffolds* diversos explorados, maior a probabilidade de identificar novos quimiotipos de antimaláricos.

Neste contexto, a disponibilidade de informações e propriedades estruturais e químicas de produtos naturais e derivados em bases de dados organizadas constitui uma ponte para a aceleração do uso de produtos naturais e derivados no processo de desenvolvimento de novos fármacos com mecanismos de ação inovadores. Ainda, uma vez que a história da quimioterapia antimalárica é baseada no uso de produtos naturais, a riqueza oriunda da biodiversidade não deve ser descartada como fonte de novos *scaffolds* químicos no futuro.

2. JUSTIFICATIVA

A quimioterapia consiste em um dos pilares que sustentam as estratégias de controle da malária em todo o mundo. No entanto, o atual cenário de rápida e crescente emergência de parasitas com suscetibilidade reduzida aos antimaláricos disponíveis no mercado representa um significativo entrave ao combate a esta doença, aumentando as chances de que a malária siga se propagando. A ocorrência de resistência cruzada, isto é, a resistência a um determinado fármaco pode também ser observada em outro com mecanismo de ação semelhante, é um fenômeno não raro e acaba por agravar este contexto. Justifica-se, portanto, necessidade urgente de investir na buscar por novos e eficazes fármacos com atividade contra *P. falciparum*, especialmente aqueles com mecanismos de ação distintos.

Moléculas advindas de produtos naturais têm desempenhado um papel expressivo na história da descoberta e desenvolvimento de terapias contra a doença: dois dos mais importantes fármacos no arsenal antimalárico, o quinino e artemisinina, foram diretamente isolados da biodiversidade. Somando-se a isto, a crescente disponibilidade de bases de dados de moléculas comerciais cada vez mais completas incentiva o emprego do planejamento de fármacos auxiliado por computadores como uma ferramenta capaz de otimizar o longo e oneroso processo de descoberta de novos medicamentos.

Diante disso, utilizando modelos de aprendizado de máquina acoplados a estratégias de triagem virtual, busca-se identificar potenciais moléculas candidatas a antimaláricos e investigar a fundo sua atividade dentro do ciclo de vida de *Plasmodium spp* atraves de ensaios experimentais e moleculares. Resultados promissores a serem alcançados são fonte inovação e grande relevância para a ampliação do conhecimento. Acreditamos que os ensaios propostos têm o potencial não apenas de revelar novos fármacos candidatos, mas também informar mecanismos de ação e/ou resistência alternativos.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é identificar potenciais moléculas candidatas a fármacos contra *Plasmodium* spp a partir de uma biblioteca de compostos naturais e derivativos, e caracterizar sua atividade antimalárica e possíveis mecanismos de ação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar *in silico* novos compostos derivados de produtos naturais candidatos a antimaláricos através de química comparativa;

- Conduzir ensaios de triagem fenotípica *in vitro* contra estágios assexuados sanguíneos de *P. falciparum*;

- Avaliar a citotoxicidade em linhagens de células de mamíferos os compostos que apresentarem atividade antiplasmodial relevante;

- Determinar a atividade exoeritrocítica do composto líder contra estágio hepático do parasita *in vitro* utilizando modelo de *P. berghei*;

- Investigar a atividade de bloqueio de transmissão *in vitro* do composto líder contra em modelos de *P. falciparum* e *P. berghei*;

- Interrogar possíveis alvos moleculares envolvidos na atividade antimalárica do composto líder através da seleção *in vitro* de parasitas *P. falciparum* quimiorresistentes;

- Explorar potenciais mecanismos de resistência cruzada com mutações genéticas encontradas no campo.

4. CAPÍTULO 1

QSAR-based virtual screening of natural products database for identification of potent antimalarial hits.

Letícia Tiburcio Ferreira, Joyce Villaverde Bastos Borba, José Teófilo Moreira-Filho, Aline Rimoldi, Carolina Horta Andrade, Fabio Trindade Maranhão Costa

Artigo publicado na revista Biomolecules 2021, 11(3), 459.

biomolecules

MDPI

Article

QSAR-Based Virtual Screening of Natural Products Database for Identification of Potent Antimalarial Hits

Letícia Tiburcio Ferreira [1], Joyce V. B. Borba [1,2], José Teófilo Moreira-Filho [2], Aline Rimoldi [1], Carolina Horta Andrade [2] and Fabio Trindade Maranhão Costa [1,*]

[1] Laboratory of Tropical Diseases Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP 13083-864, Brazil; ltiburciof@gmail.com (L.T.F.); joycevillaverde@gmail.com (J.V.B.B.); rimoldialine@gmail.com (A.R.)
[2] Laboratory of Molecular Modeling and Drug Design, LabMol, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO 74605-170, Brazil; teofarma1@gmail.com (J.T.M.-F.); andradech@yahoo.com (C.H.A.)
* Correspondence: fabiotmc72@gmail.com; Tel.: +55-19-3521-6288

Abstract: With about 400,000 annual deaths worldwide, malaria remains a public health burden in tropical and subtropical areas, especially in low-income countries. Selection of drug-resistant *Plasmodium* strains has driven the need to explore novel antimalarial compounds with diverse modes of action. In this context, biodiversity has been widely exploited as a resourceful channel of biologically active compounds, as exemplified by antimalarial drugs such as quinine and artemisinin, derived from natural products. Thus, combining a natural product library and quantitative structure–activity relationship (QSAR)-based virtual screening, we have prioritized genuine and derivative natural compounds with potential antimalarial activity prior to in vitro testing. Experimental validation against cultured chloroquine-sensitive and multi-drug-resistant *P. falciparum* strains confirmed the potent and selective activity of two sesquiterpene lactones (LDT-597 and LDT-598) identified *in silico*. Quantitative structure–property relationship (QSPR) models predicted absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) and physiologically based pharmacokinetic (PBPK) parameters for the most promising compound, showing that it presents good physiologically based pharmacokinetic properties both in rats and humans. Altogether, the in vitro parasite growth inhibition results obtained from in silico screened compounds encourage the use of virtual screening campaigns for identification of promising natural compound-based antimalarial molecules.

Keywords: *Plasmodium falciparum*; natural products; virtual screening; experimental validation; QSAR; ADME

check for updates

Citation: Ferreira, L.T.; Borba, J.V.B.; Moreira-Filho, J.T.; Rimoldi, A.; Andrade, C.H.; Costa, F.T.M. QSAR-Based Virtual Screening of Natural Products Database for Identification of Potent Antimalarial Hits. *Biomolecules* **2021**, *11*, 459. https://doi.org/10.3390/biom11030459

Academic Editor: José L. Medina-Franco

Received: 19 February 2021
Accepted: 16 March 2021
Published: 19 March 2021

1. Introduction

Malaria is a mosquito-borne disease transmitted by the bite of Anopheles mosquitoes infected with *Plasmodium* parasites. Mainly caused by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, malaria still imposes a heavy burden upon developing countries as it is responsible for high rates of morbidity and mortality. In 2018, the World Health Organization (WHO) recorded 228 million cases of the disease worldwide with an estimate of approximately 400,000 malaria-related deaths [1].

The decreasing rate of cases tracked by the WHO in the last decade has stalled in the last 5 years [1], portraying how fragile the gains achieved can be. The COVID-19 pandemic, which arose in 2019, menaces these gains even further, as the spread of SARS-CoV-2 leads to extra pressure on health systems, especially in low-resourced settings [2]. It is estimated that disruption of malaria control endeavors in Africa due to the COVID-19 pandemic could lead to a malaria burden in 2020 that is the double of that registered in 2019 [3]. Moreover, selection of parasite strains resistant to currently available antimalarial drugs [4] has raised serious concerns about maintaining global achievements in the battle against malaria. The scenario of parasite resistance has threatened the front-line treatment with

Artemisinin Combined Therapies (ACTs), as the clinical efficacy of artemisinin (ART) and its derivatives has been compromised by delayed parasite clearance in Southeast Asia [5]. Even more alarming is the recent evidence of *de novo* emergence of *Pf*kelch13-mediated artemisinin resistance in Africa [6]. Together, these reports highlight the compelling call for new therapies based on alternative molecules with potent activity against the malaria parasite, especially drug-resistant *Plasmodium* strains.

The storyline of antimalarial drug development cannot be distinguished from the relevance of biodiversity-derived molecules. One of the first antimalarial indications in history, the use of *Chinchona* decoctions for recurring fevers even before the characterization of malaria parasites [7], motivated the isolation of quinine—an alkaloid with antiplasmodial properties and one of the most representative antimalarial drugs to date. Likewise, the use of *Artemisia annua* decoctions for fever treatment inspired the description of its active principle, artemisinin, which now constitutes the first line of malaria treatment indicated by the WHO [8].

For decades, the discovery of therapeutic molecules derived from natural compounds relied solely on laborious rounds of phenotypic screenings and subsequent cycles of compound purification [9], which is an onerous and uncertain process. However, progress in computational software and the availability of massive online commercial datasets of chemical compounds with their biological properties annotated [10,11] have boosted the development of computer-aided drug design (CADD). In this new setting of drug discovery and development, CADD opens avenues for reducing time and costs associated with identification of new drug candidates and consequent more effective pathways until the workbench [12,13]. Among CADD techniques, quantitative structure–activity relationships (QSARs) have been widely applied to hit identification by virtual screening [14–16] in order to predict physicochemical properties and biological activity of molecules. Different QSAR-based virtual screenings have been applied by our group for the effective description of new candidate hits for neglected tropical diseases, including malaria [17–20]. In light of this, commercial natural products libraries link virtual screening campaigns to the benefits of natural product-based drug discovery. Even though such libraries tend to deliver molecules not synthetically tractable due to their complex scaffolds, their advantages rely on the higher structural and physicochemical diversity, and wider coverage of the chemical space of natural products compared to synthetic drugs [21].

The goal of the present study was to develop a virtual screening pipeline for identifying potent natural products and natural product-derived molecules with antimalarial activity available in a commercial database by integrating QSAR-based virtual screening and further experimental evaluation of chloroquine-sensitive and multi-drug-resistance *P. falciparum* strains, in addition to testing their in vitro therapeutic indexes in human hepatoma cells. Finally, we analyzed multiple absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) and physiologically based pharmacokinetic (PBPK) parameters to ensure drug efficacy and tolerability.

2. Materials and Methods

The workflow for the study design is summarized in Figure 1.

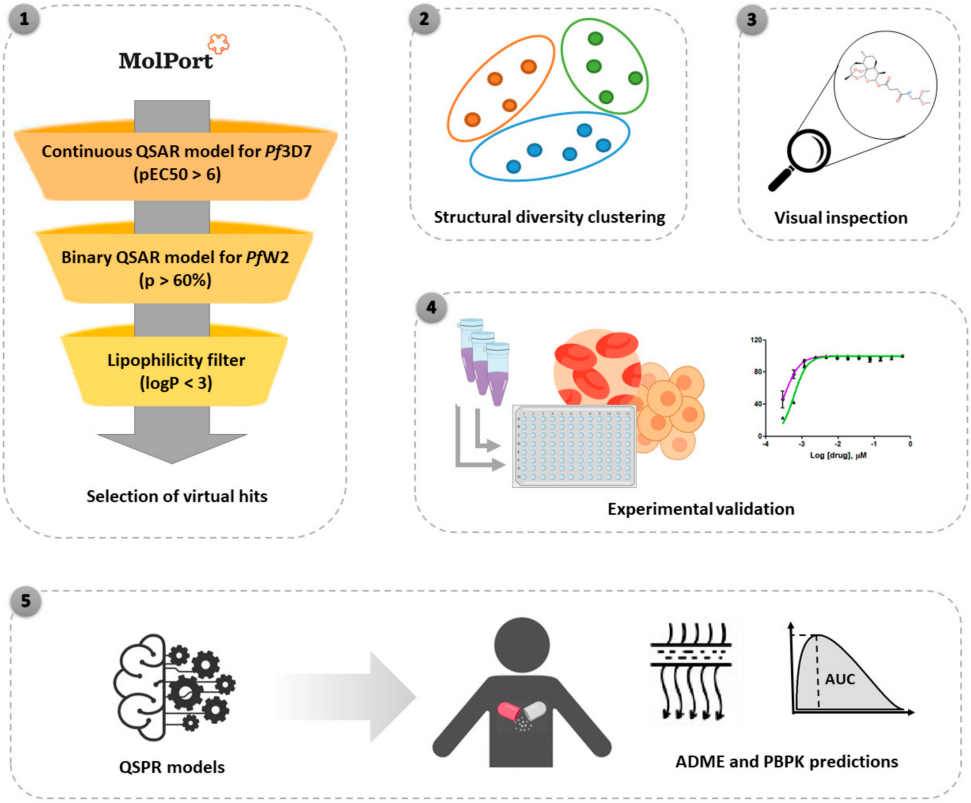


Figure 1. General workflow of the virtual screening of natural compound database followed by experimental validation. The following steps were conducted: (**1**) quantitative structure–activity relationship (QSAR)-based virtual screening of MolPort natural products and derivatives database and selection of compounds with best predicted antimalarial activity; (**2**) analysis of structural diversity by clustering; (**3**) visual inspection; (**4**) experimental validation against *P. falciparum* blood stages and mammalian HepG2 cells and (**5**) quantitative structure–property relationship (QSPR) models for prediction of absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) and physiologically based pharmacokinetic (PBPK) properties.

2.1. Virtual Screening and Structural Diversity Clustering

Steps were performed in our in-house QSAR workflow implemented on KNIME 3.2.2 [22]. In-house QSAR models [23] were applied for virtual screening of the natural products branch of MolPort commercial database (www.molport.com, accessed on 3 May 2019). The virtual screening aims to identify, within this database, a subset of compounds with potential biological activity against *P. falciparum* chloroquine-sensitive (3D7) and multi-drug-resistant (W2) strains. Prior to QSAR-based virtual screening predictions, the compounds were curated according to data curation protocols established by Fourches and colleagues [24–26]. Then, QSAR models were used to predict the *P. falciparum* 3D7 and W2 inhibition activities of compounds. The in-house QSAR models used for virtual screening were previously developed for 3D7 and W2 strains using learning sets compiled from PubChem database (PubChem IDs for 3D7 dataset: AID_1828, AID_449703, AID_524790, AID_660866 and for W2 dataset: AID_1883, AID_449704, AID_524796, AID_606570). These datasets were compiled and curated according to best practices of QSAR modeling and after curation, the 3D7 learning set contained 7873 compounds (3497 actives and 4376 inactives) and the W2 learning set contained 7403 compounds (3637 actives and 3766

inactives). Both datasets were then used to build consensus models with a Random Forest algorithm and five different molecular descriptors (Avalon, MACCS, Morgan, FeatMorgan and AtomPair) [23]. Three criteria were used for selection of virtual hits: (i) predicted pEC_{50} against *P. falciparum* 3D7 should be $\geq$6; (ii) probability of activity (p) against *P. falciparum* W2 should be $\geq$0.6 (p > 60%) and (iii) logP filters were also added to predict good lipophilicity with logP < 3 using XLogP [27]. For prioritization of structurally diverse compounds, molecules predicted to be active by the virtual screening were clustered through the Butina method [28] implemented in Python 3.6 and using the workflow proposed by Sydow and colleagues [29], which groups compounds based on Tanimoto similarity and picks a set of diverse compounds from these groups. Finally, the selected virtual hits were purchased and submitted to in vitro experimental evaluation. The similarity map and was generated using OSIRIS DataWarrior software v.05.02.01 [30].

2.2. Compound Preparation

All natural compounds and derivatives selected were purchased from MolPort and dissolved in DMSO at 10 mM. Chloroquine and artesunate (standard antimalarial drugs) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and prepared at 10 mM as well.

2.3. Plasmodium falciparum In Vitro Culture

Chloroquine-sensitive (3D7) and multi-drug-resistant (W2) *P. falciparum* strains were cultured following the candle jar method as described by Trager and Jensen [31]. Briefly, parasites were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% A+ human plasma at 5% CO_2 atmosphere. Ring stage synchronized cultures were obtained by two consecutive treatments with a 5% D-sorbitol solution [32] in 48 h intervals.

2.4. In Vitro Assays for P. falciparum Growth Inhibition

Parasite growth inhibition assays were conducted by distributing ring stage synchronized parasites at 2% hematocrit and 0.5% parasitemia in 96-well plates (NEST Biotechnology Co., Ltd., Wuxi, Jiangsu, China). Parasites were incubated in the presence of drugs in a two-fold 12-point serial dilution starting at 10 μM in duplicate. Chloroquine was used as an antimalarial standard. At the end of a 72 h incubation, parasitemia was determined by fluorescence reading at 490 nm excitation and 540 nm emission (BMG CLARIOstar, BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA) using SybrGreen fluorescent dye as described by Hartwig et al. [33]. Parasite growth inhibition was determined as a percentage relative to drug-free control. EC_{50} values were interpolated from log doses vs. inhibition curves in GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

2.5. Citotoxicity Assays

Cytotoxicity of selected compounds was evaluated using the MTT reduction assay (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium chloride) [34]. Human hepatoma (HepG2) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with gentamycin (40 mg/L) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 37 °C and 5% CO_2. Cells were seeded in 96-well plates (NEST Biotechnology Co., Ltd., Wuxi, Jiangsu, China) at 10^5 cells per well and incubated in the presence of a serial dilution of the drugs starting at 100 μM. After 72 h of incubation, MTT was added to the wells. The optical density was measured at 570 nm (CLARIOStar, Labtech BMG Inc, Durham, NC, USA) and cell viability was expressed as a percentage relative to the untreated control. CC_{50} values were calculated by plotting a log dose vs. viability curve in GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). The selectivity index (SI) of the compounds was determined by the expression:

$$SI = (\text{HepG2 } CC_{50})/(Pf\ EC_{50}),$$

where HepG2 CC_{50} corresponds to the cytotoxic concentration of compounds in HepG2 cells and *Pf* EC_{50} relates to the 50% inhibitory concentration on *P. falciparum* 3D7 strain.

2.6. In Silico Predictions of Metabolism, ADME and PBPK

For the in silico predictions of the compound's metabolism, we used the web tool BioTransformer [35], which is a software tool that predicts small molecule metabolism in mammals, their gut microbiota, as well as the soil/aquatic microbiota. The program Detoxie® (http://insilicall.com/, accessed on 17 December 2020) was used to predict absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME), and physiologically based pharmacokinetic (PBPK) properties. This software is an artificial intelligence de-risking application based on quantitative structure–property relationship (QSPR) models for each endpoint and human PBPK model.

3. Results

3.1. QSAR-Based Virtual Screening

In-house built and validated QSAR models were used for virtual screening, whose results are summarized in Figure 2. The entire MolPort database of commercially available natural products and derivatives containing approximately 120,000 chemical compounds was screened for identification of potentially active compounds against both *P. falciparum* chloroquine-sensitive (3D7) and multi-drug-resistant (W2) strains. Compounds were downloaded and prepared for screening by analyzing their chemical structures according to data curation protocols proposed by Fourches et al. [24–26]. Briefly, explicit hydrogens were added, salts were removed and specific chemotypes were normalized. Moreover, polymers, inorganic salts, organometallic compounds and mixtures were also removed. The first filter applied, which predicted activity against *P. falciparum* 3D7 on a continuous QSAR model ($pEC_{50} \geq 6$) selected 41,207 compounds. Next, the binary model for activity against multi-drug-resistant *P. falciparum* W2 ($p \geq 0.6$) narrowed the list down to 1257 compounds predicted to be active. Once poor physicochemical properties could be a relevant bottleneck in late-stage drug development, we added a filter to select compounds with good lipophilicity (logP < 3), which resulted in 265 compounds being selected after the virtual screening pipeline (Supplemental File S1).

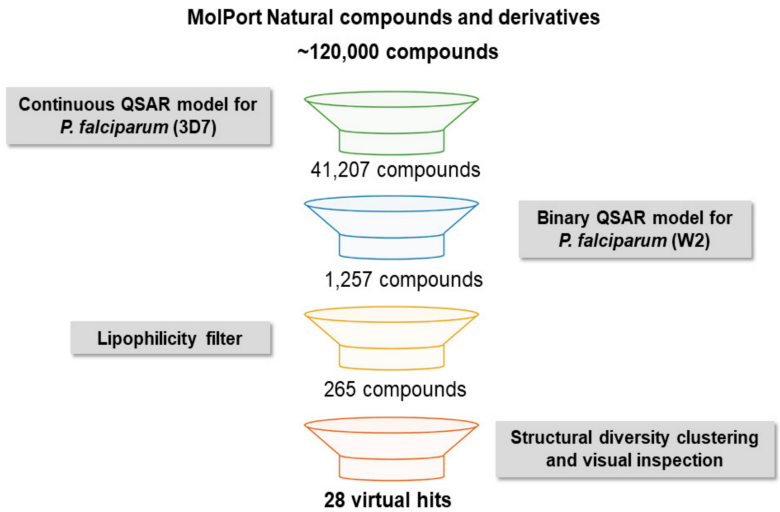


Figure 2. Virtual screening workflow for the identification of natural compounds and derivatives active against *P. falciparum*.

3.2. Structural Diversity Clustering

Starting with the 265 virtual hits obtained from screening the MolPort natural products and derivatives database, we performed an analysis of structural diversity based on

clustering of structurally similar compounds. The grouping search for a centroid compound which consists of compounds containing bigger amounts of neighbor compounds (or compounds that are structurally similar) and selects 10 of the nearest neighbor compounds to form a cluster. We observed that among more than 120 clusters obtained, more than half contained only one molecule—i.e., the chemical space itself is already diverse (Supplementary Figure S1). Inside each cluster, a structure–activity relationship (SAR) analysis was performed in order to identify the compounds predicted to be the most active within each structural group. Afterwards, just a few compounds were selected from each cluster in order to obtain the most structural diversity possible. Finally, we obtained 188 compounds with significative structural diversity. Among those, 28 were selected by visual inspection.

3.3. In Vitro Screening against P. falciparum

The 28 virtual hits selected were purchased and experimentally evaluated. In order to optimize the screening process, we carried out a preliminary in vitro screen to determine each compound's ability to inhibit the growth of the chloroquine-sensitive *P. falciparum* 3D7 strain at a concentration of 5 μM (Figure 3). Among the 28 compounds tested, 8 (LDT-598, LDT-588, LDT-599, LDT-597, LDT-592, LDT-614, LDT-586 and LDT-601) inhibited more than 70% of parasite growth at 5 μM. Therefore, we aimed to investigate the 50% inhibitory concentration (EC_{50}) of the eight most promising compounds against both chloroquine-sensitive and multi-drug-resistant parasite strains (Table 1).

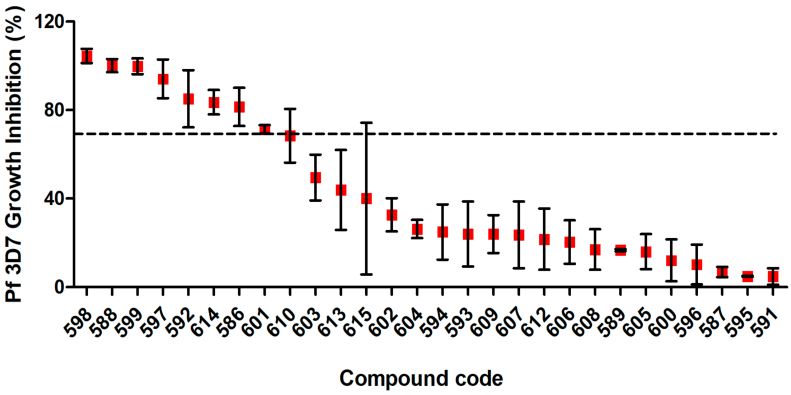
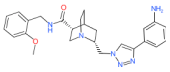
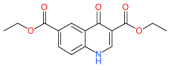
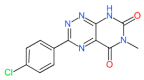
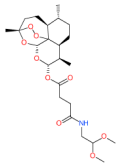
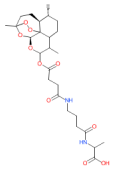
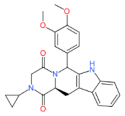
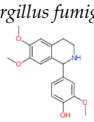
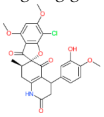


Figure 3. In vitro growth inhibition of asexual blood stage *P. falciparum* (3D7) for prioritized natural compounds and derivatives from virtual screening. The inhibitory potential of different compounds was tested at a concentration of 5 μM and the inhibition of parasitemia was measured after 72 hours of incubation. The dashed line represents the cutoff used to highlight the most promising compounds above 70% of inhibition.

Table 1 shows the five compounds (LDT-586, LDT-588, LDT-597, LDT-598 and LDT-599) that demonstrated good antimalarial activity with $EC_{50} < 5$ μM for both *P. falciparum* strains tested, including a multi-drug-resistant one (W2). It is worth noting that compounds LDT-597 and LDT-598 showed remarkable activity with EC_{50} of 0.54 and 0.78 nM, respectively, against *P. falciparum* 3D7 and EC_{50} of 0.56 and 0.59 nM against *P. falciparum* W2.

Table 1. The most promising compounds predicted to be active against *P. falciparum* asexual stages selected by virtual screening.

Compound Code (MolPort ID)	2D Structure (Biological Source of NP Precursor)	EC_{50} [a] (μM)		CC_{50} [b] (μM)	In vitro Therapeutic Index [c]
		*Pf*3D7	*Pf*W2	HepG2	
LDT-586 (MolPort-001-745-423)	 (No data available)	4.52 ± 0.91	3.44 ± 1.30	98.59 ± 0	21.81
LDT-588 (MolPort-000-651-065)	 (No data available)	3.84 ± 1.45	2.09 ± 1.17	67.04 ± 2.28	17.46
LDT-592 (MolPort-002-323-504)	 (No data available)	9.09 ± 3.74	3.11 ± 0.54	17 ± 0	1.87
LDT-597 (MolPort-001-732-360)	 (*Artemesia annua*)	0.0005 ± 0.00	0.0005 ± 0.00	18.29 ± 3.51	33,870.37
LDT-598 (MolPort-001-732-370)	 (*Artemesia annua*)	0.0007 ± 0.00	0.0006 ± 0.00	25.94 ± 1.13	33,299.10
LDT-599 (MolPort-001-737-485)	 (*Aspergillus fumigatus*)	3.68 ± 1.92	2.74 ± 0.78	20.96 ± 2.51	5.70
LDT-601 (MolPort-002-506-405)	 (*Pachycereus weberi*, *Pachycereus pringlei*, *Pachycereus pecten -aboriginum*, *Backebergia militaris* and *Carnegiea gigantea*)	6.61 ± 3.20	0.65 ± 0.47	21.79 ± 4.16	3.30
LDT-614 (MolPort-044-180-513)	 (*Penicillium patulum*)	5.26 ± 0.52	5.65 ± 3.11	23.55 ± 1.82	4.48
Chloroquine		0.0079 ± 0.00	0.147 ± 0.04	ND	-
Artesunate		0.0016 ± 0.00	ND	ND	-

[a] EC_{50}: half of the maximum inhibitory concentration in 3D7 and W2 strains and their respective standard deviations; [b] CC_{50}: half the maximum cytotoxic concentration in HepG2 cells; [c] SI: Selectivity index calculated from CC_{50}/EC_{50} (3D7). NP: natural products. ND: not determined. The data derive from at least two independent experiments.

3.4. Cytotoxicity against Human Cells

Cytotoxicity was assessed in human hepatoma cells (HepG2). Among the eight compounds tested, four of them showed favorable therapeutic indexes for hit compounds with an SI > 10 (LDT-586, LDT-588, LDT-597 and LDT-598). Two compounds showed interesting results as they were highly selective: LDT-597 and LDT-598 showed in vitro therapeutic indexes of 33,870.37 and 33,299.1, respectively, likely due to their low nanomolar half maximal inhibitory concentrations (EC_{50}) in *P. falciparum* 3D7.

3.5. In Silico Predictions of Metabolism, ADME and PBPK

We have also analyzed the metabolism of LDT-597 and LDT-598 using the software BioTransformer. The program showed that the carboxylic esters of these compounds might be hydrolyzed into dihydroartemisinin (DHA) (Figure 4) by plasma carboxylesterases, showing the same type of metabolization of artesunate [36].

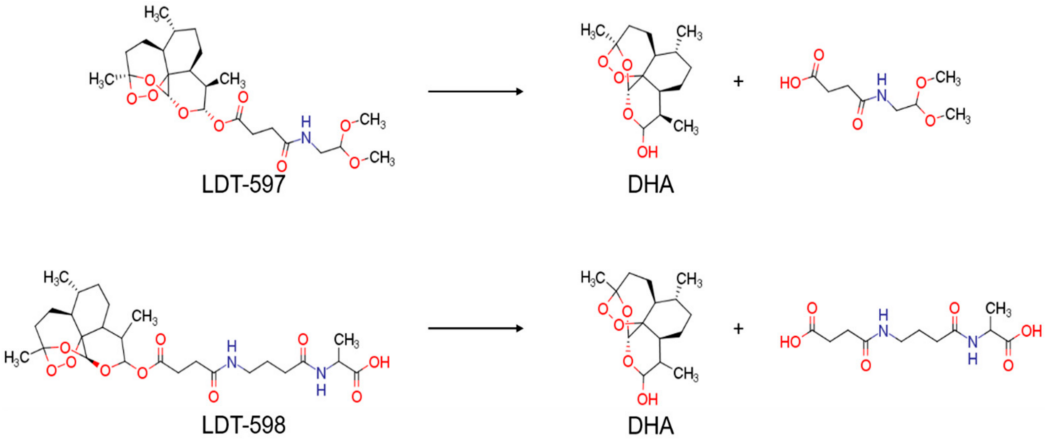
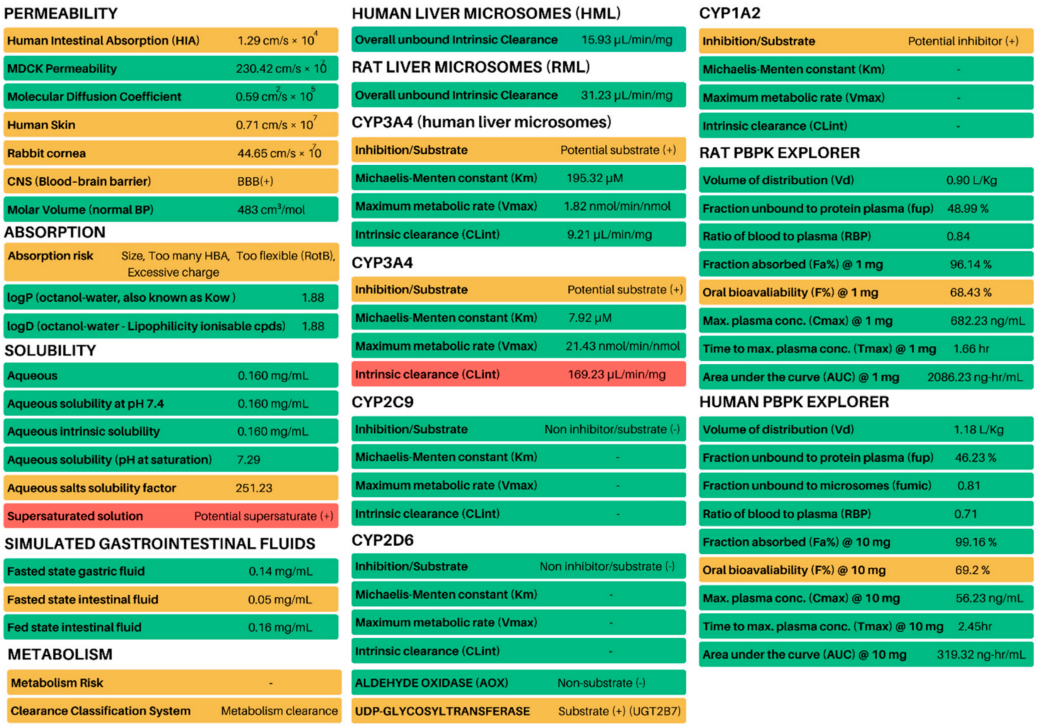


Figure 4. Predicted metabolism of compounds LDT-597 and -598 via plasma carboxylesterases predicted using the software BioTransformer.

Artesunate has significantly greater solubility in water than either artemisinin, dihydroartemisinin or artemether, which influences its diffusion across mucosal membranes as well as other pharmacokinetic properties [37]. For this reason, we decided to compare the in silico ADME and PBPK profiles of LDT-597 (Figure 5), Artesunate and DHA (Supplemental Figures S2 and S3, respectively) using the program Detoxie®which is an artificial intelligence de-risking application based on QSPR models for each endpoint and human PBPK model. While compound LDT-597 was predicted to be slightly more soluble than artesunate and a lot more soluble than DHA, its predicted intestinal permeability is 1.29 cm/s $\times$ 10^4, while artesunate's predicted intestinal permeability is 2.29 cm/s $\times$ 10^4. Moreover, the volume of distribution (VD) of compound LDT-597 was considerably higher than that of artesunate. As compound LDT-597 showed to have good physiologically based pharmacokinetic properties both in rats and humans, it was predicted to have a higher fraction unbound to protein plasma (UF) when compared to artesunate and DHA, which results in better compound bioavailability.



PERMEABILITY	
Human Intestinal Absorption (HIA)	1.29 cm/s × 10^{4}
MDCK Permeability	230.42 cm/s × 10^{6}
Molecular Diffusion Coefficient	0.59 cm^{2}/s × 10^{5}
Human Skin	0.71 cm/s × 10^{7}
Rabbit cornea	44.65 cm/s × 10^{7}
CNS (Blood-brain barrier)	BBB(+)
Molar Volume (normal BP)	483 cm^{3}/mol
ABSORPTION	
Absorption risk	Size, Too many HBA, Too flexible (RotB), Excessive charge
logP (octanol-water, also known as Kow)	1.88
logD (octanol-water - Lipophilicity ionisable cpds)	1.88
SOLUBILITY	
Aqueous	0.160 mg/mL
Aqueous solubility at pH 7.4	0.160 mg/mL
Aqueous intrinsic solubility	0.160 mg/mL
Aqueous solubility (pH at saturation)	7.29
Aqueous salts solubility factor	251.23
Supersaturated solution	Potential supersaturate (+)
SIMULATED GASTROINTESTINAL FLUIDS	
Fasted state gastric fluid	0.14 mg/mL
Fasted state intestinal fluid	0.05 mg/mL
Fed state intestinal fluid	0.16 mg/mL
METABOLISM	
Metabolism Risk	-
Clearance Classification System	Metabolism clearance

HUMAN LIVER MICROSOMES (HML)	
Overall unbound Intrinsic Clearance	15.93 µL/min/mg
RAT LIVER MICROSOMES (RML)	
Overall unbound Intrinsic Clearance	31.23 µL/min/mg
CYP3A4 (human liver microsomes)	
Inhibition/Substrate	Potential substrate (+)
Michaelis-Menten constant (Km)	195.32 µM
Maximum metabolic rate (Vmax)	1.82 nmol/min/nmol
Intrinsic clearance (CLint)	9.21 µL/min/mg
CYP3A4	
Inhibition/Substrate	Potential substrate (+)
Michaelis-Menten constant (Km)	7.92 µM
Maximum metabolic rate (Vmax)	21.43 nmol/min/nmol
Intrinsic clearance (CLint)	169.23 µL/min/mg
CYP2C9	
Inhibition/Substrate	Non inhibitor/substrate (-)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-
CYP2D6	
Inhibition/Substrate	Non inhibitor/substrate (-)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-
ALDEHYDE OXIDASE (AOX)	Non-substrate (-)
UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE	Substrate (+) (UGT2B7)

CYP1A2	
Inhibition/Substrate	Potential inhibitor (+)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-
RAT PBPK EXPLORER	
Volume of distribution (Vd)	0.90 L/Kg
Fraction unbound to protein plasma (fup)	48.99 %
Ratio of blood to plasma (RBP)	0.84
Fraction absorbed (Fa%) @ 1 mg	96.14 %
Oral bioavaliability (F%) @ 1 mg	68.43 %
Max. plasma conc. (Cmax) @ 1 mg	682.23 ng/mL
Time to max. plasma conc. (Tmax) @ 1 mg	1.66 hr
Area under the curve (AUC) @ 1 mg	2086.23 ng-hr/mL
HUMAN PBPK EXPLORER	
Volume of distribution (Vd)	1.18 L/Kg
Fraction unbound to protein plasma (fup)	46.23 %
Fraction unbound to microsomes (fumic)	0.81
Ratio of blood to plasma (RBP)	0.71
Fraction absorbed (Fa%) @ 10 mg	99.16 %
Oral bioavaliability (F%) @ 10 mg	69.2 %
Max. plasma conc. (Cmax) @ 10 mg	56.23 ng/mL
Time to max. plasma conc. (Tmax) @ 10 mg	2.45hr
Area under the curve (AUC) @ 10 mg	319.32 ng-hr/mL

Figure 5. ADME and PBPK multiparametric prediction of LDT-597 using the Detoxie® software (http://insilicall.com/, accessed on 17 December 2020).

4. Discussion

Considering the relevance of natural products and derivatives for antimalarial drug development, we have applied a QSAR-based virtual screening pipeline for identification of potent antimalarial candidates against chloroquine-sensitive (3D7) and multi-drug-resistant (W2) *P. falciparum* strains. Firstly, the MolPort database for natural compounds and derivatives was screened with the aim of identifying molecules with predicted EC_{50} against *P. falciparum* 3D7 $\leq$ 1 µM and predicted probability of being active against *P. falciparum* W2 > 60%. These molecules were also passed by a lipophilicity prediction filter and were verified for agreement within the applicability domain of QSAR models used in this study. It is important to note that we did not use a molecular weight filter due to large carbonic chains in natural products and derivatives, which could be a huge restriction and lead to loss of potential candidate molecules. The selected virtual hits were further divided into structurally diverse clusters and visually inspected for compound prioritization. Experimental in vitro assays against intraerythrocytic *P. falciparum* 3D7 and W2 strains were conducted to pinpoint active compounds.

Among the compounds evaluated, some of them do not show impressive phenotypic activity (high EC_{50} values and consequent low in vitro therapeutic indexes), which might be due to the limited size of natural products-based commercial databases compared to those of synthetic drugs. Even though the universe of natural products covers a more diverse chemical space, it is limited by being heavily dependent on the identification, isolation, and characterization of bioactive natural products from the biodiversity. However, our QSAR models were able to identify compounds with relevant activity in vitro, as highlighted by the nanomolar levels of parasite growth inhibition for compounds LDT-597

and LDT-598 against multi-drug-resistant *P. falciparum* W2 strains. These two compounds, which are artesunate derivatives, show activity about 10-fold more potent than artesunate itself (EC_{50} = 5.7 nM) against this same multi-resistant strain [38]. The identification of sesquiterpene lactones containing an endoperoxide bridge as the most promising antimalarial candidates within a diverse set of natural products and derivatives illustrates the agreement in the results obtained with the virtual screening pipeline, as this class of compounds has been widely characterized as potent antimalarial molecules [39–41]. By describing structural moieties that support antimalarial activity, HQSAR analysis performed by Avery and colleagues [42] showed that the lactone ring has a strong positive contribution for the antimalarial activity of artemisinin. Once this lactone ring is the main common substructure among artemisinin, artesunate and compounds LDT-597 and LDT-598, the robust potency of the latter two compounds can be explained by this shared feature that is responsible for antimalarial activity even against drug-resistant *P. falciparum* parasites.

Since the pace of drug resistance selection in *P. falciparum* parasites has been as fast as ever, there is an urgent need to ensure efficacy of compounds that stand out within the pipeline of drug discovery. For this reason, in silico models for pharmacokinetic antimalarial drugs have been developed, including those that have analyzed properties of artemisinin derivatives [43–45]. Altogether, the results highlight a better pharmacokinetics profile of LDT-597 when compared with artesunate, which might enhance efficacy of treatments using this compound instead of the traditional artemisinin derivatives.

5. Conclusions

Herein, we report a QSAR-based virtual screening study for predicting the antimalarial potential of a library of natural compounds and derivatives and explore the potential molecular target for the most potent compounds. Aiming to validate our in silico approach, we identified two compounds with low nanomolar inhibition levels against multi-drug-resistant *P. falciparum* strain in vitro. Moreover, in silico ADME/PBPK analysis of one of these compounds showed that it presents favorable physicochemical characteristics. The work presented endorses the applicability of natural compound databases for virtual screening campaigns and supports QSAR as a means of identifying potent and selective compounds against the malaria parasite.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/2218-273X/11/3/459/s1, Supplemental File S1: Virtual screening of selected hits. Supplemental Figure S1: Structural diversity map of 265 virtual hits obtained from the virtual screening. Compounds were clustered based on their Tanimoto similarity. Grey circles show compounds that were removed during the clusterization process; these compounds mostly belong to bigger clusters where the structural diversity is small. The green circles and rectangles show compounds that were kept by the clusterization algorithm. Green rectangles are the compounds selected from different clusters for visual inspection and acquisition. Supplemental Figure S2: ADME and PBPK multiparametric prediction of artesunate using the Detoxie® software. Supplemental Figure S3: ADME and PBPK multiparametric prediction of dihydroartemisinin using the Detoxie® software.

Author Contributions: L.T.F., C.H.A. and F.T.M.C. participated in study conceptualization; L.T.F. and A.R. performed cell culture (cell line and parasites) and in vitro assays; L.T.F., J.V.B.B. and J.T.M.-F. carried out the in silico studies; L.T.F. prepared the original manuscript draft; L.T.F., J.V.B.B., J.T.M.-F., A.R., C.H.A. and F.T.M.C. were involved in manuscript reviewing and editing; C.H.A. and F.T.M.C. coordinated the study and were responsible for funding acquisition. All authors read and approved the final version of this manuscript.

Funding: The authors would like to thank Brazilian funding agencies, CNPq, FAPEG, FAPESP, and CAPES for financial support and fellowships. LT, JVVBB, AR and FTMC were supported by FAPESP (Grants #2019/02171-3, #2019/21854-4, #2020/02158-4 and #2017/18611-7). FTMC and CHA are CNPq research fellows.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material. The data presented in this study are available in supplementary material.

Acknowledgments: We would like to thank José L. Medina-Franco for editing this Special Issue.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

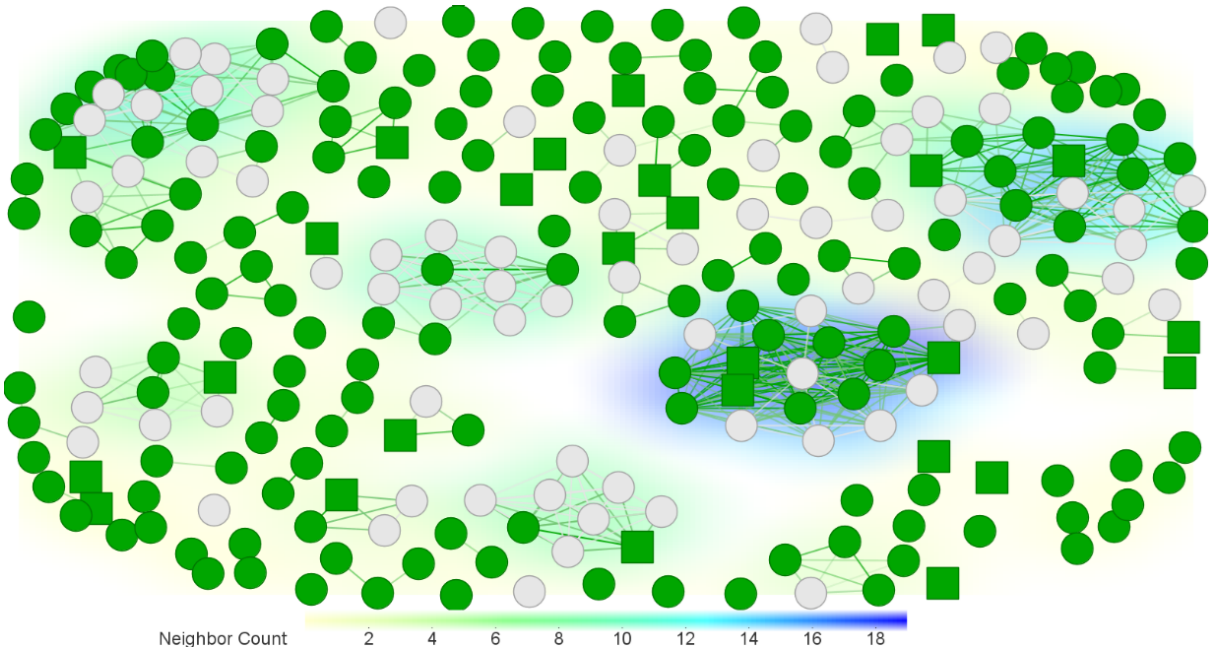
References

1. World Health Organization. *World Malaria Report 2019*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019.
2. Rogerson, S.J.; Beeson, J.G.; Laman, M.; Poespoprodjo, J.R.; William, T.; Simpson, J.A.; Price, R.N.; The ACREME Investigators. Identifying and combating the impacts of COVID-19 on malaria. *BMC Med.* **2020**, *18*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
3. Sherrard-Smith, E.; Hogan, A.B.; Hamlet, A.; Watson, O.J.; Whittaker, C.; Winskill, P.; Ali, F.; Mohammad, A.B.; Uhomoibhi, P.; Maikore, I.; et al. The potential public health consequences of COVID-19 on malaria in Africa. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1411–1416. [CrossRef] [PubMed]
4. Haldar, K.; Bhattacharjee, S.; Safeukui, I. Drug resistance in Plasmodium. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *16*, 156–170. [CrossRef] [PubMed]
5. Noedl, H.; Se, Y.; Schaecher, K.; Smith, B.L.; Socheat, D.; Fukuda, M.M. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2619–2620. [CrossRef] [PubMed]
6. Uwimana, A.; Legrand, E.; Stokes, B.H.; Ndikumana, J.-L.M.; Warsame, M.; Umulisa, N.; Ngamije, D.; Munyaneza, T.; Mazarati, J.-B.; Munguti, K.; et al. Emergence and clonal expansion of in vitro artemisinin-resistant Plasmodium falciparum kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1602–1608. [CrossRef] [PubMed]
7. Achan, J.; O Talisuna, A.; Erhart, A.; Yeka, A.; Tibenderana, J.K.; Baliraine, F.N.; Rosenthal, P.J.; D'Alessandro, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. *Malar. J.* **2011**, *10*, 144. [CrossRef] [PubMed]
8. Bosman, A.; Mendis, K.N. A Major Transition in Malaria Treatment: The Adoption and Deployment of Artemisinin-Based Combination Therapies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 193–197. [CrossRef] [PubMed]
9. Chatterjee, A.K. Back to the Future: Lessons Learned in Modern Target-based and Whole-Cell Lead Optimization of Antimalarials. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 473–483. [CrossRef] [PubMed]
10. Kim, S.; Thiessen, P.A.; Bolton, E.E.; Chen, J.; Fu, G.; Gindulyte, A.; Han, L.; He, J.; He, S.; Shoemaker, B.A.; et al. PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1202–D1213. [CrossRef]
11. Bento, A.P.; Gaulton, A.; Hersey, A.; Bellis, L.J.; Chambers, J.; Davies, M.; Krüger, F.A.; Light, Y.; Mak, L.; McGlinchey, S.; et al. The ChEMBL bioactivity database: An update. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D1083–D1090. [CrossRef]
12. Cherkasov, A.; Muratov, E.N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I.I.; Cronin, M.; Dearden, J.; Gramatica, P.; Martin, Y.C.; Todeschini, R.; et al. QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To? *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4977–5010. [CrossRef]
13. Jorgensen, W.L. The Many Roles of Computation in Drug Discovery. *Science* **2004**, *303*, 1813–1818. [CrossRef]
14. Nantasenamat, C.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V. Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5*, 633–654. [CrossRef]
15. Verma, J.; Khedkar, V.M.; Coutinho, E.C. 3D-QSAR in Drug Design—A Review. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 95–115. [CrossRef]
16. Zhang, L.; Fourches, D.; Sedykh, A.; Zhu, H.; Golbraikh, A.; Ekins, S.; Clark, J.; Connelly, M.C.; Sigal, M.; Hodges, D.; et al. Discovery of Novel Antimalarial Compounds Enabled by QSAR-Based Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 475–492. [CrossRef]
17. Neves, B.J.; Dantas, R.F.; Senger, M.R.; Melo-Filho, C.C.; Valente, W.C.G.; De Almeida, A.C.M.; Rezende-Neto, J.M.; Lima, E.F.C.; Paveley, R.; Furnham, N.; et al. Discovery of New Anti-Schistosomal Hits by Integration of QSAR-Based Virtual Screening and High Content Screening. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 7075–7088. [CrossRef]
18. Lima, M.N.N.; Melo-Filho, C.C.; Cassiano, G.C.; Neves, B.J.; Alves, V.M.; Braga, R.C.; Cravo, P.V.L.; Muratov, E.N.; Calit, J.; Bargieri, D.Y.; et al. QSAR-Driven Design and Discovery of Novel Compounds With Antiplasmodial and Transmission Blocking Activities. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 146. [CrossRef]
19. Gomes, M.N.; Alcântara, L.M.; Neves, B.J.; Melo-Filho, C.C.; Freitas-Junior, L.H.; Moraes, C.B.; Ma, R.; Franzblau, S.G.; Muratov, E.N.; Andrade, C.H. Computer-aided discovery of two novel chalcone-like compounds active and selective against Leishmania infantum. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2459–2464. [CrossRef]
20. Melo-Filho, C.C.; Dantas, R.F.; Braga, R.C.; Neves, B.J.; Senger, M.R.; Valente, W.C.G.; Rezende-Neto, J.M.; Chaves, W.T.; Muratov, E.N.; Paveley, R.A.; et al. QSAR-Driven Discovery of Novel Chemical Scaffolds Active against Schistosoma mansoni. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 1357–1372. [CrossRef]
21. Xie, N.; Wang, C.; Lian, Y.; Wu, C.; Zhang, H.; Zhang, Q. Inhibition of mitochondrial fission attenuates Aβ-induced microglia apoptosis. *Neuroscience* **2014**, *256*, 36–42. [CrossRef]
22. Neves, B.; Moreira-Filho, J.; Silva, A.; Borba, J.; Mottin, M.; Alves, V.; Braga, R.; Muratov, E.; Andrade, C. Automated Framework for Developing Predictive Machine Learning Models for Data-Driven Drug Discovery. *J. Braz. Chem. Soc.* **2021**, 1–13. [CrossRef]
23. Lima, M.N.N.; Cassiano, G.C.; Tomaz, K.C.P.; Silva, A.C.; Sousa, B.K.P.; Ferreira, L.T.; Tavella, T.A.; Calit, J.; Bargieri, D.Y.; Neves, B.J.; et al. Integrative Multi-Kinase Approach for the Identification of Potent Antiplasmodial Hits. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 773. [CrossRef] [PubMed]
24. Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A. Trust, But Verify: On the Importance of Chemical Structure Curation in Cheminformatics and QSAR Modeling Research. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1189–1204. [CrossRef] [PubMed]

25. Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A. Trust, but Verify II: A Practical Guide to Chemogenomics Data Curation. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 1243–1252. [CrossRef] [PubMed]
26. Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A. Curation of chemogenomics data. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 535. [CrossRef] [PubMed]
27. Wang, R.; Fu, A.Y.; Lai, L. A New Atom-Additive Method for Calculating Partition Coefficients. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, *37*, 615–621. [CrossRef]
28. Butina, D. Unsupervised Data Base Clustering Based on Daylight's Fingerprint and Tanimoto Similarity: A Fast and Automated Way to Cluster Small and Large Data Sets. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39*, 747–750. [CrossRef]
29. Sydow, D.; Morger, A.; Driller, M.; Volkamer, A. TeachOpenCADD: A teaching platform for computer-aided drug design using open source packages and data. *J. Cheminform.* **2019**, *11*, 29. [CrossRef]
30. Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Rufener, C. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 460–473. [CrossRef]
31. Trager, J.J.W. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**, *193*, 673–675. [CrossRef]
32. Radfar, A.; Méndez, D.; Moneriz, C.; Linares, M.; Marín-García, P.; Puyet, A.; Diez, A.; Bautista, J.M. Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1899–1915. [CrossRef]
33. Hartwig, C.L.; Ahmed, A.O.A.; Cooper, R.A.; Stedman, T.T. SYBR Green I®-Based Parasite Growth Inhibition Assay for Measurement of Antimalarial Drug Susceptibility in Plasmodium Falciparum. In *Methods in Malaria Research*; Moll, K., Kaneko, A., Scherf, A., Wahlgren, M., Eds.; EVIMalaR: Manassas, Virginia, 2013; pp. 122–129.
34. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [CrossRef]
35. Djoumbou-Feunang, Y.; Fiamoncini, J.; Gil-De-La-Fuente, A.; Greiner, R.; Manach, C.; Wishart, D.S. BioTransformer: A comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. *J. Cheminform.* **2019**, *11*, 1–25. [CrossRef]
36. Cui, L.; Su, X.-Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2009**, *7*, 999–1013. [CrossRef]
37. Karunajeewa, H.A. Artemisinins: Artemisinin, Dihydroartemisinin, Artemether and Artesunate. In *Treatment and Prevention of Malaria*; Metzler, J.B., Ed.; Springer Basel: Basel, Switzerland, 2011; pp. 157–190.
38. Smit, F.J.; van Biljon, R.A.; Birkholtz, L.-M.; N'Da, D.D. Synthesis and in vitro biological evaluation of dihydroartemisinyl-chalcone esters. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 33–44. [CrossRef]
39. Pedersen, M.M.; Chukwujekwu, J.C.; Lategan, C.A.; Van Staden, J.; Smith, P.J.; Staerk, D. Antimalarial sesquiterpene lactones from Distephanus angulifolius. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 601–607. [CrossRef]
40. Francois, G.; Passreiter, C.M. Pseudoguaianolide sesquiterpene lactones with high activities against the human malaria parasitePlasmodium falciparum. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 184–186. [CrossRef]
41. Bordignon, A.; Frédérich, M.; LeDoux, A.; Campos, P.-E.; Clerc, P.; Hermann, T.; Quetin-Leclercq, J.; Cieckiewicz, E. In vitro antiplasmodial and cytotoxic activities of sesquiterpene lactones from Vernonia fimbrillifera Less. (Asteraceae). *Nat. Prod. Res.* **2017**, *32*, 1463–1466. [CrossRef]
42. Avery, M.A.; Alvim-Gaston, M.; Rodrigues, C.R.; Barreiro, E.J.; Cohen, F.E.; Sabnis, Y.A.; Woolfrey, J.R. Structure−Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. The Development of Predictive In Vitro Potency Models Using CoMFA and HQSAR Methodologies. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 292–303. [CrossRef]
43. Arey, R.; Reisfeld, B. Predicting the Disposition of the Antimalarial Drug Artesunate and Its Active Metabolite Dihydroartemisinin Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *65*. [CrossRef]
44. Gordi, T.; Xie, R.; Huong, N.V.; Huong, D.X.; Karlsson, M.O.; Ashton, M. A semiphysiological pharmacokinetic model for artemisinin in healthy subjects incorporating autoinduction of metabolism and saturable first-pass hepatic extraction. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2005**, *59*, 189–198. [CrossRef]
45. Olafuyi, O.; Coleman, M.; Badhan, R.K. Development of a paediatric physiologically based pharmacokinetic model to assess the impact of drug-drug interactions in tuberculosis co-infected malaria subjects: A case study with artemether-lumefantrine and the CYP3A4-inducer rifampicin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 20–33. [CrossRef]

Supporting material

Supplemental File S1. Virtual screening of selected hits. (Table too extensive, available online at https://www.mdpi.com/2218-273X/11/3/459/s1)



Supplemental Figure S1. Structural diversity map of 265 virtual hits obtained from the virtual screening. Compounds were clustered based on their Tanimoto similarity. Grey circles show compounds that were removed during the clusterization process; these compounds mostly belong to bigger clusters where the structural diversity is small. The green circles and rectangles show compounds that were kept by the clusterization algorithm. Green rectangles are the compounds selected from different clusters for visual inspection and acquisition.

PERMEABILITY

Human Intestinal Absorption (HIA)	2.29 cm/s × 10^{4}
MDCK Permeability	21.75 cm/s × 10^{7}
Molecular Diffusion Coefficient	0.65 cm^{2}/s × 10^{5}
Human Skin	1.04 cm/s × 10^{7}
Rabbit cornea	33.35 cm/s × 10^{7}
CNS (Blood-brain barrier)	BBB(-)
Molar Volume (normal BP)	378 cm^{3}/mol

ABSORPTION

Absorption risk	Low permeability, Excessive charge
logP (octanol-water, also known as Kow)	2.33
logD (octanol-water - Lipophilicity ionisable cpds)	-0.35

SOLUBILITY

Aqueous	0.165 mg/mL
Aqueous solubility at pH 7.4	25.18 mg/mL
Aqueous intrinsic solubility	0.129 mg/mL
Aqueous solubility (pH at saturation)	4.12
Aqueous salts solubility factor	247.35
Supersaturated solution	Potential supersaturate (+)

SIMULATED GASTROINTESTINAL FLUIDS

Fasted state gastric fluid	0.065 mg/mL
Fasted state intestinal fluid	0.332 mg/mL
Fed state intestinal fluid	0.303 mg/mL

METABOLISM

Metabolism Risk	-
Clearance Classification System	Renal uptake clearance

HUMAN LIVER MICROSOMES (HML)

Overall unbound Intrinsic Clearance	5.35 µL/min/mg

RAT LIVER MICROSOMES (RML)

Overall unbound Intrinsic Clearance	21.43 µL/min/mg

CYP3A4 (human liver microsomes)

Inhibition/Substrate	Non inhibitor/substrate (-)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-

CYP3A4

Inhibition/Substrate	Non inhibitor/substrate (-)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-

CYP2C9

Inhibition/Substrate	Non inhibitor/substrate (-)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-

CYP2D6

Inhibition/Substrate	Non inhibitor/substrate (-)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-
ALDEHYDE OXIDASE (AOX)	Non-substrate (-)
UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE	Substrate (+) (UGT1A3, UGT2B7)

CYP1A2

Inhibition/Substrate	Potential inhibitor (+)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-

RAT PBPK EXPLORER

Volume of distribution (Vd)	0.20 L/Kg
Fraction unbound to protein plasma (fup)	21.32 %
Ratio of blood to plasma (RBP)	0.67
Fraction absorbed (Fa%) @ 1 mg	97.34 %
Oral bioavaliability (F%) @ 1 mg	84.72%
Max. plasma conc. (Cmax) @ 1 mg	4423.43 ng/mL
Time to max. plasma conc. (Tmax) @ 1 mg	0.81 hr
Area under the curve (AUC) @ 1 mg	6342.32 ng-hr/mL

HUMAN PBPK EXPLORER

Volume of distribution (Vd)	0.15 L/Kg
Fraction unbound to protein plasma (fup)	13.71 %
Fraction unbound to microsomes (fumic)	0.91
Ratio of blood to plasma (RBP)	1.062
Fraction absorbed (Fa%) @ 10 mg	99.33 %
Oral bioavaliability (F%) @ 10 mg	95.1 %
Max. plasma conc. (Cmax) @ 10 mg	246.12 ng/mL
Time to max. plasma conc. (Tmax) @ 10 mg	2.21 hr
Area under the curve (AUC) @ 10 mg	2540.21 ng-hr/mL

Supplemental Figure S2. ADME and PBPK multiparametric prediction of artesunate using the Detoxie® software.

PERMEABILITY

Human Intestinal Absorption (HIA)	3.87 cm/s × 10^{4}
MDCK Permeability	253.23 cm/s × 10^{7}
Molecular Diffusion Coefficient	0.65 cm^{2}/s × 10^{5}
Human Skin	0.89 cm/s × 10^{7}
Rabbit cornea	175.23 cm/s × $^{7}10$
CNS (Blood-brain barrier)	BBB(+)
Molar Volume (normal BP)	288 cm^{3}/mol

ABSORPTION

Absorption risk	-
logP (octanol-water, also known as Kow)	2.15
logD (octanol-water - Lipophilicity ionisable cpds)	2.15

SOLUBILITY

Aqueous	0.059 mg/mL
Aqueous solubility at pH 7.4	0.059 mg/mL
Aqueous intrinsic solubility	0.059 mg/mL
Aqueous solubility (pH at saturation)	7.00
Aqueous salts solubility factor	325.35
Supersaturated solution	Non supersaturate (+)

SIMULATED GASTROINTESTINAL FLUIDS

Fasted state gastric fluid	0.058 mg/mL
Fasted state intestinal fluid	0.182 mg/mL
Fed state intestinal fluid	0.160 mg/mL

METABOLISM

Metabolism Risk	-
Clearance Classification System	Metabolism clearance

HUMAN LIVER MICROSOMES (HML)

Overall unbound Intrinsic Clearance	5.35 µL/min/mg

RAT LIVER MICROSOMES (RML)

Overall unbound Intrinsic Clearance	50.71 µL/min/mg

CYP3A4 (human liver microsomes)

Inhibition/Substrate	Potential substrate (+)
Michaelis-Menten constant (Km)	940.13 µM
Maximum metabolic rate (Vmax)	0.665 nmol/min/nmol
Intrinsic clearance (CLint)	0.81 µL/min/mg

CYP3A4

Inhibition/Substrate	Potential substrate (+)
Michaelis-Menten constant (Km)	244.32 µM
Maximum metabolic rate (Vmax)	41.23 nmol/min/nmol
Intrinsic clearance (CLint)	18.54 µL/min/mg

CYP2C9

Inhibition/Substrate	Potential substrate (+)
Michaelis-Menten constant (Km)	371.43 µM
Maximum metabolic rate (Vmax)	1.23 nmol/min/nmol
Intrinsic clearance (CLint)	0.22 µL/min/mg

CYP2D6

Inhibition/Substrate	Non inhibitor/substrate (-)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-
ALDEHYDE OXIDASE (AOX)	Non-substrate (-)
UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE	Substrate (+) (UGT1A4, UGT2B7)

CYP1A2

Inhibition/Substrate	Non inhibitor/substrate (-)
Michaelis-Menten constant (Km)	-
Maximum metabolic rate (Vmax)	-
Intrinsic clearance (CLint)	-

RAT PBPK EXPLORER

Volume of distribution (Vd)	1.48 L/Kg
Fraction unbound to protein plasma (fup)	21.32 %
Ratio of blood to plasma (RBP)	0.89
Fraction absorbed (Fa%) @ 1 mg	97.34 %
Oral bioavaliability (F%) @ 1 mg	58.72%
Max. plasma conc. (Cmax) @ 1 mg	590.94 ng/mL
Time to max. plasma conc. (Tmax) @ 1 mg	1.45 hr
Area under the curve (AUC) @ 1 mg	1423.33 ng-hr/mL

HUMAN PBPK EXPLORER

Volume of distribution (Vd)	2.07 L/Kg
Fraction unbound to protein plasma (fup)	13.71 %
Fraction unbound to microsomes (fumic)	0.91
Ratio of blood to plasma (RBP)	1.062
Fraction absorbed (Fa%) @ 10 mg	99.93 %
Oral bioavaliability (F%) @ 10 mg	83.2 %
Max. plasma conc. (Cmax) @ 10 mg	71.4 ng/mL
Time to max. plasma conc. (Tmax) @ 10 mg	2.57 hr
Area under the curve (AUC) @ 10 mg	428.32 ng-hr/mL

Supplemental Figure S3. ADME and PBPK multiparametric prediction of dihydroartemisinin using the Detoxie® software.

5. CAPÍTULO 2

A novel 4-aminoquinoline chemotype with multistage antimalarial activity and lack of cross-resistance with PfCRT and PfMDR1 mutations.

Letícia Tiburcio Ferreira, Gustavo Capatti Cassiano, Luis Carlos Salazar Alvarez, John Okombo, Juliana Calit, Diana Fontinha, Eva Gil-Iturbe, Rachael Coyle, Carolina Horta Andrade, Per Sunnerhagen, Pedro Cravo, Daniel Youssef Bargieri, Miguel Prudencio, Matthias Quick, Marcus C S Lee, David A. Fidock and Fabio Trindade Maranhão Costa

Artigo a ser submetido à revista Cell Chemical Biology.

A novel 4-aminoquinoline chemotype with multistage antimalarial activity and lack of cross-resistance with PfCRT and PfMDR1 mutations

Letícia Tiburcio Ferreira[1,2,3], Gustavo Capatti Cassiano[1,4], Luis Carlos Salazar Alvarez[1], John Okombo[2,3], Juliana Calit[5], Diana Fontinha6, Eva Gil-Iturbe[7], Rachael Coyle[8], Carolina Horta Andrade[9,10,11], Per Sunnerhagen[12], Daniel Youssef Bargieri[5], Miguel Prudencio[6], Matthias Quick[7,13,14], Pedro V. Cravo[4], Marcus C S Lee[8], David A. Fidock[2,3,15]** and Fabio Trindade Maranhão Costa[1]*

[1]Laboratory of Tropical Diseases Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; [2]Department of Microbiology and Immunology, Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA; [3]Center for Malaria Therapeutics and Antimicrobial Resistance, Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA; [4]Global Health and Tropical Medicine, Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health, LA-REAL, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa, Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal; [5]Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil; [6]Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal; [7]Department of Psychiatry, Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA; [8]Wellcome Sanger Institute, Wellcome Genome Campus, Hinxton, UK; [9]Laboratory of Molecular Modeling and Drug Design (LabMol), Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil; [10]Center for the Research and Advancement in Fragments and molecular Targets (CRAFT), School of Pharmaceutical Sciences at Ribeirao Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil; [11]Center for Excellence in Artificial Intelligence (CEIA), Institute of Informatics, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil; [12]Department of Chemistry and Molecular Biology, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden; [13]Department of Physiology & Cellular Biophysics, Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA; [14]New York State Psychiatric Institute, Area Neuroscience – Molecular Therapeutics, New York, NY, USA; 15Division of Infectious Diseases, Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA.

* Corresponding authors: FTMC: fabiotmc72@gmail.com; DAF: df2260@cumc.columbia.edu.

SUMMARY

The spread of artemisinin-resistant malaria parasites from Southeast Asia to Africa drives the urgent need for antimalarial chemotypes with novel modes of action lacking cross-resistance with known resistance mechanisms in clinical settings. Previously, we applied a computer-aided drug discovery (CADD) approach that allowed us to identify a 4-aminoquinoline (LDT-611) with activity against P. falciparum. In the present work, we identified a structurally analog with a side-chain-modified 4-aminoquinoline (LDT-623), and through phenotypical assays we show that this compound presents moderate yet unusual multistage antimalarial activity. Even though this compound shares canonical quinoline features such as inhibition of hemozoin formation in the digestive vacuole and PfCRT binding, efforts to evolve resistance to it in vitro were unsuccessful, which represents a favorable outcome in antimalarial drug discovery. Moreover, cross-resistance deconvolution showed that this 4-aminoquinoline is not only refractory to important quinoline resistance mechanisms such as genetic alterations in pfcrt and pfmdr1, but also may curb several drug targets in the malaria parasite that are advancing through clinical trials. In conclusion, we report the identification of a novel 4-aminoquinoline whose mode of action is likely to be distinct from other drugs of the same chemical class, paving the way for future studies on this chemotype as a therapeutic alternative in the ever-evolving scenario of antimalarial drug resistance.

KEYWORDS: malaria, antimalarial, 4-aminoquinoline, Plasmodium falciparum, resistance mechanism.

1. INTRODUCTION

A staggering 247 million malaria episodes recorded in 2021 [1] illustrate the profound impact this disease still inflicts on developing nations and their health systems. Despite a substantial reduction in the number of malaria cases and deaths from 2000 to 2015, rapidly evolving resistance to antimalarial drugs in clinical use represents a significant roadblock towards malaria control. Delayed parasite clearance

following artemisinin-based combination therapy (ACT), the current frontline treatment, was first reported in Southeast Asia [2]. Although clinical evidence is still scarce, parasites with specific mutations in PfK13 [2–4], such as C580Y and R539T, are established markers of artemisinin resistance and have been rapidly spreading to East Africa [5–9]. Considering the massive reliance on ACTs in this region, this threat to public health calls for urgent drug discovery and development favoring molecules able to avoid resistance mechanisms that have previously evolved in natural parasite populations.

During the asexual blood stage of their life cycle, Plasmodium parasites digest host hemoglobin in the digestive vacuole (DV) for their development. To counteract the release of free heme, a toxic by-product of this digestion, malaria parasites carry out a detoxification process by converting it into inert hemozoin (Hz) [10]. Quinoline drugs such as chloroquine (CQ) and piperaquine (PPQ) are believed to exert their antimalarial activity by accumulating within the DV and binding to Hz, enhancing free heme toxicity. Extensive CQ deployment worldwide as the drug of choice for malaria treatment for over 40 years due to its potent, affordable, and well-tolerated features have favored its high selective pressure against Plasmodium spp. Point mutations in the P. falciparum chloroquine resistance transporter (PfCRT), an oligopeptide transporter located in the DV [11], have been identified as the main drivers of quinoline resistance via point mutations [12]. Polymorphic PfCRT variants carry between 4 and 10 mutations that modify the response to CQ and PPQ [13,14]. However, several 4-aminoquinolines (4-AQ) maintain similar activity in both CQ-sensitive and CQ-resistant parasites, probably because they are not recognized and exported by the mutant PfCRT [15]. Thus, in the last few years, more versatile 4-AQs are advancing in clinical trials as effective alternatives to tackle resistance, as exemplified by ferroquine, amodiaquine, and pyronaridine [16].

Herein, we report on the molecular characterization of the antiplasmodial activity of LDT-623, a side-chain-modified 4-AQ structurally analogous to a molecule named LDT-611 identified in a screening campaign previously carried out focusing on novel antiplasmodial compounds derived from natural products [17]. Considering the goal of malaria elimination, efforts towards novel therapeutic interventions need to go beyond activity against ABS parasites. Hence, challenged by the insufficiently explored multistage antiplasmodial activity of aminoquinolines, we decided to evaluate the

transmission-blocking and exoerythrocytic potentials of LDT-623. Further, we investigated its mode of action (MoA) and possible cross-resistance with known drug targets. Our data open new avenues for further exploration of this historically highly effective class of antimalarials.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Compound preparation.

Screening compounds were purchased from providers ChemBridge, MedChemExpress, InterBioScreen, ChemDiv Inc, and BLD Pharmatech Ltd, through the MolPort website (www.molport.com) and were further dissolved in DMSO in 10 mM stock solutions. Standard antimalarial drugs were purchased from Sigma-Aldrich and prepared at 10 mM as well.

2.2. Virtual screening workflow for the identification of LDT-611 structural analog molecules.

Based on the premise that similar compounds may possess similar biological activity, we designed and carried out a virtual screening workflow to select molecules with relevant structural similarity compared to LDT-611. We screened the MolPort library of screening compounds with around 7.5 million molecules at the time. Within their website, we employed the “Find similar” function that utilizes the Tanimoto coefficient to filter molecules with structural similarity. A similarity cutoff of 78% (Tc = 0.78) was defined based on structural resemblance to LDT-611. Further steps removed double entries and molecules whose antimalarial activity had been previously reported on PubChem. A final filter removed acridines from the dataset. Finally, the selected analogs were purchased and evaluated in vitro.

2.3. *P. falciparum in vitro* culture and ABS assays.

P. falciparum ABS parasites were cultured at a 3% hematocrit in human O^+ red blood cells in RPMI-1640 media supplemented with 25 mM HEPES, 50 mg/L hypoxanthine, 2 mM L-glutamine, 0.21% sodium bicarbonate, 0.5% (w/v) AlbuMAXII (Invitrogen) and 10 µg/mL gentamycin. Culture flasks were kept in modular incubator

chambers (Billups-Rothenberg) at a 5% O_2, 5% CO_2 and 90% N_2 atmosphere at 37°C. Ring stage-synchronized parasite cultures were obtained by two consecutive rounds of treatment with 5% D-sorbitol in approximate 48h intervals [18]. ABS parasite survival assays were performed to define half-maximal concentrations that inhibit 50% or 90% parasite growth (IC50 and IC90) of compounds by exposing cultures at 1% hematocrit and 0.3% parasitemia in 96-well plates in the presence of drugs in two-fold 10 or 12-point serial dilution in duplicate along with drug-free controls. After a 72h incubation, parasite survival was assessed by flow cytometry on an iQue flow cytometer (Sartorius) using SYBR green and MitoTracker Deep Red FM (Life Technologies) as nuclear stain and vital dye, respectively. Parasite survival was determined as a percentage relative to drug-free control. IC_{50} values were interpolated from log doses *vs* response curves in Prism 9 (GraphPad Prism Software Inc.).

2.4. Cytotoxicity assays.

Human hepatoma (HepG2) and fibroblast-like monkey kidney cells (COS-7) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and gentamycin (40 mg/L) at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Cytotoxicity of test compounds was measured by metabolic reduction of mitochondrial enzymes using the MTT assay (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium chloride) [19]. Cells were seeded at 105 cells/well in 96-well plates and incubated for 72h in the presence of a 2-fold 12-point serial dilution of drugs along with drug-free controls. 15 μL of MTT (5 mg/mL) were then added to the wells. Plates were centrifuged at 317G for 5 min and the pellet resuspended in isopropanol. Absorbance was measured at 570 nm (CLARIOStar, Labtech BMG), and cell viability, proportional to the amount of formazan produced, was expressed as a percentage of untreated control wells.

2.5. *P. falciparum* gametocyte production and growth inhibition assay.

*Pf*NF54-Pfs16-GFP-Luc (MRA-1217), a highly gametocyte-producing strain, was cultured following standard procedures [20]. *Pf*NF54-Luc ABS parasites were sorbitol-synchronized as previously described [18] and cultured to reach 8-10% parasitemia as mature trophozoites, when the gametogenesis induction via nutrient deficit stress

started, as described elsewhere [21]. Briefly, stress was induced by replacing only 40% of the culture medium and returning cultures to 37°C incubation. Cultures were maintained under 50 mM of N-acetylglucosamine for 10 days to inhibit asexual replication. Mature gametocytes (stages IV-V) were isolated using magnetic columns and incubated at 2% gametocytemia and 1.5% hematocrit in 96-well plates containing the test compounds for 48 h at 37°C, following standard *P. falciparum* culturing conditions. Methylene blue was used as a gametocytocidal control alongside drug-free wells. Luciferase activity was assessed by adding 40 µL of luciferin substrate (PROMEGA) to 40 µL of parasite lysates and detecting of resulting bioluminescence at an integration constant of 10s with the BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multimode Reader [22].

2.6. *In vitro* inhibition of *P. berghei* ookinete formation.

For measuring the inhibition of gamete conversion into ookinetes, a mutant luciferase (nLuc)-expressing *P. berghei* line, was used to intraperitoneally infect Balb/c mice [23]. Three to four days into the infection, gametocyte-carrying blood samples were collected from the animals. In vitro compound testing was carried out by exposing 4 µL of infected blood and 80 µL of culture medium (RPMI-1640 supplemented with 25 mM HEPES, 50 mg/L hypoxanthine, and 1% PSN – penicillin/streptomycin/neomycin at pH 8.3) to desired drug concentrations for 24 h at 21°C. Following the incubation, 20 µL of nLuc substrate (Nano-Glo® Luciferase Assay System – PROMEGA) was added to each well, and luminescence was measured in a luminometer. Increased light emission correlated with nLuc production and consequent luciferase activity due to in vitro fertilization and ookinete conversion, as luciferase expression in this parasite line is tied to CTRP, an ookinete-specific promoter. Conversion inhibition was calculated as the percentage of luciferase activity of drug-exposed wells relative to untreated ones. IC_{50} was interpolated from a log dose *versus* conversion inhibition curve.

2.7. *In vitro* inhibition of liver stage development.

In vitro inhibition of hepatic *Plasmodium* infection was assessed by bioluminescence analysis of Huh-7 cells infected with a firefly-luciferase-expressing *P.*

berghei line, *Pb*GFP-Luccon [24], in the presence of various compound concentrations. Huh-7 cells, a human hepatoma cell line, were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 10 mM HEPES at pH 7 at 37°C under 5% CO_2. One day before drug treatment and infection, 10^4 Huh-7 cells/well were seeded in 96-well plates. The medium was then replaced by infection medium (culture medium further supplemented with 50 µg/mL gentamycin and 0.8 µg/mL amphotericin B) containing desired concentrations of test compounds. Fresh sporozoites recovered from salivary glands of infected female Anopheles stephensi mosquitoes were added to seeded Huh-7 cells at a 1:1 proportion, followed by centrifugation at 1700g for 5 min and incubation for 46 h at 37°C with a 5% CO_2 atmosphere. Compound toxicity against Huh-7 cells was assessed by measuring cell confluency using the Alamar Blue assay (Invitrogen) while *Pb*GFP-Luccon infection load was quantified by a bioluminescence assay (Biotium). Nonlinear regression analysis was used to find normalized results of dose-response curves and IC_{50} was calculated using GraphPad Prism 9.

2.8. PfCRT transport measurement assay.

Purified PfCRT variants were reconstituted in preformed liposomes made of E. coli total lipids:cholesteryl hemisuccinate 97:3 (w/w) at a protein-to-lipid ratio of 1:150 (w/w). The lumen of the proteoliposomes was composed of 100 mM KPi, pH 7.5, and 2 mM β-mercaptoethanol. Uptake of [^{3}H]CQ (1 Ci/mmol) or [^{3}H]PPQ (1 Ci/mmol) was performed by diluting PfCRT-containing proteoliposomes (30 ng of proteoliposomes per reaction) in an uptake buffer containing 100 mM Tris/MES, pH 5.5, in the presence or absence of 1 µM of the test compounds. In addition, 1 µM valinomycin was added to the reaction to generate a K+ diffusion potential-driven membrane potential. Reactions were stopped after 30 s by the addition of ice-cold 100 mM KPi, pH 6.0, and 100 mM LiCl, and filtered through 0.45-µm nitrocellulose filters (Millipore). Filters were dried and incubated in a scintillation cocktail, and the radioactivity captured on the filters was counted in a Hidex SL300 scintillation counter. The specific radioactivity of all compounds was confirmed by counting known amounts of each radiolabel by the determination of the decay per minute to transform the decay per minute of the samples into pmol. The unspecific binding of all compounds with the nitrocellulose filters was determined by measuring the mock uptake in the absence of liposomes or

proteoliposomes, and these values (determined for each experiment) were used to calculate the uptake activity in liposomes or proteoliposomes. The specific uptake was determined by subtracting the time-dependent accumulation of the tested compounds in control liposomes (lacking PfCRT) from that measured in PfCRT-containing proteoliposomes [14].

2.9. Cellular heme polymerization assay.

A heme fractionation assay was used to measure the inhibition of hemozoin formation in cultured ABS *P. falciparum* 3D7 parasites as previously described [25]. Briefly, ring-stage *Pf*3D7 parasites were treated with consecutive D-sorbitol and Percoll solutions to obtain tightly synchronized 3h post-invasion young rings that were incubated with test drugs (0.5 – 3 x IC_{50}) alongside a vehicle control in standard culturing conditions described in section 2.2. Late trophozoites were harvested after 32 hours of incubation by lysing red blood cells with 0.05% saponin followed by multiple washes with 1 x PBS (pH 7.5) to remove any residual traces of hemoglobin. The parasite pellet was resuspended in PBS and the total number of trophozoites isolated was quantified using flow cytometry. Contents of the trophozoite pellet were released by hypotonic lysis and sonication. After centrifugation, treatments with HEPES buffer (pH 7.4), sodium dodecyl sulfate, pyridine, and NaOH, allowed fractions corresponding to heme species of interest to be recovered. A microplate reader was employed to measure the UV-visible spectrum of each heme fraction as a Fe(III)heme-pyridine complex. Fractions of digested hemoglobin, “free” heme, and Hz were quantified using a heme standard curve based on the mass of each heme-Fe species per mature trophozoite (fg/cell), obtained by dividing the total amount of each heme species by the corresponding number of parasites in that fraction previously determined by flow cytometry. Statistical comparisons and analyses for trends were made on GraphPad Prism 9 using Students’ t-tests.

2.10. Resistance selection experiments.

Resistance to LDT-623 was assessed in single-step selection protocols [26]. Duplicate flasks with 1 x 10^9 *P. falciparum* Dd2-Pol δ parasites, a hypermutable line that has its DNA polymerase δ activity ablated by point mutations [27], were exposed to

3 x IC^{50} under two different drug regimens: (1) removal of drug pressure as soon as live parasites cleared, and (2) drug pressure kept constant throughout the experiment. Cultures were monitored daily by thin blood smear for complete parasite killing until cleared of live parasites. Drug-containing media was changed daily until parasite clearance and every other day thereafter. Cultures were passaged once weekly by reducing volume by 25% and replacing 1/3 of red blood cells. Recrudescence monitoring was carried out twice a week by thin blood smears for 60 days. For susceptibility experiments, LDT-623 was assayed as described in section 2.2.

2.11. Resistome growth assay.

The resistome growth assay employs a parasite pool consisting of 51 barcoded lines including both Dd2 and 3D7 genetic backgrounds, with wild-type lines for both (Supplemental Table 3). Most resistant lines used were derived from *in vitro* resistance selection experiments, with a few that are CRISPR edited. All lines were then barcoded via CRISPR editing of a 101bp barcode cassette into the non-essential *pfpare* locus (PF3D7_0709700) [28]. Parasites were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with HEPES (5.94 g/L), $NaHCO_3$ (2.1 g/L), glutamax (1X), hypoxanthine (50 mg/L), gentamycin (25 µg/L), and AlbumaxII (5 g/L) at a 50% hematocrit. Parasite growth was monitored over 14 days by flow cytometry (Cytoflex, Beckman Coulter) by staining with 1X SYBR green and 0.2 µM MitoTracker Deep Red. Parasitemia adjustments were made to maintain a healthy range, preferably <5% parasitemia.

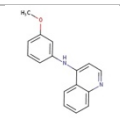
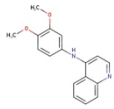
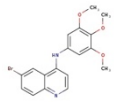
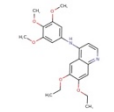
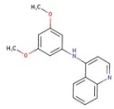
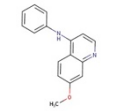
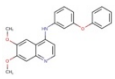
3. RESULTS

3.1. Identification and activity profiling of LDT-611 and its analogs.

In a previous study by our team, we identified several biodiversity-derived compounds with activity against *P. falciparum in vitro* [17]. Among the 3 compounds identified with nanomolar inhibition of parasite growth and selectivity indices > 10, we selected LDT-611 (Supplemental Figure 1A), a side-chain-modified 4, to further scrutinize its antimalarial potential given that it showed the least similarity with known antimalarial drugs in clinical use. LDT-611 inhibits the growth of CQ-sensitive (3D7) and multidrug-resistant (W2) parasite strains with IC_{50} values of 760 and 820 nM, respectively (Supplemental Figure 1B). Its equipotency between wild-type and mutant

PfCRT isoforms shows that this compound can circumvent CQ resistance. Since compounds with high structural similarity might possess similar biological activity, we aimed at identifying a potentially more active compound, using a selection pipeline to pinpoint LDT-611 structural analogs resulting in eleven final compounds purchased for experimental evaluation (Supplemental Figure 1C). using the Tanimoto coefficient. By comparing LDT-611 and its analogs, Tanimoto coefficients calculated (Supplemental Figure 1D), a quantitative measure of chemical scaffold similarity, showed that 78% of their structure is shared (Tc = 0.78), preserving the 4-AQ scaffold known for its antimalarial activity. The eleven analogs prioritized were then evaluated for their antiplasmodial activity in *P. falciparum* 3D7 and Dd2 strains, along with cytotoxicity in vitro in mammalian cell lines COS-7 and HepG2 (Table 1).

Table 1. *In vitro* activity of LDT-611 analogs against *P. falciparum* asexual stages and mammalian cell lines.

Code	2D structure	IC_{50}[a] (µM)		CC_{50}[b] (µM)	
		***Pf*3D7**	***Pf*Dd2**	**COS-7 (SI [c])**	**HepG2 (SI [d])**
LDT-617		1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	51.2 ± 6.6 (28.9)	40.8 ± 12.2 (23.1)
LDT-618		1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	> 100 (> 56.5)	29.8 ± 9.7 (16.8)
LDT-619		> 5	> 5	3.3 ± 0.3 (0.7)	0.3 ± 0.04 (0.1)
LDT-620		0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.1	2.6 ± 0.3 (6.3)	1.6 ± 0.1 (3.8)
LDT-621		2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.3	6.5 ± 4.2 (2.8)	0.5 ± 0.1 (0.2)
LDT-622		0.2 ± 0.02	0.3 ± 0.06	3.8 ± 0.7 (17.5)	3.0 ± 0.9 (13.7)
LDT-623		0.13 ± 0.01	0.3 ± 0.03	0.5 ± 0.1 (3.8)	1.3 ± 0.1 (10)

LDT-624		1.6 ± 0.7	1.0 ± 0.2	41.3 ± 17.2 (26.1)	32.5 ± 7.5 (20.6)
LDT-625		3.2 ± 0.8	2.9 ± 0.5	20.4 ± 1.3 (6.2)	33.3 ± 3.8 (10.3)
LDT-626		5.5 ± 0.5	3.2 ± 0.4	50.9 ± 22.2 (9.3)	53.8 ± 10.8 (9.8)
LDT-627		2.5 ± 0.8	2.0 ± 0.2	54.5 ± 16.7 (22.1)	12.7 ± 6.4 (5.2)

[a] IC_{50}: half the maximum inhibitory concentration in *P. falciparum* 3D7 and Dd2 strains and their respective standard errors (N=3); [b] CC_{50}: half the maximum cytotoxic concentration in mammalian cell lines (N=3); [c] SI: Selectivity index calculated dividing CC_{50} (COS-7) by IC_{50} (*Pf*3D7); SI [d]: Selectivity index calculated dividing CC_{50} (HepG2) by IC_{50} (*Pf*3D7).

3.2. LDT-623, the most potent analog, presents multistage antiplasmodial activity.

LDT-623 presented the lowest nanomolar IC_{50} values among the series of analog compounds tested in *P. falciparum* ABS *in vitro* cultures (126.6 ± 0.1 and 365.2 ± 17.5 nM for *Pf*3D7 and *Pf*Dd2 strains, respectively) (Figure 1A). Considering these results, this compound was selected for further experimental evaluation of its antimalarial activity throughout the stages of the parasite life cycle.

The potential transmission-blocking activity of LDT-623 was assessed by exposing *Pf*NF54 stage IV-V gametocytes to 5 μM of test compounds. LDT-623 inhibited 61.7% of mature gametocyte development compared to untreated control (Figure 1B), an unusual activity for 4-AQs [29]. Gametocytocidal activity was assessed alongside methylene blue, a positive control that showed 100% activity at the same concentration. Moreover, a P. berghei model was also employed to evaluate LDT-623's ability to inhibit ookinete formation *in vitro* in a conversion assay. A dose-response curve of LDT-623 showed an IC_{50} of 1.5 ± 0.2 μM (Figure 1C). CQ was only able to inhibit 56.7% of zygote conversion into ookinetes at 10 μM (Supplemental Figure 2).

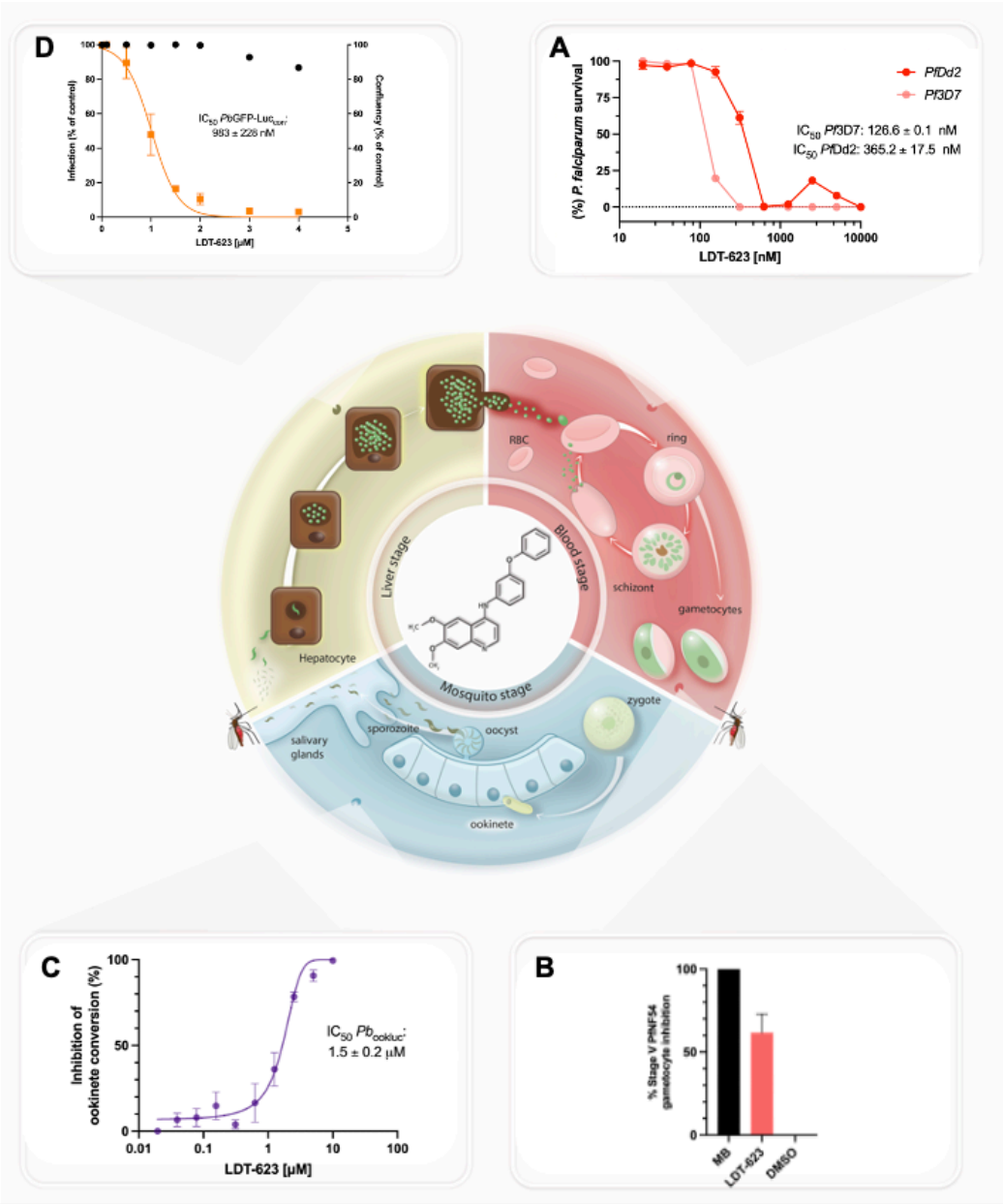


Figure 1. Antiplasmodial activity of LDT-623 throughout the parasite life stages. (A) LDT-623 *in vitro* activity against ABS *P. falciparum* chloroquine-sensitive 3D7 and chloroquine-resistant Dd2 strains. IC_{50}: 126.6 and 365.2 nM, respectively. Parasite survival was calculated as percentage of untreated control. Data represents mean ± SEM (N = 2-3). (B) Percent activity of LDT-623 against late-stage *Pf*NF54 gametocytes at 5 µM. Gametocyte viability was assessed via bioluminescence. Data represents mean ± SEM (N = 3). MB: methylene blue; DMSO: dimethyl sulfoxide. (C) Dose-response curve for LDT-623 concentration versus inhibition of *P. berghei* ookinete formation compared to vehicle-treated control. IC_{50}: 1.5 µM. Data represents mean ± SEM (N = 7). (D) Pre-erythrocytic activity of LDT-623. IC_{50}: 983 nM. Dose-response curve represents hepatic infection as percentage of drug-free control assessed by luminescence 48h after infection of Huh-7 cells with *P. berghei* sporozoites, while black dots express host cell confluency. Data represents mean ± SEM (N = 2).

Finally, the pre-erythrocytic activity of LDT-623 was assessed employing a well-established *in vitro P. berghei* model, revealing an IC_{50} of 983 ± 228 nM for this drug (Figure 1D). In agreement with its IC_{50}, LDT-623 showed 52.1% inhibition of hepatic infection at 1 μM, while primaquine, used as a positive control showed ~50% inhibition at 10 μM (Supplemental Figure 3). Of note, no dose-dependent toxicity toward the Huh-7 host cells was observed, as shown by a relatively constant percentage of cell viability (>86% at 4 μM LDT-623) across the experimental conditions.

3.3. LDT-623 inhibits intracellular hemozoin polymerization.

The 4-AQ core, contained by antimalarial drugs such as CQ and PPQ, interferes with the heme detoxification pathway inside the digestive vacuole: drug-heme complexes inhibit Hz synthesis causing a buildup of toxic “free” heme [30,31]. Considering that the maximal activity for LDT-623 was observed for ABS and that this compound is a 4-AQ, we used the cellular heme fractionation assay to investigate whether LDT-623 shares this mode of action.

Heme fractionation profiling of LDT-623 revealed a statistically significant increase in “free” heme in a dose-dependent manner compared to untreated control (Figure 2A). Accordingly, statistical significance was observed in the same drug interval for Hz decrease. Moreover, an augmented percentage of hemoglobin was observed starting at 0.5 x IC_{50}. CQ, used as a positive control, also exhibited a significant increment in “free” heme was seen starting at 0.5 x IC_{50} while Hz ratios only significantly decreased from 2 x IC_{50}. Interestingly, the proportion of “free” heme present as undigested Hb within the DV after incubation was significant at 2.5 x IC_{50} of CQ only (Figure 2B). As a negative control, parasites were treated with KAE609 (cipargamin), a PfATP4 inhibitor, which did not affect hemozoin formation [32]. Besides a subtle yet significant increment in hemoglobin levels observed under 2 and 2.5 x IC_{50}, no striking perturbations were noted for any of the heme species investigated (Figure 2C). Altogether, these results illustrate the ability of this experiment to identify compounds that curb Hz formation, demonstrating that LDT-623 interferes with the vital Hz formation pathway – presumably due to its quinoline core.

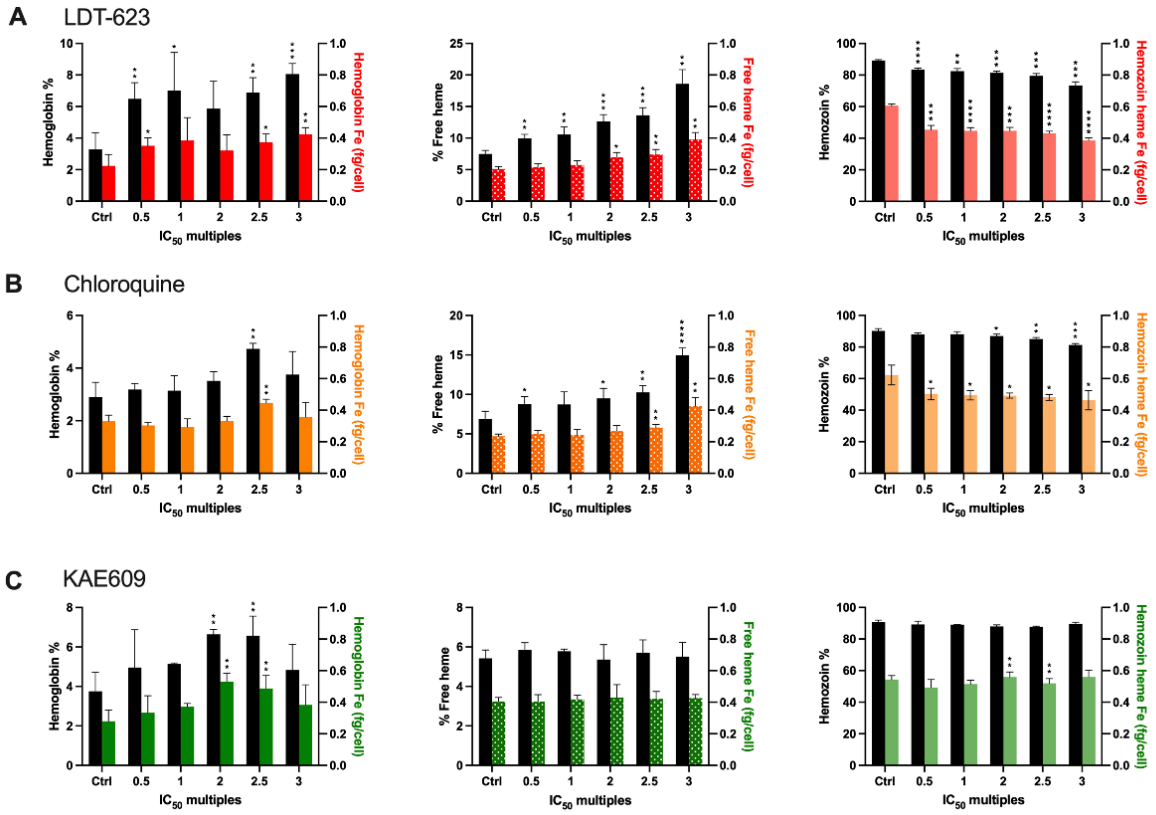


Figure 2. LDT-623 interferes with the hemozoin formation pathway within the digestive vacuole. (A) Parasites treated with LDT-623 display a heme fractionation profile more pronounced than that of CQ. (B) Heme fractionation profile of CQ-treated 3D7 parasites showing an increase in free heme and a decrease in Hz, as determined 32 h post-drug exposure. (C) KAE609 treatment did not interfere with heme or Hz accumulation. Percent levels of heme species are represented on the left y-axis while absolute heme amounts determined from a heme standard curve and measured in femtograms per cell are represented on the right y-axis. Statistical comparisons of the drug-treated lines with their untreated controls were performed using two-tailed Student's tests (with Welch's correction). *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$.

3.4. LDT-623 impacts PfCRT variant-specific drug efflux.

PfCRT is a transmembrane protein that, when mutated at specific residues, mediates the efflux of quinolines from the lumen of the digestive vacuole – an evolutionary strategy to drive drug away from its site of action [14]. Accordingly, PPQ and CQ resistance-conferring mutations allow positively charged drugs and other solutes to be effluxed into the cytosol [14,33]. In this way, CQ or PPQ-resistant parasites accumulate smaller amounts of drug within their digestive vacuoles compared to sensitive parasites.

By using PfCRT-containing proteoliposomes as a surrogate for drug transport, we employed an assay that mimics an “inside-out” parasite digestive vacuole. We leveraged contemporary PfCRT F145I and C350R isoforms, linked to diminished PPQ susceptibility in Asia and South America [13,34], to evaluate the impact of LDT-623 in PfCRT-mediated drug uptake in the 7G8 allelic background. The uptake of [^{3}H]CQ or [^{3}H]PPQ, allowed by an internally directed pH gradient and a membrane potential ΔΨ (Figure 3A), was calculated by normalizing their time-dependent accumulation in PfCRT-containing proteoliposomes normalized to that of control liposomes lacking PfCRT [14]. Drug-specific transport (here measured by tritiated drug uptake) can be differentially mediated by distinct PfCRT isoforms, in agreement with varying resistance phenotypes as seen with the PfCRT isoforms used: 7G8^{7G8} (CQ-resistant, PPQ-sensitive), 7G8^{F145I} (CQ-sensitive, PPQ-resistant) and 7G8^{C350R} (CQ-sensitive, PPQ-resistant).

In the CQ-resistant 7G8 PfCRT isoform, the drug-free control shows that [^{3}H]CQ uptake is maximized, as expected, in association with its resistance phenotype. The addition to 1 μM LDT-623, however, partially hampers the uptake of tritiated CQ (60.23%) (Figure 3B). As for the PPQ-resistant 7G8F145I and 7G8^{C350R} isoforms, the same condition yielded a lowered percentage of [^{3}H]PPQ uptake (30.86 and 47.20%, respectively) (Figure 3C-D). Once both [^{3}H]CQ and [^{3}H]PPQ uptake are reduced in the presence of LDT-623 in the PfCRT isoforms evaluated, the results provide compelling evidence that this 4-AQ binds to PfCRT, competing for its drug transport capacity. In this way, LDT-623 physically interacts with PfCRT, hinting that it is directly implicated in this compound’s activity. The robustness of variant-specific 4-AQ interactions with PfCRT is validated by the minimal impact of atovaquone and pyrimethamine – cytochrome bc1 and dihydrofolate reductase inhibitors, respectively [35,36], on the uptake of [^{3}H]CQ or [^{3}H]PPQ (Figures 3B-D).

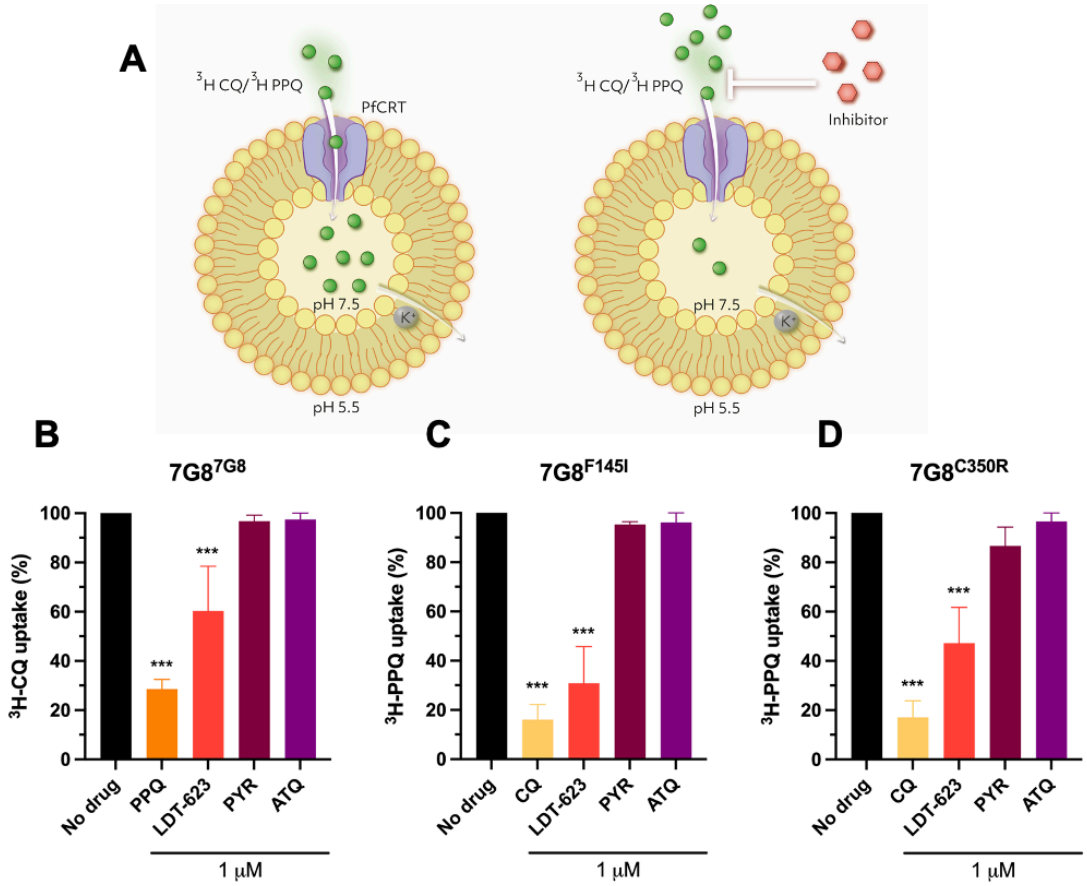


Figure 3. Uptake of tritiated CQ and PPQ by PfCRT-containing proteoliposomes is diminished in the presence of LDT-623. (A) Schematic representation of the drug uptake assay highlighting the "inside-out" digestive vacuole aspect of PfCRT-containing proteoliposomes. Uptake of 100 nM [^{3}H]CQ (B) or [^{3}H]PPQ (C-D) measured for 30 s in proteoliposomes containing the indicated PfCRT variants normalized to control liposomes. Data represents mean ± SEM of N = 3 independent experiments with n = 7 technical replicates each.

3.5. Profiling of LDT-623 in *pfcrt* and *pfmdr1*-edited *P. falciparum* lines illustrate variant-mediated cross-resistance profiles.

CQ and PPQ resistance are linked to specific sets of point mutations in the gene encoding PfCRT that mediate varying levels of parasite susceptibility to these drugs (Figure 4A). Hence, to correlate the biochemical findings of drug uptake assays to parasite susceptibility phenotypes, we used parasite lines previously generated [13,14,37–39] via zinc-finger nuclease editing by either wild-type pfcrt allele, recombinant isogenic allele, or finally the recombinant pfcrt with each of the point mutations of interest (Table 2). We hypothesize that distinct PfCRT isoforms could display different binding affinities, modulating parasite susceptibility to LDT-623.

PfMDR1, another DV-localized transporter, is a major determinant of pleiotropic antimalarial resistance in the field, and studies have shown that changes in both copy number variations and amino acids at position 86 in *pfmdr1* significantly impact parasite susceptibility to several antimalarial drugs [40,41]. Because there appears to be a significant interplay between specific *pfcrt* and *pfmdr1* alleles [42,43], we also explored the role of genetically manipulated PfMDR1 on the susceptibility of *P. falciparum* to LDT-623. We used the $NF10^{YF}$ clone (progeny of a genetic cross between 7G8, from Brazil, and GB4 parasites, from Ghana) that harbors a single copy of the GB4 *pfmdr1* allele encoding the N86Y/Y184F (YF) haplotype, and the $NF10^{NF}$ clone, genetically engineered towards the N86/Y184F (NF) haplotype [41]. Additionally, we have assessed the impact of *pfmdr1* amplification on the activity of LDT-623 using the parental line FCB and FCB^{KD1}, a clone in which the expression of one of FCB's two *pfmdr1* copies has been knocked down [40].

Regarding *pfmdr1* genetic changes, the N-terminal N86 mutation in $NF10^{NF}$ did not show any impact on the activity of LDT-623 compared to its parent $NF10^{YF}$ at the IC_{50} level (1.1-fold increase, p-value: 0.7, Mann-Whitney U-test). While analyzing *pfmdr1* copies, the knockdown clone FCB^{KD1} presents a not statistically significant (p-value: 0.1, Mann-Whitney U-test) approximate 1.2-fold increase in IC_{50} compared to FCB (Figure 4B), a behavior similar to that previously observed for CQ [40]. Finally, the knockdown FCB^{KD1} presents a more pronounced biphasic curve compared to its FCB parent but no statistical significance was achieved between their AUC values (p-value: 0.4; Mann-Whitney U test). Overall, even though there appears to be a tendency of slight resistance regarding a few of the lines assayed, no striking differences in parasite susceptibility via AUC analysis were observed. None of the *pfcrt* or *pfmdr1* relevant field mutations engineered into these parasite lines has yielded significant cross-resistance that could menace the efficacy of LDT-623.

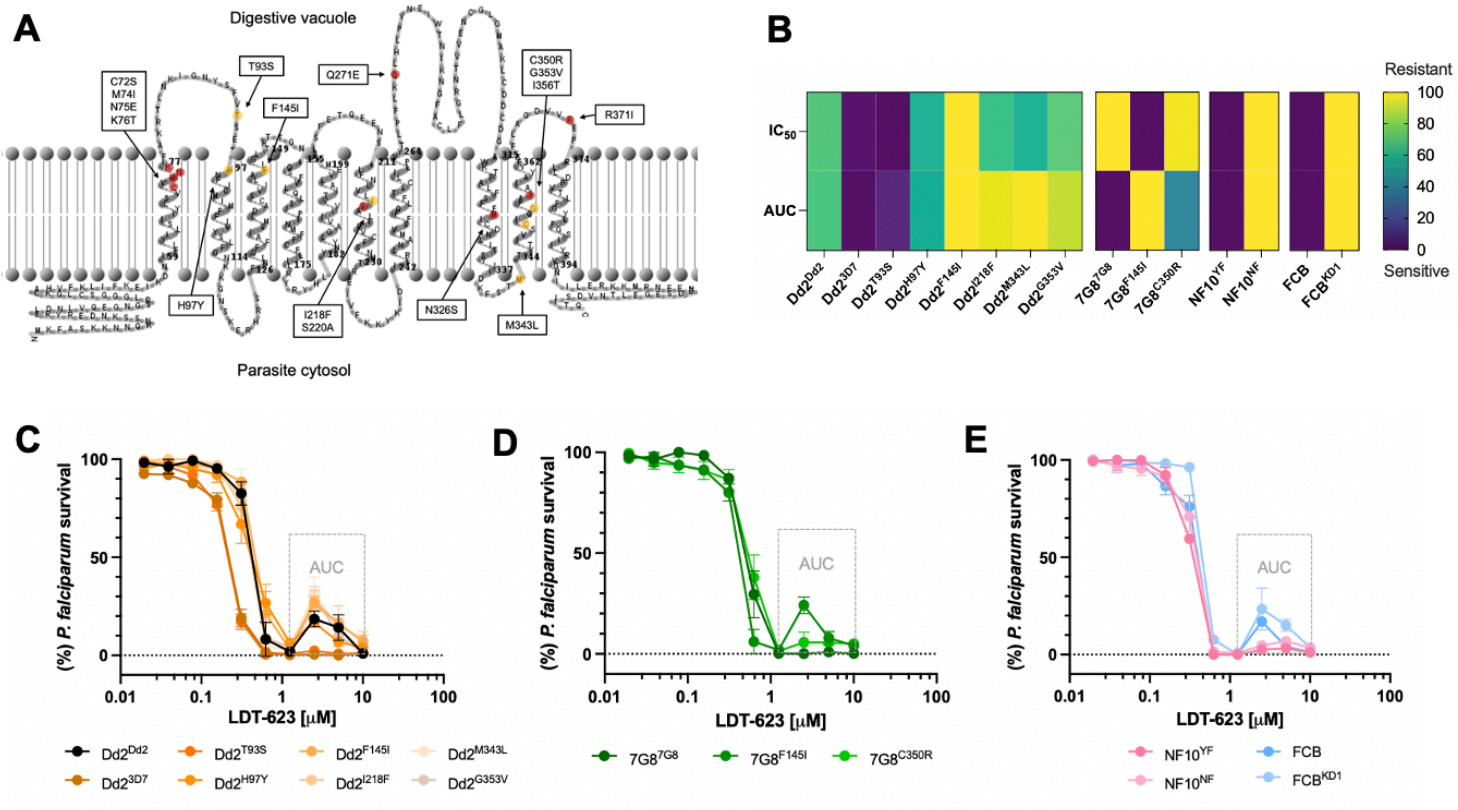


Figure 4. LDT-623 dose–response curves illustrate distinct variant PfCRT-mediated resistance profiles. (A) Mapping of CQ (red) and PPQ (yellow) resistance-conferring PfCRT amino acid substitutions on the 2D structure of $PfCRT_{3D7}$ using TMRPres2D [61]. (B) Cross-resistance heatmap of IC_{50} and AUC values for LDT-623 across *pfcrt* and *pfmdr1*-edited *P. falciparum* lines (N = 2-4). Data were normalized across parameters and scaled into a 0-100 interval for heatmap coloring. (C-D) Dose-response curves for *pfcrt*-edited clones. Data show mean ± SEM percent parasite survival (relative to drug-free controls) as a function of LDT-623 concentration (N = 2-4). (D) Dose-response curves for *pfmdr1*-edited clones. Data show mean ± SEM percent parasite survival (relative to drug-free controls) as a function of LDT-623 concentration (N = 3).

Table 2. Panel of *pfcrt*-edited *P. falciparum* lines used in this study.

Parasite line	Origin	Phenotype		PfCRT amino acid at listed positions															
		CQ	PPQ	72	74	75	76	93	97	145	218	220	271	326	343	350	353	356	371
Dd2^{Dd2}	SE Asia	R	S	C	I	E	T	T	H	F	I	S	E	S	M	C	G	T	I
Dd2^{T93S}	Cambodia	R	R	C	I	E	T	**S**	H	F	I	S	E	S	M	C	G	T	I
Dd2^{H97Y}	Cambodia	R	R	C	I	E	T	T	**Y**	F	I	S	E	S	M	C	G	T	I
Dd2^{F145I}	Cambodia	S [a]	R	C	I	E	T	T	H	**I**	I	S	E	S	M	C	G	T	I
Dd2^{I218F}	Cambodia	S	R	C	I	E	T	T	H	F	**F**	S	E	S	M	C	G	T	I
Dd2^{M343L}	Cambodia	R	R	C	I	E	T	T	H	F	I	S	E	S	**L**	**C**	G	T	I
Dd2^{G353V}	Cambodia	S	R	C	I	E	T	T	H	F	I	S	E	S	M	C	**V**	T	I
Dd2^{3D7}	Africa	S	S	C	M	N	K	T	H	F	I	A	Q	N	M	C	G	I	R
7G8^{7G8}	S. America, W. Pacific	R	S	S	M	N	T	T	H	F	I	S	Q	D	M	C	G	L	R
7G8^{F145I}	Experimental	S	R	S	M	N	T	T	H	**I**	I	S	Q	D	M	C	G	L	R
7G8^{C350R}	French Guiana	S	R	S	M	N	T	T	H	F	I	S	Q	D	M	**R**	G	L	R

[a] Sensitized to CQ compared to parental line but not fully sensitive. *pfcrt* editing by customized zinc finger nucleases was confirmed using Sanger sequencing. Differences from the 3D7 wild-type allele are shown in gray shading for both Dd2 and 7G8. Bold indicates mutations identified from piperaquine-resistant field isolates. S: sensitive, R: resistant. Table adapted from [13,14,38]. [12,13].

3.6. LDT-623-resistant parasites are unlikely to be selected *in vitro*.

In a bid to obtain additional insights into the potential molecular targets or pathways that drive the multistage antiplasmodial activity of LDT-623, we carried out two parallel resistance selection protocols to generate drug-resistant parasites (Figure 5A). We deployed a *P. falciparum* line (Dd2-Pol δ) with a mutated DNA polymerase δ, which abolishes its proofreading activity, making the parasite hypermutable 27. A total of 4 x 10^9 of Dd2-Pol δ parasites equally split into two drug regimens were exposed to 3 x IC_{50} of LDT-623, around 1 μM.

Two experimental conditions were found positive on day 21 in the protocol in which drug pressure had been removed. Drug response assays showed that the Dd2-Pol δ parent culture presented an IC_{50} of 360.2 nM, while the recrudescent bulks in Dd2-Pol δ Flasks 1 and 2 had similar values of 334.6 and 392.8 nM, respectively (Figure 5B). Given the biphasic shape of the parasite survival curves, an AUC analysis was performed. While the mean AUC for the Dd2-Pol δ parent culture was 35.4, parasites recovered in Flasks 1 and 2 had values of 53.8 and 22.3, respectively (p-values: 0.7 and 0.3, Mann-Whitney U test; Figure 5B), revealing no difference between the curves (Figure 5C). With no LDT-623-resistant parasites recovered under constant drug pressure, the minimum inoculum of resistance (MIR) calculated for LDT-623 is higher than 9, ensuring a robust barrier for resistance.

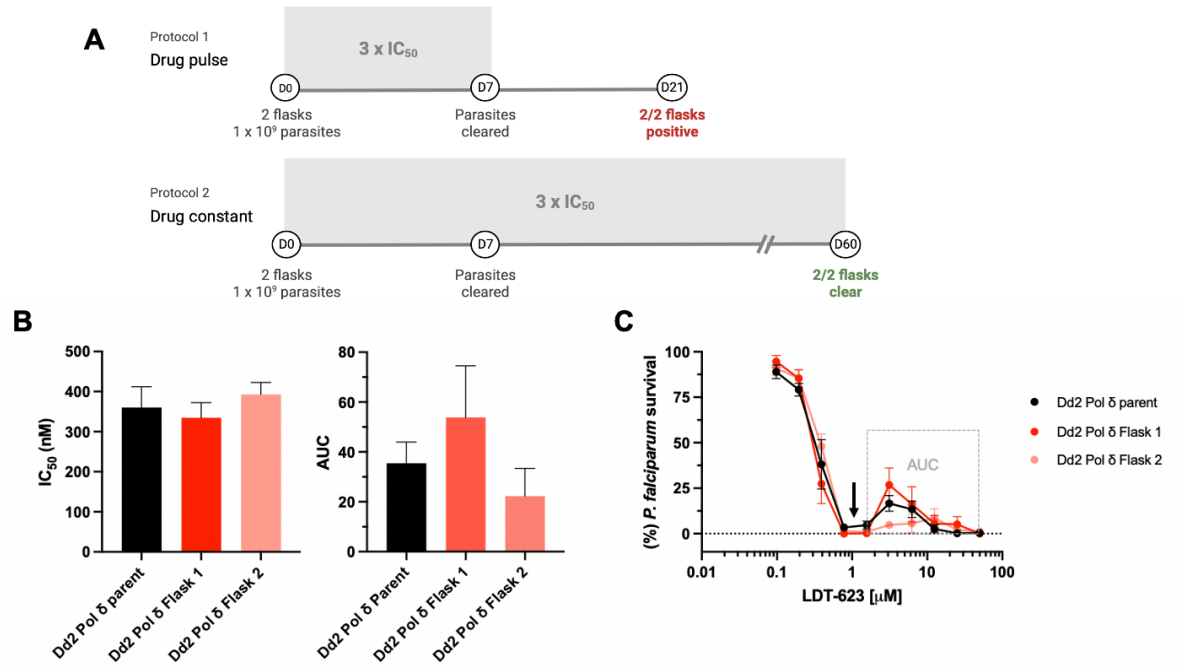


Figure 5. LDT-623 does not select for resistance *in vitro*. (A) Selection of resistance to LDT623 using the Dd2-Polδ line. (A) Parasites were cultured in the presence of 1 μM LDT-623 (~3 x IC_{50}). Parasite inoculum was set at 1 x 10^9 in duplicate flasks. Shading indicated the presence of drug pressure in the protocol. (B) LDT-623 IC_{50} and AUC values for parental and recrudescent Dd2 Pol δ lines under LDT-623 pressure. (C) Dose-response curves of LDT-623 for parental line (Dd2-Pol δ) versus drug-pressured lines (Dd2-Pol δ Flask 1 and Dd2-Pol δ Flask 2). Arrow represents 3 x IC_{50} concentration used for resistance selection. Data represents mean ± SEM (N = 5). Statistical significance was determined by Mann-Whitney U, *P<0.05.

3.7. Failure to recover parasites in resistome assay indicates no cross-resistance of LDT-623 with major targets and resistance mechanisms.

Cross-resistance profiling of compounds against parasite lines with known resistance mutations is another approach to gain insight into the potential resistance liabilities of a compound. Leveraging drug-resistant lines generated predominantly by the MalDA consortium using *in vitro* evolution or genetic engineering has aided the composition of a library of 50+ parasites that, altogether, cover a broad range of currently known resistance mechanisms as well as notable drug targets advancing the contemporary antimalarial drug discovery pipeline [45–47]. CRISPR-based barcode insertion allowed these representative parasite lines to be pooled and co-cultured, with their relative abundances quantified by barcode sequencing (Supplemental Table 3) [48]. Using a multiplexed competitive growth assay, we have interrogated this pool of

parasites under LDT-623 drug pressure, looking to single out potential cross-resistance targets.

Selective pressure of 3 x IC_{50} for PfDd2 (~790 nM) was applied to the pool of barcoded parasites and maintained constant throughout the assay. At the same time, cumulative growth profiles were recorded for LDT-623 and the untreated control (Supplemental Figure 4). After 14 days of incubation, no growth recovery was observed for the pool of barcoded parasites and thus no barcodes could be detected by PCR. Failure to grow under drug pressure is a strong indicator of no cross-resistance recorded for major targets and resistance mechanisms evaluated, such as ABC transporter I (ABCI3), P-type ATPase (PfATP4), cyclic amine resistance locus (PfCARL), translation elongation factor 2 (eEF2) [49], among others [50] (Supplemental Table 3).

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Even though 4-AQs have been relatively well-explored, the history of drug development endorses their adoption as partner drugs in antimalarial therapy, as exemplified by amodiaquine, ferroquine, and pyronaridine. Based on a previously characterized antimalarial molecule [17], a similarity screening coupled with *in vitro* assays identified LDT-623, a 4-AQ with nanomolar ABS activity. Previously described as an ABS inhibitor in HTS endeavors [51], we aimed to explore this molecule's full potential by demonstrating its hepatic schizonticidal and transmission-blocking activity in *P. falciparum* mature gametocytes and *P. berghei* ookinetes. Few antimalarial compounds bearing the 4-AQ pharmacophore have been described to go beyond ABS activity [52–54]. This unusual multistage activity that distinguishes LDT-623 from the typical 4-AQ phenotype encouraged us to investigate its MoA.

We first focused on understanding whether the phenotypic response upon LDT-623 was similar to that of CQ. Using a cellular heme fractionation assay, we demonstrated that LDT-623 interferes with the heme detoxification pathway within the DV in a dose-dependent manner and this can be linked to its MoA. Numerous point mutations in pfcrt have been proven to mediate CQ [12] and PPQ resistance [13,55] to varying extents. These mutation-driven phenotypes support parasite evasion from the inhibition of Hz formation within the DV: outward drug transport is significantly greater

in PfCRT-mutated forms, leading to a lesser extent of drug accumulation in its site of action and thus rendering the parasite resistant. To further dissect the contribution of these complimentary mechanisms to LDT-623's MoA, we resorted to isoforms of PfCRT-reconstituted proteoliposomes [14]. Measurement of the active uptake of radiolabeled CQ and PPQ showed that LDT-623 partially interferes with drug transport by directly binding to PfCRT. PPQ uptake by $7G8^{F145I}$, the most impacted variant, was reduced by roughly 70%, suggesting that LDT-623 can bind more steadily to this isoform.

Functionally, differential drug transport affinities between these PfCRT variants might mirror distinct drug sensitivity profiles. So, we put together a panel of *pfcrt*-edited *P. falciparum* lines comprising important CQ and PPQ resistance-conferring mutations [13,56,57]. Of note, the CQ-resistant Dd2 harbors the African/Asian CVIET haplotype. Most Dd2 lines assayed, except for $Dd2^{3D7}$ (wild-type PfCRT) and $Dd2^{T93S}$, show a biphasic response at high LDT-623 concentrations. This same phenotype is not observed in the $7G8^{7G8}$ line with the South American SVMNT PfCRT form. We hypothesize that CVIET PfCRT could be the major driver of these bimodal dose-response curves. Although LDT-623 activity hints towards diminished potency against F145I, data is not a proxy for potential clinical settings, as this mutation is highly unfit in the Dd2 background [13], and no reports have shown its emergence in 7G8 parasites.

Because there appears to be a significant interplay between particular *pfcrt* and *pfmdr1* alleles [42,43], we explored the impact of *pfmdr1* - a marker of resistance to lumefantrine and mefloquine (partner drugs in ACTs), on LDT-623's activity. The FCB line, besides its CVIET PfCRT haplotype, also harbors the *pfmdr1* N86Y mutation (cognate to $NF10^{YF}$, yet in a distinct genetic background). Interestingly, although NF10 are also CVIET-bearing parasites, they seem to preserve the sigmoidal curve shape - as opposed to the biphasic response from FCB parasites. Revisiting the trend observed for Dd2 regarding the bimodal curve believed to be driven by CVIET, in this case, we believe that the incomplete killing for both FCB and FCB^{KD1} might be due to either a strain-specific behavior or even to possible specific interactions between these *pfcrt* and *pfmdr1* alleles. Previous studies have shown that mutations on residue 86 of PfMDR1 are more frequent in Asian and African parasites, areas known for the early emergence of CQ resistance. Accordingly, the *pfmdr1* N86 mutation shows significant shifts in IC_{50} for 4-AQs like CQ, md-CQ, and md-ADQ in NF10, CVIET-carrying

parasites [41]. A novel 4-AQ antimalarial, such as LDT-623, showing no cross-resistance to these relevant genetic changes, may constitute a valuable tool for malaria control efforts.

With a few notable exceptions such as pyronaridine and lumefantrine, the selection of drug-resistant *P. falciparum* strains has occurred for nearly all antimalarial drugs marketed up to date. Given that we found no pre-existing cross-resistance with *pfcrt* and *pfmdr1*-mutated parasites, we assessed the likelihood of resistance to LDT-623 to emerge. We resorted to hypermutable Dd2-Pol δ parasites that can display an increased mutation rate of up to 28-fold under drug pressure [27]. Even though this parasite line does not represent direct proxy for field outcomes, it is a reliable tool to gain further insights into a drug's MoA. This strategy has been successful in generating mutants for antimalarial compounds dubbed "irresistible" [58], those that have previously failed to drive mutations in 3D7 and Dd2 parasites. The failure of LDT-623 to select for resistant parasites *in vitro* suggests that this event is unlikely to occur in the field. There are numerous potential reasons for a compound not to select for resistance. The bimodal phenotype for LDT-623 recrudescent parasites may reveal a subset of unmutated parasites, which survive at high drug concentrations. It has also been suggested that biphasic responses could be linked to multiple modes of action [59], which corroborates the multistage antiplasmodial activity observed for LDT-623.

Finally, we tried to assign MoAs to LDT-623 using a fitness competition assay employed to identify cross-resistant barcoded parasite lines able to outgrow drug pressure [48]. Strikingly, none of the parasite strains assayed were retrieved while the pool growth was being recorded. One of the most relevant translations of this assay is the lack of cross-resistance with *P. falciparum* lines expressing C580Y and R539T mutations in PfK13, important markers associated with resistance to artemisinin derivatives [2,3,6], a phenotypic response that has already been observed in African regions [8,9,60.] Altogether, by leveraging LDT-623's ability to dodge drug efflux mechanisms in mutant PfCRT and PfMDR1, two major resistance determinants in ACT partner drugs, our data encourages revisiting quinolines as components of malaria treatment strategies such as triple ACTs, just like suggested and demonstrated for other antimalarial combinations [13,38]. Collectively, our findings provide molecular clues on the distinct MoA for the multistage activity of LDT-623. With this unorthodox 4-AQ,

what once was thought to have been well-scrutinized, now seems to have a full novel potential to be unlocked.

5. SIGNIFICANCE

One of the pillars of malaria control efforts, effective treatment has been threatened by the presence and expansion of artemisinin-resistant *P. falciparum* parasites across Southeast Asia now spreading to Africa. Herein we characterize the antimalarial activity and resistance mechanisms of LDT-623, a 4-AQ compound. Given that few antimalarial compounds bearing the 4-AQ pharmacophore have been described to go beyond ABS activity, we investigated this compound throughout the parasite life cycle and found it to be active in multiple stages. We confirmed that LDT-623 follows quinolinic patterns of inhibition of hemozoin formation and binding to PfCRT, as seen using heme fractionation profiling and drug uptake in PfCRT-containing proteoliposomes, respectively. Correlating biochemical findings with the parasite susceptibility phenotype, we hypothesized that PfCRT isoforms could modulate parasite response to LDT-623. Growth inhibition assays in a panel of *pfcrt* and *pfmdr1*-edited parasites proved most of these not to show substantial rightward shifts in their survival curves. Albeit the PPQ-resistance-conferring PfCRT F145I mutation alters LDT-623 susceptibility via incomplete killing, it should not be a concern, as this mutation is highly unfit in clinical settings. Moreover, parasites recovered in a resistance selection protocol *in vitro* showed a bimodal response curve, revealing a subpopulation surviving high LDT-623 concentrations - likely why those parasites did not mutate. Failure to select for LDT-623 resistance while trying to pinpoint potential molecular targets or pathways that drive its multistage activity reveals that resistance selection in the real world is unlikely to happen. Finally, a competitive growth assay comprising 51+ barcoded parasite lines with mutated resistance mediators or major drug targets indicated that cross-resistance is not an issue regarding LDT-623'activity. Our findings identify an unusual 4-AQ with multistage antiplasmodial activity that is able to evade known resistance mechanisms, advocating for further exploitation of this chemical class as a versatile avenue for malaria therapeutic interventions.

6. FUNDING

The authors would like to thank Brazilian funding agencies National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), The Goiás Research Foundation (FAPEG), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the São Paulo Research Foundation (FAPESP), the Swedish Research Council (SRC), and the Swedish Foundation for International Cooperation in Research and Higher Education (STINT) for financial support and fellowships. LTF received FAPESP fellowships (Grants #2019/02171-3 and #2021/13809-9) and FTMC was supported by FAPESP Grant #2017/18611-7. LCSA received a CNPq fellowship (Grant #162117/2018-3). CHA was supported by CNPq Grants (#441038/2020-4 and # 440373/2022-0) and FAPEG Grant (#202010267000272). DYB was supported by FAPESP Grant #2021/06769-0 and Instituto Serrapilheira Grant G-1709-16618. JC received FAPESP fellowship Grant #2018/24878-9. MP is funded by “la Caixa” grant HR21-848. PS was supported by SRC grant 2021-03667 and STINT grant BR2018-8017. FTMC and CHA are CNPq research fellows. The work was also supported by NIH grant R01AI147628 (MQ, DAF).

7. COMPETING INTERESTS

The authors have declared no competing interests.

8. AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: L.T.F., G.C.C., D.A.F., F.T.M.C. Methodology: D.Y.B., M.P., M.Q., M.C.S.L., D.A.F. Validation: L.T.F., G.C.C., L.C.S.A., J.O., J.C., D.F., E.G., R.C. Formal analysis: L.T.F., G.C.C., L.C.S.A., J.O., J.C., D.F., E.G., R.C. Investigation: L.T.F., G.C.C., L.C.S.A., J.O., J.C., D.F., E.G., R.C. Original draft: L.T.F. Review and editing: all authors. Visualization: L.T.F., G.C.C., D.A.F., F.T.M.C. Supervision: L.T.F., G.C.C., D.Y.B., M.P., M.Q., M.C.S.L., D.A.F., F.T.M.C. Project administration: D.A.F., F.T.M.C. Funding acquisition: C.H.A., P.S., P.V.C., D.A.F., F.T.M.C.

9. REFERENCES

1. Geneva: World Health Organization (2022). World Malaria Report 2022.

2. Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., et al. (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 57, 742–768.

3. Paloque, L., Coppée, R., Stokes, B.H., Gnädig, N.F., Niar, K., Augereau, J.M., Fidock, D.A., Clain, J., and Benoit-Vical, F. (2022). Mutation in the *Plasmodium falciparum* BTB/POZ domain of K13 protein confers artemisinin resistance. Antimicrob Agents Chemother 66.

4. Straimer, J., Gnädig, N.F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A.P., Dacheux, M., Khim, N., Zhang, L., Lam, S., et al. (2015). K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. Science 347, 428–431.

5. Stokes, B.H., Dhingra, S.K., Rubiano, K., Mok, S., Straimer, J., Gnädig, N.F., Deni, I., Schindler, K.A., Bath, J.R., Ward, K.E., et al. (2021). *Plasmodium falciparum* k13 mutations in Africa and Asia impact artemisinin resistance and parasite fitness. eLife 10.

6. Fola, A.A., Feleke, S.M., Mohammed, H., Brhane, B.G., Hennelly, C.M., Assefa, A., Crudal, R.M., Reichert, E., Juliano, J.J., Cunningham, J., et al. (2023). *Plasmodium falciparum* resistant to artemisinin and diagnostics have emerged in Ethiopia. Nature Microbiology 2023 8:10 8, 1911–1919.

7. Conrad, M.D., Asua, V., Garg, S., Giesbrecht, D., Niaré, K., Smith, S., Namuganga, J.F., Katairo, T., Legac, J., Crudale, R.M., et al. (2023). Evolution of partial resistance to artemisinins in malaria parasites in Uganda. New England Journal of Medicine 389, 722–732.

8. Balikagala, B., Fukuda, N., Ikeda, M., Katuro, O.T., Tachibana, S.-I., Yamauchi, M., Opio, W., Emoto, S., Anywar, D.A., Kimura, E., et al. (2021). Evidence of artemisinin-resistant malaria in Africa. New England Journal of Medicine 385, 1163–1171.

9. Sanchez, C.P., Manson, E.D.T., Moliner Cubel, S., Mandel, L., Weidt, S.K., Barrett, M.P., and Lanzer, M. (2022). The knock-down of the chloroquine resistance transporter PfCRT is linked to oligopeptide handling in *Plasmodium falciparum*. Microbiol Spectr 10.

10. Fidock, D., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M.B., Sidhu, A.B.S., Naudé, B., Deitsch, K.W., et al. (2000). Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. Mol Cell 6, 861–871.

11. Ross, L.S., Dhingra, S.K., Mok, S., Yeo, T., Wicht, K.J., Kümpornsin, K., Takala-Harrison, S., Witkowski, B., Fairhurst, R.M., Ariey, F., et al. (2018). Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line antimalarial piperaquine. Nature Communications 2018 9:1 9, 1–13.

12. Kim, J., Tan, Y.Z., Wicht, K.J., Erramilli, S.K., Dhingra, S.K., Okombo, J., Vendome, J., Hagenah, L.M., Giacometti, S.I., Warren, A.L., et al. (2019). Structure

and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT. Nature 576, 315–320.

13. Hrycyna, C.A., Summers, R.L., Lehane, A.M., Pires, M.M., Namanja, H., Bohn, K., Kuriakose, J., Ferdig, M., Henrich, P.P., Fidock, D.A., et al. (2014). Quinine dimers are potent inhibitors of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and are active against quinoline-resistant *P. falciparum*. ACS Chem Biol 9, 722–730.

14. Ferreira, L.T., Borba, J.V.B., Moreira-Filho, J.T., Rimoldi, A., Andrade, C.H., and Costa, F.T.M. (2021). QSAR-based virtual screening of natural products database for identification of potent antimalarial hits. Biomolecules 11, 1–12.

15. Lambros C, V.JP. (1979). Synchronization of Plasmodium faLambros C, V. J. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of Parasitology, 65(3), 418–420. Journal of Parasitology 65, 418–420.

16. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65, 55–63.

17. Vaughan, A.M., Mikolajczak, S.A., Camargo, N., Lakshmanan, V., Kennedy, M., Lindner, S.E., Miller, J.L., Hume, J.C.C., and Kappe, S.H.I. (2012). A transgenic *Plasmodium falciparum* NF54 strain that expresses GFP-luciferase throughout the parasite life cycle. Mol Biochem Parasitol 186, 143–147.

18. Fivelman, Q.L., McRobert, L., Sharp, S., Taylor, C.J., Saeed, M., Swales, C.A., Sutherland, C.J., and Baker, D.A. (2007). Improved synchronous production of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. Mol Biochem Parasitol 154, 119–123.

19. Swann, J., Corey, V., Scherer, C.A., Kato, N., Comer, E., Maetani, M., Antonova-Koch, Y., Reimer, C., Gagaring, K., Ibanez, M., et al. (2016). High-throughput luciferase-based assay for the discovery of therapeutics that prevent malaria. ACS Infect Dis 2, 281–293.

20. Calit, J., Drobescu, I., Gaitán, X.A., Borges, M.H., Ramos, M.S., Eastman, R.T., and Bargieri, D.Y. (2018). Screening the Pathogen Box against *Plasmodium* sexual stages using a new nanoluciferase based transgenic line of *P. berghei* identifies transmission-blocking compounds. Antimicrob Agents Chemother.

21. Ploemen, I.H.J., Prudêncio, M., Douradinha, B.G., Ramesar, J., Fonager, J., Van Gemert, G.J., Luty, A.J.F., Hermsen, C.C., Sauerwein, R.W., Baptista, F.G., et al. (2009). Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. PLoS One 4, 1–12.

22. Combrinck, J.M., Fong, K.Y., Gibhard, L., Smith, P.J., Wright, D.W., and Egan, T.J. (2015). Optimization of a multi-well colorimetric assay to determine haem species in *Plasmodium falciparum* in the presence of anti-malarials. Malar J 14.

23. Ng, C.L., and Fidock, D.A. (2019). *Plasmodium falciparum in vitro* drug resistance selections and gene editing. Methods in Molecular Biology 2013, 123–140.

24. Kümpornsin, K., Kochakarn, T., Yeo, T., Okombo, J., Luth, M.R., Hoshizaki, J., Rawat, M., Pearson, R.D., Schindler, K.A., Mok, S., et al. (2023). Generation of a mutator parasite to drive resistome discovery in *Plasmodium falciparum*. Nature Communications 2023 14:1 14, 1–14.

25. Plouffe, D.M., Wree, M., Du, A.Y., Meister, S., Li, F., Patra, K., Lubar, A., Okitsu, S.L., Flannery, E.L., Kato, N., et al. (2016). High-throughput assay and discovery of small molecules that interrupt malaria transmission. Cell Host Microbe 19, 114–126.

26. Fong, K.Y., and Wright, D.W. (2013). Hemozoin and antimalarial drug discovery. Future Med Chem 5, 1437–1450.

27. Sullivan, D.J. (2017). Quinolines block every step of malaria heme crystal growth. Proc Natl Acad Sci U S A 114, 7483–7485.

28. Spillman, N.J., Allen, R.J.W., McNamara, C.W., Yeung, B.K.S., Winzeler, E.A., Diagana, T.T., and Kirk, K. (2013). Na+ regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* involves the cation ATPase PfATP4 and is a target of the spiroindolone antimalarials. Cell Host Microbe 13, 227–237.

29. Riegel, B., and Roepe, P.D. (2020). Altered drug transport by *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter isoforms harboring mutations associated with piperaquine resistance. Biochemistry 59, 2484–2493.

30. Pelleau, S., Moss, E.L., Dhingra, S.K., Volney, B., Casteras, J., Gabryszewski, S.J., Volkman, S.K., Wirth, D.F., Legrand, E., Fidock, D.A., et al. (2015). Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfcrt*. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 11672–11677

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

32. Walter, R.D. (1986). Altered dihydrofolate reductase in pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 19, 61–66.

33. Dhingra, S.K., Gabryszewski, S.J., Small-Saunders, J.L., Yeo, T., Henrich, P.P., Mok, S., and Fidock, D.A. (2019). Global spread of mutant PfCRT and its pleiotropic impact on *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and fitness. mBio 10.

34. Small-Saunders, J.L., Hagenah, L.M., Wicht, K.J., Dhingra, S.K., Deni, I., Kim, J., Vendome, J., Gil-Iturbe, E., Roepe, P.D., Mehta, M., et al. (2022). Evidence for the early emergence of piperaquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria and modeling strategies to mitigate resistance. PLoS Pathog 18, 1–27.

35. Dhingra, S.K., Small-Saunders, J.L., Ménard, D., and Fidock, D.A. (2019). *Plasmodium falciparum* resistance to piperaquine driven by PfCRT. Lancet Infect Dis 19, 1168–1169.

36. Sidhu, A.B.S., Uhlemann, A.C., Valderramos, S.G., Valderramos, J.C., Krishna, S., and Fidock, D.A. (2006). Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. Journal of Infectious Diseases 194, 528–535.

37. Veiga, M.I., Dhingra, S.K., Henrich, P.P., Straimer, J., Gnädig, N., Uhlemann, A.C., Martin, R.E., Lehane, A.M., and Fidock, D.A. (2016). Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. Nat Commun 7.

38. Happi, C.T., Gbotosho, G.O., Folarin, O.A., Sowunmi, A., Bolaji, O.M., Fateye, B.A., Kyle, D.E., Milhous, W., Wirth, D.F., and Oduola, A.M.J. (2006). Linkage disequilibrium between two distinct loci in chromosomes 5 and 7 of *Plasmodium falciparum* and *in vivo* chloroquine resistance in Southwest Nigeria. Parasitol Res 100, 141–148.

39. Sá, J.M., Twu, O., Hayton, K., Reyes, S., Fay, M.P., Ringwald, P., and Wellems, T.E. (2009). Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 18883–18889

40. Bopp, S., Magistrado, P., Wong, W., Schaffner, S.F., Mukherjee, A., Lim, P., Dhorda, M., Amaratunga, C., Woodrow, C.J., Ashley, E.A., et al. (2018). Plasmepsin II–III copy number accounts for bimodal piperaquine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*. Nature Communications 2018 9:1 9, 1–10.

41. Forte, B., Ottilie, S., Plater, A., Campo, B., Dechering, K.J., Gamo, F.J., Goldberg, D.E., Istvan, E.S., Lee, M., Lukens, A.K., et al. (2021). Prioritization of Molecular Targets for Antimalarial Drug Discovery. ACS Infect Dis 7, 2764–2776.

42. Gamo, F.J., Sanz, L.M., Vidal, J., De Cozar, C., Alvarez, E., Lavandera, J.L., Vanderwall, D.E., Green, D.V.S., Kumar, V., Hasan, S., et al. (2010). Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. Nature 465, 305–310.

43. de Souza Pereira, C., Costa Quadros, H., Magalhaes Moreira, D.R., Castro, W., Santos De Deus Da Silva, R.I., Botelho Pereira Soares, M., Fontinha, D., Prudêncio, M., Schmitz, V., Dos Santos, H.F., et al. (2021). A novel hybrid of chloroquine and primaquine linked by Gold(I): Multitarget and multiphase antiplasmodial agent. ChemMedChem 16, 662–678.

44. Lödige, M., Lewis, M.D., Paulsen, E.S., Esch, H.L., Pradel, G., Lehmann, L., Brun, R., Bringmann, G., and Mueller, A.K. (2013). A primaquine-chloroquine hybrid with dual activity against Plasmodium liver and blood stages. International Journal of Medical Microbiology 303, 539–547.

45. Bonilla-Ramirez, L., Rios, A., Quiliano, M., Ramirez-Calderon, G., Beltrán-Hortelano, I., Franetich, J.F., Corcuera, L., Bordessoulles, M., Vettorazzi, A., López de Cerain, A., et al. (2018). Novel antimalarial chloroquine- and primaquine-quinoxaline 1,4-di-N-oxide hybrids: Design, synthesis, *Plasmodium* life cycle stage profile, and preliminary toxicity studies. Eur J Med Chem 158, 68–81.

46. Mathieu, L.C., Cox, H., Early, A.M., Mok, S., Lazrek, Y., Paquet, J.C., Ade, M.P., Lucchi, N.W., Grant, Q., Udhayakumar, V., et al. (2020). Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* K13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. Elife 9, 1–21.

47. Parobek, C.M., Parr, J.B., Brazeau, N.F., Lon, C., Chaorattanakawee, S., Gosi, P., Barnett, E.J., Norris, L.D., Meshnick, S.R., Spring, M.D., et al. (2017). Partner-drug resistance and population substructuring of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. Genome Biol Evol 9, 1673–1686.

48. Leang, R., Taylor, W.R.J., Bouth, D.M., Song, L., Tarning, J., Char, M.C., Kim, S., Witkowski, B., Duru, V., Domergue, A., et al. (2015). Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-piperaquine open-label multicenter clinical assessment. Antimicrob Agents Chemother 59, 4719–4726.

49. Yang, T., Ottilie, S., Istvan, E.S., Godinez-Macias, K.P., Lukens, A.K., Baragaña, B., Campo, B., Walpole, C., Niles, J.C., Chibale, K., et al. (2021). MalDA, accelerating malaria drug discovery. Trends Parasitol 37, 493–507.

50. Le Manach, C., Paquet, T., Wicht, K., Nchinda, A.T., Brunschwig, C., Njoroge, M., Gibhard, L., Taylor, D., Lawrence, N., Wittlin, S., et al. (2018). Antimalarial lead-optimization studies on a 2,6-Imidazopyridine series within a constrained chemical space to circumvent atypical dose-response curves against multidrug resistant parasite strains. J Med Chem 61, 9371–9385.

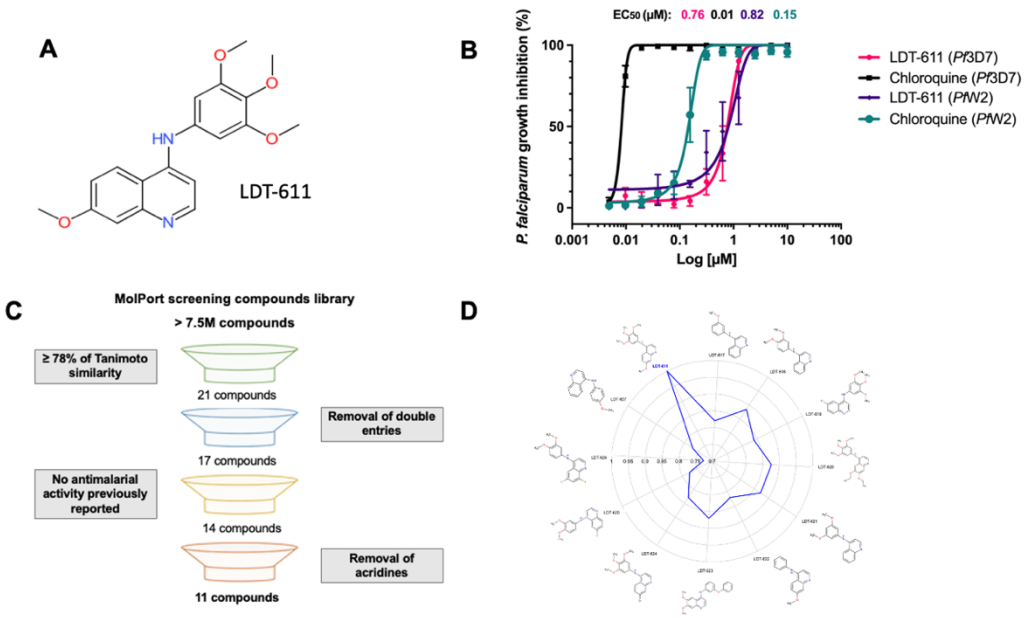
51. Carrasquilla, M., Drammeh, N.F., Rawat, M., Sanderson, T., Zenonos, Z., Rayner, J.C., and Lee, M.C.S. (2022). Barcoding genetically distinct *Plasmodium falciparum* strains for comparative assessment of fitness and antimalarial drug resistance. mBio 13.

52. Miotto, O., Sekihara, M., Tachibana, S.I., Yamauchi, M., Pearson, R.D., Amato, R., Gonçalves, S., Mehra, S., Noviyanti, R., Marfurt, J., et al. (2020). Emergence of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* with kelch13 C580Y mutations on the island of New Guinea. PLoS Pathog 16, e1009133.

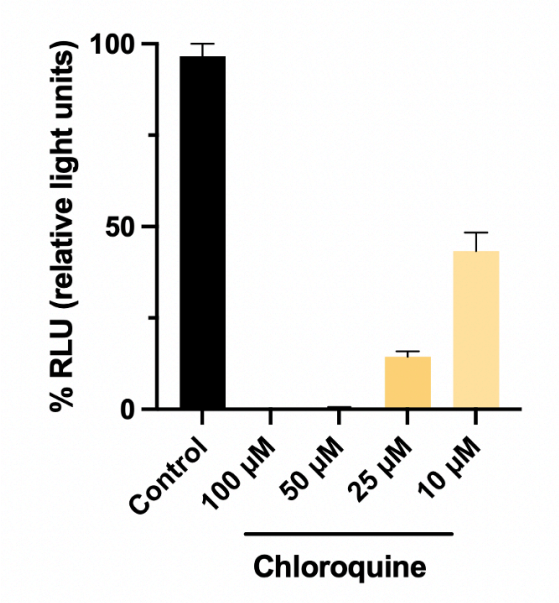
53. Uwimana, A., Legrand, E., Stokes, B.H., Ndikumana, J.L.M., Warsame, M., Umulisa, N., Ngamije, D., Munyaneza, T., Mazarati, J.B., Munguti, K., et al. (2020). Emergence and clonal expansion of *in vitro* artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* kelch13 R561H mutant parasites in Rwanda. Nature Medicine 2020 26:10 26, 1602–1608.

54. Spyropoulos, I.C., Liakopoulos, T.D., Bagos, P.G., and Hamodrakas, S.J. (2004). TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. Bioinformatics 20, 3258–3260.

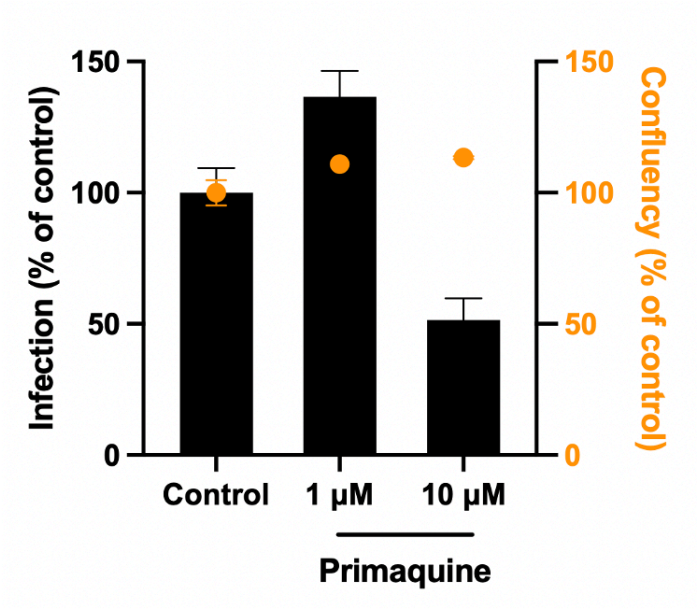
10. SUPPLEMENTAL MATERIAL



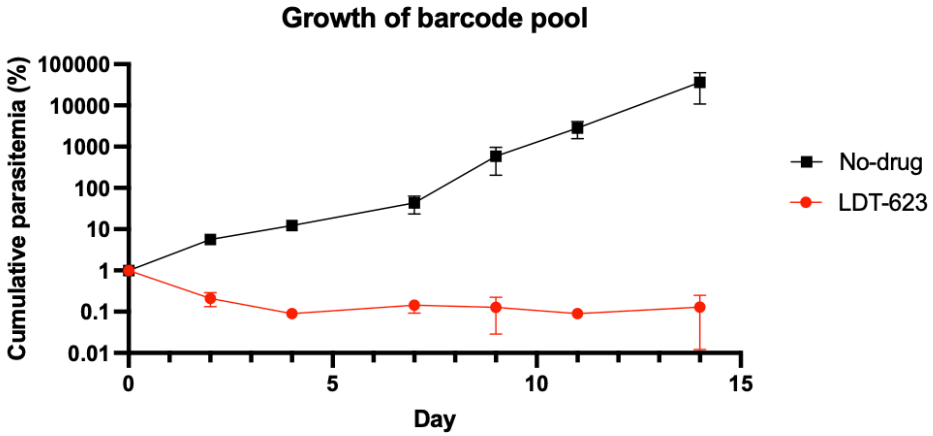
Supplemental Figure 1. (A) Structure of compound LDT-611. (B) Antimalarial activity profiling of compound LDT-611. (A) *In vitro* growth inhibition of chloroquine-sensitive and resistant *P. falciparum* strains for LDT-611 and chloroquine, an antimalarial standard (data is represented as mean ± SD, N = 3). (C) Virtual screening workflow for the identification of LDT-611 structural analog molecules. (D) Radial plot showing structural similarity between LDT-611 and its structural analogs selected with Tanimoto coefficient > 0.78).



Supplemental Figure 2. Activity of chloroquine on *P. berghei* (ookluc) gamete fertilization and consequent ookinete formation on conversion assay. Luciferase activity (light emission in relative light units) is expressed as means ± SEM and is directly proportional to gamete fertilization and ookinete conversion. (N = 2-3).



Supplemental Figure 3. *In vitro* liver stage activity of primaquine at 1 and 10 μM, against exoerythrocytic forms of *P. berghei*, along with cytotoxicity to Huh-7 cells (cell confluency). Data is expressed as means ± SEM (N = 2).



Supplemental Figure 4. Resistome assay establishes no cross-resistance between LDT-623 and major drug targets and mechanisms of antimalarial resistance. Cumulative growth profiles for LDT-623 (4-AQ) and an untreated control. Drug pressure of 3 x IC_{50} was maintained constant for 14 days and the pool exhibited no growth recovery. Cultures were run in triplicates.

Supplemental Table 1. Antimalarial IC_{50} and IC_{90} values of LDT-623 tested in *pfcrt*-edited parasite lines.

	Dd2^{Dd2}	**Dd2^{3D7}**	**Dd2^{T93S}**	**Dd2^{H97Y}**	**Dd2^{F145I}**	**Dd2^{I218F}**	**Dd2^{M343L}**	**Dd2^{G353V}**	**7G8^{7G8}**	**7G8^{F145I}**	**7G8^{C350R}**
LDT-623 IC_{50}	451.6 ± 31.0	232.5 ± 10.5	226.7 ± 9.0	416.2 ± 59.6	541.0 ± 83.7	435.4 ± 20.1	415.7 ± 50.0	455.8 ± 9.6	579.1 ± 67.5	439.0 ± 22.7	576.5 ± 49.4
N	3	3	3	3	4	3	3	2	3	3	3
P vs Dd2^{Dd2}	-	0.1	0.1	>0.9	0.4	>0.9	>0.9	0.8	-	-	-
P vs 7G8^{7G8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	>0.9
LDT-623 IC_{90}	6335 ± 1658	454.6 ± 51.1	428.8 ± 41.7	5273 ± 99.2	3787 ± 1728	3981 ± 1676	6856 ± 332.9	6506 ± 1538	979.6 ± 132.9	6568 ± 3250	4047 ± 3075
N	3	3	3	3	4	3	3	2	3	3	3
P vs Dd2^{Dd2}	-	0.1	0.1	0.7	0.6	0.4	0.7	>0.9	-	-	-
P vs 7G8^{7G8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.7
PPQ IC_{50}	27.6 ± 3.1 [a]	-	31.9 ± 5.6 [b]	-	65.3 ± 3.1 [a]	42.0 ± 20.8 [b]	37.6 ± 4.8 [a]	31.8 ± 7.4 [a]	21.4 ± 1.0 [c]	28.7 ± 1.0 [c]	36.5 ± 2.0 [c]
N	9	-	3	-	4	3	6	5	4	4	4
P vs Dd2^{Dd2}	-	-	0.4	-	0.003	>0.9	0.1	0.7	-	-	-
P vs 7G8^{7G8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	0.03
PPQ IC_{90}	50.2 ± 4.2 [a]	-	6881 ± 3421 [b]	-	5769 ± 666 [a]	8603 ± 1657 [b]	93.1 ± 9.7 [a]	3741 ± 1981 [a]	-	-	-
N	9	-	3	-	4	3	6	4	-	-	-
P vs Dd2^{Dd2}	-	-	0.1	-	0.003	0.1	0.0004	0.003	-	-	-
P vs 7G8^{7G8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CQ IC_{50}	89.7 ± 7.4 [b]	-	61.9 ± 7.6 [b]	-	19.3 ± 1.3 [a]	36.7 ± 4.3 [b]	41.8 ± 1.9 [a]	54.6 ± 4.9 [a]	83.0 ± 7.5 [c]	7.3 ± 0.4 [c]	6.9 ± 0.3 [c]
N	6	-	6	-	6	6	5	4	4	4	4
P vs Dd2^{Dd2}	-	-	0.03	-	0.0002	0.0022	0.0005	0.002	-	-	-
P vs 7G8^{7G8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	0.03
CQ IC_{90}	213.9 ± 7.4 [b]	-	141.0 ± 6.3 [b]	-	-	85.3 ± 4.9 [b]	-	-	-	-	-
N	6	-	6	-	-	6	-	-	-	-	-
P vs Dd2^{Dd2}	-	-	0.0022	-	-	0.0022	-	-	-	-	-
P vs 7G8^{7G8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[a] [12], [b] [41], [c] [13]. IC_{50} and IC_{90} values (nM) are presented as the means ± SEM, as determined in 2 to 4 independent assays performed in duplicate. PPQ, piperaquine; CQ, chloroquine; *N*, number of assays; Statistical significance was determined via two-tailed Mann Whitney *U* tests. *P* values are reported for comparisons with the parasite isogenic line, either Dd2^{Dd2} or 7G8^{7G8}.

Supplemental Table 2. Antimalarial IC_{50} and IC_{90} values of LDT-623 tested in *pfmdr1*-modified parasite lines.

	NF10^{YF}	**NF10^{NF}**	**FCB**	**FCB^{KD1}**
LDT623 IC_{50}	360.2 ± 1.9	400.3 ± 28.2	413.8 ± 12.9	488.2 ± 12.0
N	3	3	3	3
P vs NF10^{YF}	-	0.7	-	-
P vs FCB	-	-	-	0.1
LDT623 IC_{90}	562.9 ± 2.8	580.1 ± 13.0	4427 ± 163.9	7654 ± 1118
N	3	3	3	3
P vs NF10^{YF}	-	0.7	-	-
P vs FCB	-	-	-	0.1
PPQ IC_{50}	41.8 ± 3.4 [d]	35.4 ± 2.1 [d]	-	-
N	6	6	-	-
P vs NF10^{YF}	-	0.31	-	-
P vs FCB	-	-	-	-
PQ IC_{90}	-	-	-	-
N	-	-	-	-
P vs NF10^{YF}	-	-	-	-
P vs FCB	-	-	-	-
CQ IC_{50}	347.1 ± 24.4 [d]	216.2 ± 15.3 [d]	216.8 ± 34.6 [e]	242.2 ± 43.9 [e]
N	6	6	4	4
P vs NF10^{YF}	-	0.04	-	-
P vs FCB	-	-	-	>0.05
CQ IC_{90}	-	-	-	-
N	-	-	-	-
P vs NF10^{YF}	-	-	-	-
P vs FCB	-	-	-	-

[d] [43], [e] [69]. IC_{50} and IC_{90} values (nM) are presented as the means ± SEM, as determined in 2 to 4 independent assays performed in duplicate. PPQ, piperaquine; CQ, chloroquine; *N*, [43]number of assays; Statistical significance was determined via two-tailed Mann Whitney *U* tests. *P* values are reported for comparisons with the parasite isogenic line, either NF10^{YF} or FCB.

Supplemental Table 3. Starting composition (% proportion on day 0) of each barcoded line for the resistome assay. Strain background (3D7 or Dd2), gene name and ID, mutation, and input % are indicated. Growth of pool is shown in Supplemental Figure 4.

***P. falciparum* line**	**Input**	**Gene name**	**Gene ID**
3D7	15.358	Wild type	
3D7 ABCI3 R2180P	9.3282	ABC transporter I family member 1	PF3D7_0319700
3D7 ACS10 M300I	3.0792	Acyl CoA synthase	PF3D7_0525100
3D7 ACS11 D648Y	0.6932	Acyl CoA synthase	PF3D7_1238800
3D7 ATPase2 CNV2	5.9087	Phospholipid-transporting ATPase 2	PF3D7_1219600
3D7 DHFR-TS G378E	7.2684	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	PF3D7_0417200
3D7 DHFR-TS I403L	3.521	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	PF3D7_0417200
3D7 FTb A515T	7.4498	Farnesyltransferase subunit beta	PF3D7_1147500
3D7 MDR2 K840N	3.3248	Multidrug resistance protein 2	PF3D7_1447900

3D7 NCR1 A1108T	7.8043	Niemann-Pick type C1-related protein	PF3D7_0107500
Dd2	1.6582	Wild type	
Dd2 AcAS T648M	1.8199	Acetyl-CoA synthetase	PF3D7_0627800
Dd2 AcAS A597V	0.1922	Acetyl-CoA synthetase	PF3D7_0627800
Dd2 AsnRS R487S	0.858	Asn-tRNA synthetase	PF3D7_0509600
Dd2 ATP4 Q172H	0.2903	Non-SERCA-type Ca2+ -transporting P-ATPase	PF3D7_1211900
Dd2 ATP4 G358S	0.5014	Non-SERCA-type Ca2+ -transporting P-ATPase	PF3D7_1211900
Dd2 ATP4 L927V	0.538	Non-SERCA-type Ca2+ -transporting P-ATPase	PF3D7_1211900
Dd2 CARL I1139K	0.07	Cyclic amine resistance locus	PF3D7_0321900
Dd2 CARL V1103L	0.1259	Cyclic amine resistance locus	PF3D7_0321900
Dd2 CLK3 H259P	1.284	Cyclin-dependent-like kinase	PF3D7_1114700
Dd2 CPSF Y408S E	0.5346	Cleavage and polyadenylation specific factor	PF3D7_1438500
Dd2 CPSF Y408S S	0.2169	Cleavage and polyadenylation specific factor	PF3D7_1438500
Dd2 CRT M343L	0.6675	Chloroquine resistance transporter	PF3D7_0709000
Dd2 CSC1 L800P	0.383	CSC1-like protein, putative	PF3D7_1250200
Dd2 cytBC1 G33V	0.3329	Cytochrome b	PF3D7_MIT02300
Dd2 cytBC1 V284L	0.3258	Cytochrome b	PF3D7_MIT02300
Dd2 DHFR-TS S216R	0.4568	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	PF3D7_0417200
Dd2 DHODH C276Y	0.5051	Dihydroorotate dehydrogenase	PF3D7_0603300
Dd2 DHODH F227I	0.115	Dihydroorotate dehydrogenase	PF3D7_0603300
Dd2 DHODH I263F	0.0338	Dihydroorotate dehydrogenase	PF3D7_0603300
Dd2 DHODH L531F	0.2159	Dihydroorotate dehydrogenase	PF3D7_0603300
Dd2 eEF2 L755F	0.3515	Elongation factor 2	PF3D7_1451100
Dd2 eEF2 Y186N	0.2	Elongation factor 2	PF3D7_1451100
Dd2 GGPPS S228T	0.7254	Geranylgeranyl diphosphate synthase	PF3D7_1128400
Dd2 HSP90 A41S	1.195	Heat shock protein 90	PF3D7_0708400
Dd2 IleRS E180D	0.8316	Ile-tRNA synthetase	PF3D7_1332900
Dd2 IleRS L810F	0.5525	Ile-tRNA synthetase	PF3D7_1332900
Dd2 IleRS V500A	0.6993	Ile-tRNA synthetase	PF3D7_1332900
Dd2 kelch13 C580C	0.8749	Kelch protein K13	PF3D7_1343700
Dd2 kelch13 C580Y	0.9463	Kelch protein K13	PF3D7_1343700
Dd2 kelch13 R539T	0.3989	Kelch protein K13	PF3D7_1343700
Dd2 MCP D195N	0.4865	Mitochondrial carrier protein	PF3D7_0908800
Dd2 MCP P214T	9.7372	Mitochondrial carrier protein	PF3D7_0908800
Dd2 PI4K S1320L+L1418F	0.9304	Phosphatidylinositol 4-kinase	PF3D7_0509800
Dd2 PI4K S743F+H1484Y	0.2916	Phosphatidylinositol 4-kinase	PF3D7_0509800
Dd2 ProRS L482H	0.024	Pro-tRNA synthetase	PF3D7_1213800
Dd2 PROTB5 A20V	1.1791	Proteasome beta 5 26S (A80V immature)	PF3D7_1011400
Dd2 PROTB5 M45I	2.4786	Proteasome beta 5 26S (M105I immature)	PF3D7_1011400
Dd2 QRP1 D1863Y	2.1268	Quinoxaline resistance protein	PF3D7_1359900
Dd2 TyrRS S234C	1.0082	Tyr-tRNA synthetase	PF3D7_1117500
Dd2 UDP-GT F37V	0.1012	UDP-galactose transporter	PF3D7_1113300

6. DISCUSSÃO

O cenário constante seleção e expansão de cepas de *Plasmodium* spp resistentes aos fármacos antimaláricos disponíveis expõe a necessidade de esforços contínuos no desenvolvimento de novos candidatos ao arsenal antimalárico. Com isso, abordagens computacionais como o aprendizado de máquina despontam como alternativas para o aprimoramento do oneroso processo tradicional de triagens fenotípicas. Frente a este contexto, este estudo empregou as estratégias de química comparativa e triagem virtual com o objetivo de identificar potenciais moléculas advindas de produtos naturais e derivados que possam apresentar relevante atividade antiplasmodial.

Uma ramificação da biblioteca comercial da empresa MolPort, agregadora de diferentes provedores de compostos químicos, foi submetida à triagem virtual utilizando-se uma combinação de modelos binário e contínuo de QSAR para predição de atividade contra estágio sanguíneo assexuado de *P. falciparum* (FERREIRA et al., 2021). O modelo de QSAR contínuo, que quantifica a atividade biológica pela predição de possíveis valores de IC_{50}, classificou como *hits* moléculas que apresentaram pIC_{50} (3D7) ≥ 6, (IC_{50} predito em cepa de *P. falciparum* 3D7 < 1 μM). O modelo binário, por sua vez, capaz de classificar moléculas como ativas ou inativas, filtrou apenas aquelas bem-sucedidas na etapa anterior que também atendiam à condição de $p \geq 0.6$ (probabilidade de serem ativas em cepa de *P. falciparum* W2 maior ou igual a 60%). Finalmente, um filtro de lipofilicidade (logP < 3) garantiu que os *hits* finais apresentassem características físico-químicas adequadas. Estima-se que o uso de estratégias de QSAR pode aumentar a taxa de *hits* de 10 a até 40 vezes quando comparada ao tradicional HTS (NEVES et al., 2018). Esta etapa de triagem virtual realizada prioriza compostos e otimiza a carga nas etapas experimentais conseguintes.

O primeiro passo da triagem fenotípica dos compostos selecionados, avaliação da atividade antiplasmodial a 5 μM, mostrou que o conjunto de dados selecionado possuía uma taxa de sucesso de aproximadamente 28% (8 dentre 28 compostos apresentando acima de 70% de inibição do crescimento de *P. falciparum* 3D7). Este resultado favorável permitiu, inclusive, que o limiar utilizado fosse modificado do usual

50% para 70%, aumentando as chances de que os *hits* fossem o mais potentes possível. Dentre as oito moléculas mais promissoras, destacaram-se LDT-597 e LDT-598 com IC_{50} de aproximadamente 0.5 nM em cepa de parasita multirresistente W2, com cerca de dez vezes mais potência que o artesunato (IC_{50}: 5.7 nM) (SMIT et al., 2015). A estrutura química destes dois compostos, no entanto, revela uma lacuna no desenho experimental deste estudo. Apesar de uma análise de similaridade química por clusterização com base em coeficientes de Tanimoto ter sido utilizada para avaliar a abundância química do conjunto de moléculas triado e validar sua diversidade, não foi realizado o importante passo de verificar a similaridade destas moléculas ao painel de antimaláricos existente. Os compostos LDT-597 e LDT-598, são, portanto, lactonas sesquiterpênicas que contém em suas estruturas uma ponte de endoperóxido. Por apresentam similaridade de 75% e 73%, respectivamente, com o antimalárico artesunato, distanciam-se do ideal de candidato com estrutura química e (possível) mecanismo de ação inédito.

Ainda dentro do conjunto de *hits* oriundos desta triagem virtual, LDT-611 figurou como candidato interessante por apresentar atividade antiplasmodial submicromolar contra *P. falciparum* multirresistente *in vitro*. Apesar de pertencer ao quimiotipo de 4-aminoquinolinas (4-AQ), o composto apresente similaridade de apenas cerca de 50% com amodiaquina. Buscamos, então, explorar o potencial deste composto através da avaliação de outras moléculas estruturalmente similares a fim de identificar alternativas ainda mais potentes. Lançando mão novamente do coeficiente de Tanimoto, a base de dados de moléculas comerciais da MolPort foi novamente interrogada utilizando-se os SMILES (*Simplified Molecule Input Line Entry System*), de LDT-611 como entrada para esta busca por similaridade. Apesar de aparentemente arbitrário, o limiar de 78% de similaridade foi definido a partir de inspeção visual, uma vez que compostos com similaridade abaixo deste índice já não mais remetiam à estrutura de LDT-611. Assim, dentre os onze novos compostos com similaridade selecionados e avaliados experimentalmente, destacou-se LDT-623, outra 4-AQ com atividade nanomolar contra estágios sanguíneos do parasita. Apesar de esta molécula já ter sido descrita como inibidora de estágio assexuado de *P. falciparum* Dd2 a uma única concentração dentro de uma grande triagem fenotípica (GAMO et al., 2010b), buscou-se aprofundar o conhecimento sobre seu potencial avaliando sua atividade em todo o ciclo de vida do parasita, uma vez que compostos com atividade

multiestágio são imprescindíveis para o objetivo de erradicação da doença (POONAM et al., 2018).

A atividade antiplasmodial observada para LDT-623 confirmou-se não apenas contra esquizontes hepáticos de *P. berghei in vitro* (IC_{50}: 983 nM), mas também em diferentes ensaios de bloqueio de transmissão contra estágios sexuados: inibição da conversão de gametas de *P. berghei* em oocinetos *in vitro* (IC_{50}: 1.5 μM) e 61.7% de inibição da viabilidade de gametócitos maduros estágio V de *P. falciparum* a 5 μM. São insuficientes os relatos de atividade de 4-aminoquinolinas além da fase sanguínea, especialmente em relação a fases sexuadas. Em relação à cloroquina, um expoente das 4-aminoquinolinas, diversos estudos **corroboram** sua atividade gametocida limitada aos estágios imaturos de gametocitos de *P. falciparum* (MACEDO et al., 2016; SÁENZ et al., 2012; SMALLEY, 1977), com sua atividade provavelmente limitada à presença de hemoglobina da hemácia hospedeira no início do desenvolvimento gametocítico. Diante disso, a cloroquina também já se mostrou inativa contra os estágios sexuados conseguintes em *P. berghei*, como gametas, oocinetos e oocistos (AZEVEDO et al., 2017). Ainda, atividade esquizonticida contra estágios hepáticos por 4-AQs, até o momento, foi reportada por dois compostos exploratórios (LÖDIGE et al., 2013; TERZIĆ et al., 2016), enquanto 4-AQs estabelecidas como piperaquina, cloroquina, amodiaquina e AQ-13 (DELVES et al., 2012). Curiosamente, estas respostas observadas em diferentes fases do ciclo, são bastante incomuns, uma vez que a classe de 4-aminoquinolinas é conhecida por ser inibidora de estágios sanguíneos em função de seu mecanismo de ação baseado na interferência na formação de hemozoína no vacúolo digestivo do parasita (FITCH, 2004; TAM et al., 2020). Em conjunto, os resultados sugerem para LDT-623 um modo de ação distinto do canônico observado para seu quimiotipo.

A investigação do mecanismo de ação envolvido na atividade antimalárica de LDT-623 validou sua capacidade de inibição da formação de hemozoina no vacúolo digestivo. Sabendo-se que um conjunto de mutações no gene que codifica *pfcrt* traduzem-se fenotipicamente em mecanismos de resistência a quinolinas como CQ e PPQ (FIDOCK et al., 2000; MATHIEU et al., 2020; ROSS et al., 2018a), utilizamos diferentes ferramentas como variantes de PfCRT constituídas em proteolipossomos (KIM et al., 2019) e um painel de cepas editadas geneticamente para avaliar o impacto destas mutações na atividade de LDT-623. Em conjunto, os dados mostraram que o

composto se liga a diferentes isoformas de PfCRT. No entanto, os diferentes perfis de suscetibilidade das variantes analisadas não refletiram, necessariamente, em diferenças em suas respostas fenotípicas ao LDT-623. Em suma, as linhagens que contém o haplótipo CVIET para PfCRT (background genético do Sudeste Asiático, Dd2) comportaram-se de maneira bimodal, resultado de inibição incompleta – característica associada a mutações que conferem resistência à piperaquina. O mesmo comportamento, no entanto, não foi observado para o haplótipo SVMNT (background genético sul-americano, 7G8). Apesar de mutação F145I, responsável por altos níveis de resistência à piperaquina (AGRAWAL et al., 2017), ter gerado menor suscetibilidade ao LDT-623 em ambos backgrounds, esta alteração genética é consideravelmente desfavorável ao *fitness* do parasita e dificilmente se estabelece e expande em contexto clínico (WICHT et al., 2022). Adicionalmente, alterações genéticas em *pfmdr1*, marcador molecular de resistência a diversos antimaláricos, inclusive alguns usados em combinação com derivados de artemisinina nos ATCs, também não alteraram de maneira significativa a resposta a LDT-623. Vale ressaltar que diversas destas mutações avaliadas estão presentes em regiões como a África e o Sudeste Asiático, associadas ao surgimento precoce de resistência antimalárica no campo (DURU et al., 2015; TRAPE et al., 1998; VEIGA et al., 2016).

Uma vez que a seleção *in vitro* (IVIEWGA) tem se mostrado uma aboradagem de sucesso para identificar alvos moleculares e potenciais modos de ação envolvidos em fármacos candidatos (YANG et al., 2021), expor culturas de *P. falciparum* a concentrações subletais de LDT-623 poderia acuar o parasita, deixando-o apenas com a opção de alterar seu genoma e consequente expressão gênica a fim de driblar a pressão seletiva imposta. Mesmo empregando uma linhagem de parasita “hipermutável” e, portanto, mais suscetível a alterações genéticas (KÜMPORNSIN et al., 2023), o composto falhou em selecionar linhagens LDT-623-resistentes *in vitro*. No protocolo de seleção de resistência *in vitro* no qual parasitas recrudesceram em cultura, a curva de dose-resposta obtida em ensaios fenotípicos assemelhou-se ao comportamento bimodal – o que sugere que uma subpopulação de parasitas pode, de fato, ter sobrevivido à pressão exercida. Estudos sugerem que curvas de sobrevivência bimodais podem representar fármacos que apresentam múltiplos alvos moleculares e/ou mecanismos de ação (CO et al., 2009; LE MANACH et al., 2018; PATEL et al., 2008), o que corrobora a atividade multiestágio observada para LDT-

623. Finalmente, utiizou-se dezenas de clones de *P. falciparum* com mutações em importantes marcadores de resistência associados a diversos quimiotipos de antimaláricos para interrogar possíveis padrões de resistência cruzada perante tratamento com o composto (CARRASQUILLA et al., 2022). O não-enriquecimento de nenhuma das linhagens utilizadas, especialmente aquelas relacionadas a marcadores moleculares de ACTs (ARIEY et al., 2014; FAIRHURST; DONDORP, 2016), associado à observância de que a resistência ao LDT-623 é um fenômeno consideravelmente pouco provável de ocorrer, tornam este composto “irresistível” e bastante atrativo no contexto dos esforços de controle da doença.

Diversas características como fácil síntese, baixo custo, perfil adequado de toxicidade e atividade contra cepas resistentes do parasita advogam a favor das 4-AQs como opção terapêutica. No entanto, o abandono da monoterapia na malária direciona o uso deste quimiotipo como fármaco componente dos trartamentos combinados de ACTs, assim como amodiaquina, pironaridine e mefloquina. De acordo com orientações recentes para priorização de candidatos antimaláricos (BURROWS et al., 2017; SAMBY et al., 2021), LDT-623 encaixa-se como TCP-1 (moléculas que eliminam parasitas assexuados no estágio sanguíneo) e TCP-4 (molécula com atividade contra esquizontes hepáticos), uma vez que IC_{50} < 1.000 nM em modelos relevantes *in vitro* são necessários para sua categorização. Considerando-se que o perfil fenotípico de uma molécula pode a classificar entre determinados TCPs, essa classificação pode tanto guiar esforços de desenvolvimento de novos fármacos quanto sugerir otimização de uma série química – alteração de radicais no *scaffold* de LDT-623 para refinamento de sua potência em estágios sexuados do parasito, por exemplo.

7. CONCLUSÃO

- A aplicação de triagens virtuais aumenta a probabilidade de que moléculas selecionadas sejam ativas em ensaios fenotípicos;

- LDT-623 apresenta atividade contra estágios hepáticos, sexuados e assexuados de *Plasmodium* spp;

- LDT-623 liga-se diretamente a variantes de PfCRT carregando mutações que conferem resistencia à piperaquina, como F145I e C350R;

- O background genético Dd2, cujo haplótipo PfCRT é o CVIET, tem um papel importante na formação de curvas de dose-resposta bimodais frente ao tratamento com LDT-623;

- LDT-623 é, *a priori*, um composto antimalárico “irresistível” por não gerar parasitas resistentes *in vitro*, porém sua distinta resposta fenotípica ispira cautela na interpretação de seus dados;

- LDT-623 não apresenta resistência cruzada com diversos marcadores moleculares emergentes no *pipeline* de descoberta de novos fármacos e outros já estabelecidos no campo;

- Os resultados reiteram a relevância das 4-AQs como alternativa terapêutica no combate à malária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-GHANI, R.; FARAG, H. F.; ALLAM, A. F. Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*: a zoomed image at the molecular level within a geographic context. **Acta Tropica**, v. 125, n. 2, p. 163–190, 2013.

ACHAN, J. et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: Role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 144, 2011.

AGRAWAL, S. et al. Association of a novel mutation in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter with decreased piperaquine sensitivity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 4, p. 468–476, 2017.

AREY, R.; REISFELD, B. Predicting the disposition of the antimalarial drug artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin using physiologically-based pharmacokinetic modeling. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 2020.

ARIEY, F. et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 57, n. 6, p. 742–768, 2014.

ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1608–1621, 2018.

AUBURN, S. et al. The changing epidemiology of *Plasmodium vivax*: Insights from conventional and novel surveillance tools. **PLoS Medicine**, v. 18, n. 4, 2021.

AVERY, M. A. et al. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 6. The development of predictive in vitro potency models using CoMFA and HQSAR methodologies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 292–303, 2002.

AZEVEDO, R. et al. Bioluminescence method for *in vitro* screening of *Plasmodium* transmission-blocking compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 61, n. 6, 2017.

BAIRD, J. K. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4075–4083, 2004.

BALIKAGALA, B. et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 13, p. 1163–1171, 2021.

BENTO, A. P. et al. The ChEMBL bioactivity database: An update. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 1083–1090, 2014.

BESTEIRO, S.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 797–805, 2011.

BILLKER, O. et al. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 289–292, 1998.

BIRTH, D.; KAO, W. C.; HUNTE, C. Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome *bc1* complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

BLASCO, B.; LEROY, DI.; FIDOCK, D. A. Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. **Nature Medicine**, v. 23, n. 8, p. 917, 2017.

BONILLA-RAMIREZ, L. et al. Novel antimalarial chloroquine- and primaquine-quinoxaline 1,4-di-N-oxide hybrids: Design, synthesis, *Plasmodium* life cycle stage profile, and preliminary toxicity studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 68–81, 5 2018.

BOPP, S. et al. Plasmepsin II–III copy number accounts for bimodal piperaquine resistance among Cambodian *Plasmodium falciparum*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.

BORDIGNON, A. et al. *In vitro* antiplasmodial and cytotoxic activities of sesquiterpene lactones from *Vernonia fimbrillifera Less*. (*Asteraceae*). **Natural Product Research**, v. 32, n. 12, p. 1463–1466, 2017.

BOSMAN, A.; MENDIS, K. N. A major transition in malaria treatment: The adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. SUPPL. 6, p. 193–197, 2007.

BOUWMAN, S. A. et al. The early preclinical and clinical development of cipargamin (KAE609), a novel antimalarial compound. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 36, 2020.

BOYD, M.; KITCHEN, S. On the infectiousness of patients infected with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, p. 253–62, 1937.

BRABIN, B. J. Malaria's contribution to World War One - the unexpected adversary. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, 2014.

BURROWS, J. N. et al. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 26, 2017.

BUTINA, D. Unsupervised data base clustering based on daylight's fingerprint and Tanimoto similarity: A fast and automated way to cluster small and large data sets. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 39, n. 4, p. 747–750, 1999.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141–2153, 2004.

C. L. HARTWIG et al. SYBR Green I®-based parasite growth inhibition assay for measurement of antimalarial drug susceptibility in *Plasmodium falciparum*. Em: K. MOLL et al. (Eds.). **Methods in Malaria Research**. p. 122–129.

CALIT, J. et al. Screening the pathogen box against *Plasmodium* sexual stages using a new nanoluciferase based transgenic line of *P. berghei* identifies transmission-blocking compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n., 2018.

CARRASQUILLA, M. et al. Barcoding genetically distinct *Plasmodium falciparum* strains for comparative assessment of fitness and antimalarial drug resistance. **mBio**, v. 13, n. 5, 2022.

CHERKASOV, A. et al. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 4977–5010, 2014.

CHU, C. S.; WHITE, N. J. The prevention and treatment of *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS Medicine**, v. 18, n. 4, 2021.

CO, E. M. A. et al. Assessment of malaria *in vitro* drug combination screening and mixed-strain infections using the malaria Sybr Green I-based fluorescence assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2557, 2009.

COATNEY, G. R. Pitfalls in a discovery: The chronicle of chloroquine. **The American Journal of Medicine and Hyigiene**, v. 12, n. 2, p. 121–128, 1963.

COMBRINCK, J. M. et al. Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. **ACS Chemical Biology**, n. 8, p. 133–137, 2012.

COMBRINCK, J. M. et al. Optimization of a multi-well colorimetric assay to determine haem species in *Plasmodium falciparum* in the presence of anti-malarials. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, 2015.

CONRAD, M. D. et al. Evolution of partial resistance to artemisinins in malaria parasites in Uganda. **New England Journal of Medicine**, v. 389, n. 8, p. 722–732, 2023.

COPPÉE, R.; SABBAGH, A.; CLAIN, J. Structural and evolutionary analyses of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.

COREY, V. C. et al. A broad analysis of resistance development in the malaria parasite. **Nature Communications**, v. 7, p. 11901, 2016.

COWELL, A.; WINZELER, E. Exploration of the *Plasmodium falciparum* resistome and druggable genome reveals new mechanisms of drug resistance and antimalarial targets. **Microbiology Insights**, v. 11, 2018.

CRAVO, P. et al. Mechanisms of drug resistance in malaria: Current and new challenges. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 63–73, 2006.

CUI, L.; SU, X. Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n. 8, p. 999–1013, 2009.

DE SOUZA PEREIRA, C. et al. A Novel Hybrid of Chloroquine and Primaquine Linked by Gold(I): Multitarget and Multiphase Antiplasmodial Agent. **ChemMedChem**, v. 16, n. 4, p. 662–678, 2021.

DELVES, M. et al. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 2, 2012.

DHINGRA, S. K. et al. Global spread of mutant PfCRT and its pleiotropic impact on Plasmodium falciparum multidrug resistance and fitness. **mBio**, v. 10, n. 2, 2019a.

DHINGRA, S. K. et al. *Plasmodium falciparum* resistance to piperaquine driven by PfCRT. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, p. 1168–1169, 2019b.

DJOUMBOU-FEUNANG, Y. et al. BioTransformer: a comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, 2019.

DURU, V. et al. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperaquine *in vitro* assays: Retrospective and prospective investigations. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2015.

ECKER, A. et al. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 11, p. 504–514, 2012.

ELYAZAR, I. R. F.; HAY, S. I.; BAIRD, J. K. Malaria distribution, prevalence, drug resistance and control in Indonesia. **Advances in Parasitology**, v. 74, p. 1–107, 2011.

FAIRHURST, R. M.; DONDORP, A. M. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, 2016.

FERNÁNDEZ-ÁLVARO, E. et al. Antimalarial chemotherapy: Natural product inspired development of preclinical and clinical candidates with diverse mechanisms of action. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 5587–5603, 2016.

FERREIRA, L. T. et al. QSAR-based virtual screening of natural products database for identification of potent antimalarial hits. **Biomolecules**, Vol. 11, Page 459, v. 11, n. 3, p. 459, 2021.

FIDOCK, D. et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein pfcrt and evidence for their role in chloroquine resistance. **Molecular Cell**, v. 6, n. 4, p. 861–871, 2000.

FITCH, C. D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. **Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 1957–1972, 2004.

FIVELMAN, Q. L. et al. Improved synchronous production of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 154, n. 1, p. 119–123, 2007.

FOLA, A. A. et al. *Plasmodium falciparum* resistant to artemisinin and diagnostics have emerged in Ethiopia. **Nature Microbiology** 2023 8:10, v. 8, n. 10, p. 1911–1919, 2023.

FONG, K. Y.; WRIGHT, D. W. Hemozoin and antimalarial drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 12, p. 1437–1450, 2013.

FORTE, B. et al. Prioritization of molecular targets for antimalarial drug discovery. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 10, p. 2764–2776, 2021.

FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify II: A practical guide to chemogenomics data curation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 7, p. 1243–1252, 2016.

FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust, but verify: On the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 7, p. 1189–1204, 2010.

FRANÇOIS, G.; PASSREITER, C. M. Pseudoguaianolide sesquiterpene Lactones with high activities against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 2, p. 184–186, 2004.

FREVERT, U. et al. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 5, p. 1287–1298, 1993.

FRY, M.; PUDNEY, M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1545–1553, 1992.

GAMO, F. J. et al. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 305–310, 2010.

GOLDGOF, G. M. et al. Comparative chemical genomics reveal that the spiroindolone antimalarial KAE609 (Cipargamin) is a P-type ATPase inhibitor. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

GOMES, M. N. et al. Computer-aided discovery of two novel chalcone-like compounds active and selective against *Leishmania infantum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 11, p. 2459–2464, 2017.

GORDI, T. et al. A semiphysiological pharmacokinetic model for artemisinin in healthy subjects incorporating autoinduction of metabolism and saturable first-pass hepatic extraction. **British Journal of Clinical Pharmacology**, p. 189–198, 2005.

HALDAR, K.; BHATTACHARJEE, S.; SAFEUKUI, I. Drug resistance in *Plasmodium*. **Nature Reviews Microbiology 2018 16:3**, v. 16, n. 3, p. 156–170, 2018.

HANDAYANI, S. et al. High Deformability of *Plasmodium vivax*–infected red blood cells under microfluidic conditions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 3, p. 445–450, 2016.

HAPPI, C. T. et al. Linkage disequilibrium between two distinct loci in chromosomes 5 and 7 of *Plasmodium falciparum* and *in vivo* chloroquine resistance in Southwest Nigeria. **Parasitology Research**, v. 100, n. 1, p. 141–148, 2006.

HARRISON, G. **Mosquitoes, malaria, and man: a history of hostilities since 1880**. London: [s.n.].

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HEGNER, R. Relative frequency of ring-stage *Plasmodia* in reticulocytes and mature erythrocytes in man and monkey. **American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 690–718, 1938.

HERT, J. et al. Quantifying biogenic bias in screening libraries. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 7, p. 479–483, 2009.

HOVLID, M. L.; WINZELER, E. A. Phenotypic screens in antimalarial drug discovery. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 9, p. 697–707, 1 set. 2016.

HOWES, R. E. et al. *Plasmodium vivax* transmission in Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1–27, 2015.

HRYCYNA, C. A. et al. Quinine dimers are potent inhibitors of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and are active against quinoline-resistant *P. falciparum*. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 3, p. 722–730, 2014.

JIMÉNEZ-DÍAZ, M. B. et al. (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 50, p. 5455–5462, 2014.

JORGENSEN, W. L. The many roles of computation in drug discovery. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1813–1818, 2004.

K. CHATTERJEE, A.; K.S. YEUNG, B. Back to the future: Lessons learned in modern target-based and whole-cell lead optimization of antimalarials. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 473–483, 2012.

KAFSACK, B. F. C. et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 248–252, 2014.

KARUNAJEEWA, H. A. Artemisinins: Artemisinin, dihydroartemisinin, artemether and artesunate. Em: **Treatment and Prevention of Malaria**. Basel: Springer Basel, 2011. p. 157–190.

KIM, J. et al. Structure and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT. **Nature**, v. 576, n. 7786, p. 315–320, 2019.

KIM, S. et al. PubChem substance and compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 2016.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496–511, 2012.

KOCH, M. A. et al. Charting biologically relevant chemical space: a structural classification of natural products (SCONP). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 48, p. 17272–17277, 2005.

KROGSTAD, D. J. et al. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. **Science**, v. 238, n. 4831, p. 1283–1285, 1987.

KÜMPORNSIN, K. et al. Generation of a mutator parasite to drive resistome discovery in *Plasmodium falciparum*. **Nature Communications** 2023 14:1, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2023.

LACERDA, M. V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v. 11, 2012.

LAMBROS C, V. JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418–420, 1979.

LAMONTE, G. et al. Mutations in the *Plasmodium falciparum* cyclic amine resistance locus (PfCARL) confer multidrug resistance. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 696–712, 2016.

LE MANACH, C. et al. Antimalarial lead-optimization studies on a 2,6-imidazopyridine series within a constrained chemical space to circumvent atypical dose-response curves against multidrug resistant parasite strains. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 9371–9385, 2018.

LEANG, R. et al. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria multidrug resistance to artemisinin and piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-piperaquine open-label multicenter clinical assessment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4719–4726, 2015.

LEE, A. H.; FIDOCK, D. A. Evidence of a mild mutator phenotype in Cambodian *Plasmodium falciparum* malaria parasites. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154166, 2016.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2694–2718, 2016.

LI, J. W.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161–166, 2009.

LIMA, M. N. N. et al. Integrative multi-kinase approach for the identification of potent antiplasmodial hits. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 491906, 2019.

LIMA, M. N. N. et al. QSAR-driven design and discovery of novel compounds with antiplasmodial and transmission blocking activities. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

LIU, W.; LIU, Y. Youyou Tu: significance of winning the 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–2, 2016.

LÖDIGE, M. et al. A primaquine-chloroquine hybrid with dual activity against *Plasmodium* liver and blood stages. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 8, p. 539–547, 2013.

LUTH, M. R. et al. Using *in vitro* evolution and whole genome analysis to discover next generation targets for antimalarial drug discovery. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 301–314, 2018.

MACEDO, T. S. et al. Chloroquine-containing organoruthenium complexes are fast-acting multistage antimalarial agents. **Parasitology**, v. 143, n. 12, p. 1543–1556, 2016.

MALLERET, B. et al. *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1314–1325, 2015.

MATHIEU, L. C. et al. Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* K13 C580Y mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. **eLife**, v. 9, p. 1–21, 2020.

MATTER, H. Selecting optimally diverse compounds from structure databases: a validation study of two-dimensional and three-dimensional molecular descriptors. 1997.

MELO-FILHO, C. C. et al. QSAR-driven discovery of novel chemical scaffolds active against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 7, p. 1357–1372, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**, 2010.

MIOTTO, O. et al. Emergence of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* with *kelch13* C580Y mutations on the island of New Guinea. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. e1009133, 2020.

MMV's pipeline of antimalarial drugs. **Medicines for Malaria Venture**. Disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-pipeline-antimalarial-drugs>. Acesso em: 22 nov. 2023.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983.

MURITHI, J. M. et al. The *Plasmodium falciparum* ABC transporter ABCI3 confers parasite strain-dependent pleiotropic antimalarial drug resistance. **Cell Chemical Biology**, v. 29, n. 5, p. 824- 839.e6, 2022.

NANTASENAMAT, C.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; PRACHAYASITTIKUL, V. Advances in computational methods to predict the biological activity of compounds. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 7, p. 633–654, 2010.

NEVES, B. J. et al. Automated framework for developing predictive machine learning models for data-driven drug discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 1, p. 110–122, 2021.

NEVES, B. J. et al. Discovery of new anti-schistosomal hits by integration of QSAR-based virtual screening and high content screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 7075–7088, 2016.

NEVES, B. J. et al. QSAR-based virtual screening: Advances and applications in drug discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, p. 1–7, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NG, C. L.; FIDOCK, D. A. *Plasmodium falciparum in vitro* drug resistance selections and gene editing. **Methods in Molecular Biology**, v. 2013, p. 123–140, 2019.

NOEDL, H. et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 24, p. 2619–2620, 2008.

NOSTEN, F. et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. **Lancet**, v. 354, n. 9178, p. 546–549, 1999.

OKOMBO, J. et al. Genomic and genetic approaches to studying antimalarial drug resistance and *Plasmodium* Biology. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 476, 2021.

OLAFUYI, O.; COLEMAN, M.; BADHAN, R. K. S. Development of a paediatric physiologically based pharmacokinetic model to assess the impact of drug-drug interactions in tuberculosis co-infected malaria subjects: A case study with artemether-lumefantrine and the CYP3A4-inducer rifampicin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 20–33, 2017.

PALOQUE, L. et al. Mutation in the *Plasmodium falciparum* BTB/POZ domain of K13 protein confers artemisinin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 1, 2022.

PAQUET, T. et al. Antimalarial efficacy of MMV390048, an inhibitor of *Plasmodium* phosphatidylinositol 4-kinase. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 387, 2017.

PAROBEK, C. M. et al. Partner-drug resistance and population substructuring of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1673–1686, 2017.

PATEL, V. et al. Identification and characterization of small molecule inhibitors of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 50, p. 35078, 2008.

PEDERSEN, M. M. et al. Antimalarial sesquiterpene lactones from *Distephanus angulifolius*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 601–607, 2009.

PELLEAU, S. et al. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfcrt*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 37, p. 11672–11677, 2015.

PILON, A. C. et al. NuBBEDB: An updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

PLOEMEN, I. H. J. et al. Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. 1–12, 2009.

PLOUFFE, D. M. et al. High-throughput assay and discovery of small molecules that interrupt malaria transmission. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 1, p. 114–126, 2016.

POONAM et al. Multistage inhibitors of the malaria parasite: Emerging hope for chemoprotection and malaria eradication. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 5, p. 1511–1535, 2018.

PRICE, R. N. et al. Phenotypic and genotypic characterisation of drug-resistant *Plasmodium vivax*. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 11, p. 522–529, 2012.

PRICE, R. N. et al. Vivax malaria: Neglected and not benign. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. SUPPL. 6, p. 79–87, 2007.

RADFAR, A. et al. Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. **Nature Protocols**, v. 4, n. 11, p. 1828–1844, 2009.

RECHT, J. et al. Safety of 8-Aminoquinoline antimalarial medicines. **WHO Geneva**, v. 8, n. 3, p. 61–112, 2015.

RIEGEL, B.; ROEPE, P. D. Altered drug transport by *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter isoforms harboring mutations associated with piperaquine resistance. **Biochemistry**, v. 59, n. 27, p. 2484–2493, 2020.

ROGERSON, S. J. et al. Identifying and combating the impacts of COVID-19 on malaria. **BMC Medicine**, v. 18, n. 239, p. 1–7, 2020.

ROSS, L. S. et al. Emerging Southeast Asian PfCRT mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line antimalarial piperaquine. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 25–28, 2018.

ROSS, L. S. et al. Identification of collateral sensitivity to dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in *Plasmodium falciparum*. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 508–515, 2018b.

ROSS, L. S.; FIDOCK, D. A. Elucidating mechanisms of drug-resistant *Plasmodium falciparum*. **Cell Host & Microbe**, v. 26, n. 1, p. 35–47, 2019.

ROSS, R. On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. **British Medical Journal**, v. 2, n. 1929, p. 1786–1788, 1897.

ROTTMANN, M. et al. Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. **Science**, v. 329, n. 5996, p. 1175–1180, 2010.

SÁ, J. M. et al. Geographic patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance distinguished by differential responses to amodiaquine and chloroquine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 45, p. 18883–18889, 2009.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 680–685, 2002.

SÁENZ, F. E. et al. Novel 4-aminoquinoline analogs highly active against the blood and sexual stages of *Plasmodium in vivo* and *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4685–4692, 2012.

SAMBY, K. et al. Actives from MMV Open Access Boxes? A suggested way forward. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 4, p. 1–11, 2021.

SANCHEZ, C. P. et al. The knock-down of the chloroquine resistance transporter PfCRT is linked to oligopeptide handling in *Plasmodium falciparum*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, 2022.

SANDER, T. et al. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 2, p. 460–473, 2015.

SCHLITZER, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. **ChemMedChem**, v. 2, n. 7, p. 944–986, 2007.

SHERRARD-SMITH, E. et al. The potential public health consequences of COVID-19 on malaria in Africa. **Nature Medicine**, 2020.

SIDHU, A. B. S. et al. Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 4, p. 528–535, 2006.

SILVA, S. R. et al. Chloroquine resistance is associated to multi-copy *pvcrt*-o gene in *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1,. 2018.

SINDEN, R. E. The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. **Parasitology**, v. 86 (Pt 4), n. 4, p. 7–28, 1983.

SINGH, G.; SINGH, R.; URHEHAR, A. D. Simple molecular methods for early detection of chloroquine drug resistance in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 7, p. 19–23, 2016.

SIRAWARAPORN, W. et al. Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 4, p. 1124–1129, 1997.

SMALL-SAUNDERS, J. L. et al. Evidence for the early emergence of piperaquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria and modeling strategies to mitigate resistance. **PLoS Pathogens**, v. 18, n. 2, p. 1–27, 2022.

SMALL-SAUNDERS, J. L.; HAGENAH, L. M.; FIDOCK, D. A. Turning the tide: targeting PfCRT to combat drug-resistant *P. falciparum*? **Nature Reviews Microbiology 2020 18:5**, v. 18, n. 5, p. 261–262, 2020.

SMALLEY, M. E. *Plasmodium falciparum* gametocytes: the effect of chloroquine on their development. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 6, p. 526–529, 1977.

SMIT, F. J. et al. Synthesis and *in vitro* biological evaluation of dihydroartemisinyl-chalcone esters. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 33–44, 2015.

SPILLMAN, N. J. et al. Na+ regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* involves the cation ATPase PfATP4 and is a target of the spiroindolone antimalarials. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 2, p. 227–237, 2013.

SPYROPOULOS, I. C. et al. TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. **Bioinformatics**, v. 20, n. 17, p. 3258–3260, 2004.

STOKES, B. H. et al. *Plasmodium falciparum k13* mutations in Africa and Asia impact artemisinin resistance and parasite fitness. **eLife**, v. 10, 2021.

STRAIMER, J. et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 428–431, 2015.

SULLIVAN, D. J. Quinolines block every step of malaria heme crystal growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 29, p. 7483–7485, 2017.

SUMMERS, R. L. et al. Chemogenomics identifies acetyl-coenzyme A synthetase as a target for malaria treatment and prevention. **Cell Chemical Biology**, v. 29, n. 2, p. 191- 201.e8, 2022.

SWANN, J. et al. High-throughput luciferase-based assay for the discovery of therapeutics that prevent malaria. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 281–293, abr. 2016.

SWINNEY, D. C. Phenotypic *vs*. target-based drug discovery for first-in-class medicines. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 93, n. 4, p. 299–301, abr. 2013.

SYDOW, D. et al. TeachOpenCADD : a teaching platform for computer - aided drug design using open source packages and data. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 29, p. 1–7, 2019.

TAM, D. N. H. et al. Correlation between anti-malarial and anti-haemozoin activities of anti-malarial compounds. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, 21 ago. 2020.

TERZIĆ, N. et al. Reinvestigating old pharmacophores: Are 4-aminoquinolines and tetraoxanes potential two-stage antimalarials? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 264–281, 2016.

TRAPE, J. F. et al. Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, v. 321, n. 8, p. 689–697, 1998.

TROPSHA, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. **Molecular Informatics**, v. 29, n. 6–7, p. 476–488, 2010.

TSE, E. G.; KORSIK, M.; TODD, M. H. The past, present and future of anti-malarial medicines. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, 2019.

UWIMANA, A. et al. Emergence and clonal expansion of *in vitro* artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum kelch13* R561H mutant parasites in Rwanda. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1602–1608, 2020.

VAUGHAN, A. M. et al. A transgenic *Plasmodium falciparum* NF54 strain that expresses GFP-luciferase throughout the parasite life cycle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 186, n. 2, p. 143–147, 2012.

VEIGA, M. I. et al. Globally prevalent PfMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

VERMA, J.; KHEDKAR, V.; COUTINHO, E. 3D-QSAR in drug design - a review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 95–115, 2010.

VON SEIDLEIN, L.; WHITE, N. J. Taking on *Plasmodium vivax* malaria: A timely and important challenge. **PLoS Medicine**, v. 18, n. 4, 2021.

W TRAGER, J. J. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673–675, 1976.

WALTER, R. D. Altered dihydrofolate reductase in pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 61–66, 1986.

WANG, R.; FU, Y.; LAI, L. A New atom-additive method for calculating partition coefficients. **Journal of Chemical Information and Modeling.**, v. 37, p. 615–621, 1997.

WELLS, T. N. C.; BURROWS, J. N.; BAIRD, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 145–151, 2010.

WELLS, T. N. C.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; VAN VOORHIS, W. C. Malaria medicines: a glass half full? **Nature Reviews Drug discovery**, v. 14, n. 6, p. 424–442, 2015.

WHITFIELD, J. Portrait of a serial killer. **Nature**, 2002.

WICHT, K. J. et al. Mutant PfCRT can mediate piperaquine resistance in African *Plasmodium falciparum* with reduced fitness and increased susceptibility to other antimalarials. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 226, n. 11, p. 2021, 2022.

WICHT, K. J.; MOK, S.; FIDOCK, D. A. Molecular mechanisms of drug resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, p. 431–454, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2019. p. 1–232, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2022. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. p. 115, 2010.

YAHIYA, S. et al. The antimalarial screening landscape-looking beyond the asexual blood stage. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 50, p. 1–9, 2019.

YANG, T. et al. MalDA, accelerating malaria drug discovery. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 493–507, 2021.

ZHANG, L. et al. The discovery of novel antimalarial compounds enabled by QSAR-based virtual screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 2, p. 475–492, 2013.

ZOLG, J. W. et al. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 36, n. 3, p. 253–262, 1989.

9. ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Implementação de uma Plataforma para busca por novos compostos contra os diferentes estágios de Plasmodium vivax

Pesquisador: Stefanie Costa Pinto Lopes

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 84151317.4.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.039.519

Apresentação do Projeto:

No documento intitulado "2_Carta_Emenda.pdf, postado em 28/09/2021,
descreve as alterações listadas nos seguintes documentos anexados na Plataforma Brasil:

- Do aumento do número de participantes do projeto;
- Do aumento da vigência geral do projeto;

Pesquisador Responsável: Stefanie Costa Pinto Lopes

CAAE: 84151317.4.0000.0005

Objetivo da Pesquisa:

Vide Projeto Aprovado neste CEP sob o n. 2584969 em 06/04/2018 CAAE: 84151317.4.0000.0005

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide Projeto Aprovado neste CEP sob o n. 2584969 em 06/04/2018 CAAE: 84151317.4.0000.0005

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nesta Emenda Versão 3 do Centro Coordenador, para melhor esclarecimento das alterações realizadas, o Protocolo Versão 3 segue no formato com e sem alterações marcadas.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

Adicionalmente, apresentamos abaixo um resumo das alterações realizadas para a nova versão do protocolo (Protocolo versão 3 de 20 de setembro de 2021). Reforçamos que as alterações da emenda não impactaram em uma nova versão de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Esta alteração está sendo requerida devido a inserção dos alunos de doutorado Luis Carlos Salazar Alvarez e Letícia Tiburcio Ferreira pertencentes ao programa de Pós-Graduação da FCM-UNICAMP, supervisionado pelo Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa (com termo de anuência desta instituição). Os alunos supracitados farão experimentos com amostras de sangue de pacientes com P. vivax nas dependências da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

O cronograma deste projeto foi alterado, com início das atividades em novembro de 2021 e término em fevereiro de 2024.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Após vista no protocolo, constatei que todas as alterações na proposta na Carta_Emenda.pdf, postado em 28/09/2021 foram apresentadas de forma adequada nos documentos anexados na Plataforma Brasil

Recomendações:
Vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Diante do exposto, o meu parecer é pela APROVAÇÃO da Emenda (E2) versão 3 do Centro Coordenador, apresentada de forma adequada à regulamentação ética vigente definidas na Resolução n. 466 de 2012 e suas complementares

Considerações Finais a critério do CEP:
A presente EMENDA 2 - VERSÃO 3(E2 - V2) está APROVADA e os interessados ficam informados de dar continuidade em apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

Continuação do Parecer: 5.039.519

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1120802_E1.pdf	28/09/2021 17:24:55		Aceito
Folha de Rosto	8_folhaderosto_assinada.pdf	28/09/2021 17:13:37	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	3_Atividades_e_equipe_UNICAMP.pdf	28/09/2021 15:00:12	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	2_Carta_Emenda.pdf	28/09/2021 14:59:45	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	1_Carta_Justificativa_coparticipante.pdf	28/09/2021 14:59:13	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	5_Cartadeanuencia_UNICAMP.pdf	28/09/2021 14:58:42	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	7_TALE_ILUSTRADO_implementacao_atualizado.pdf	28/09/2021 14:57:24	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	6_TCLE_ILUSTRADO_implementacao_atualizado.pdf	28/09/2021 14:57:10	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	4_projeto.pdf	28/09/2021 14:56:52	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIAFMT_cep.pdf	27/03/2018 15:33:13	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

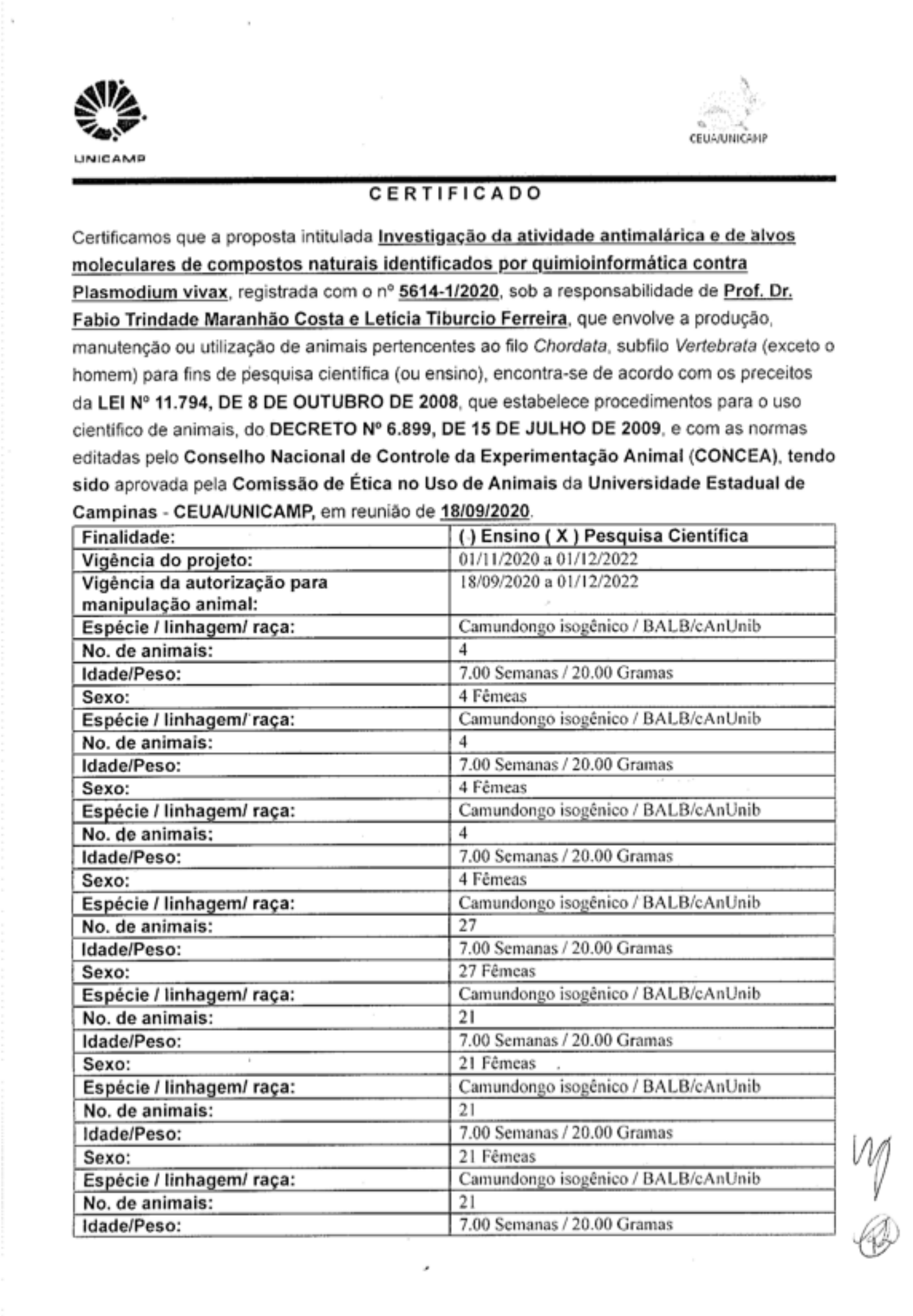
Necessita Apreciação da CONEP:
Não

MANAUS, 15 de Outubro de 2021

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA



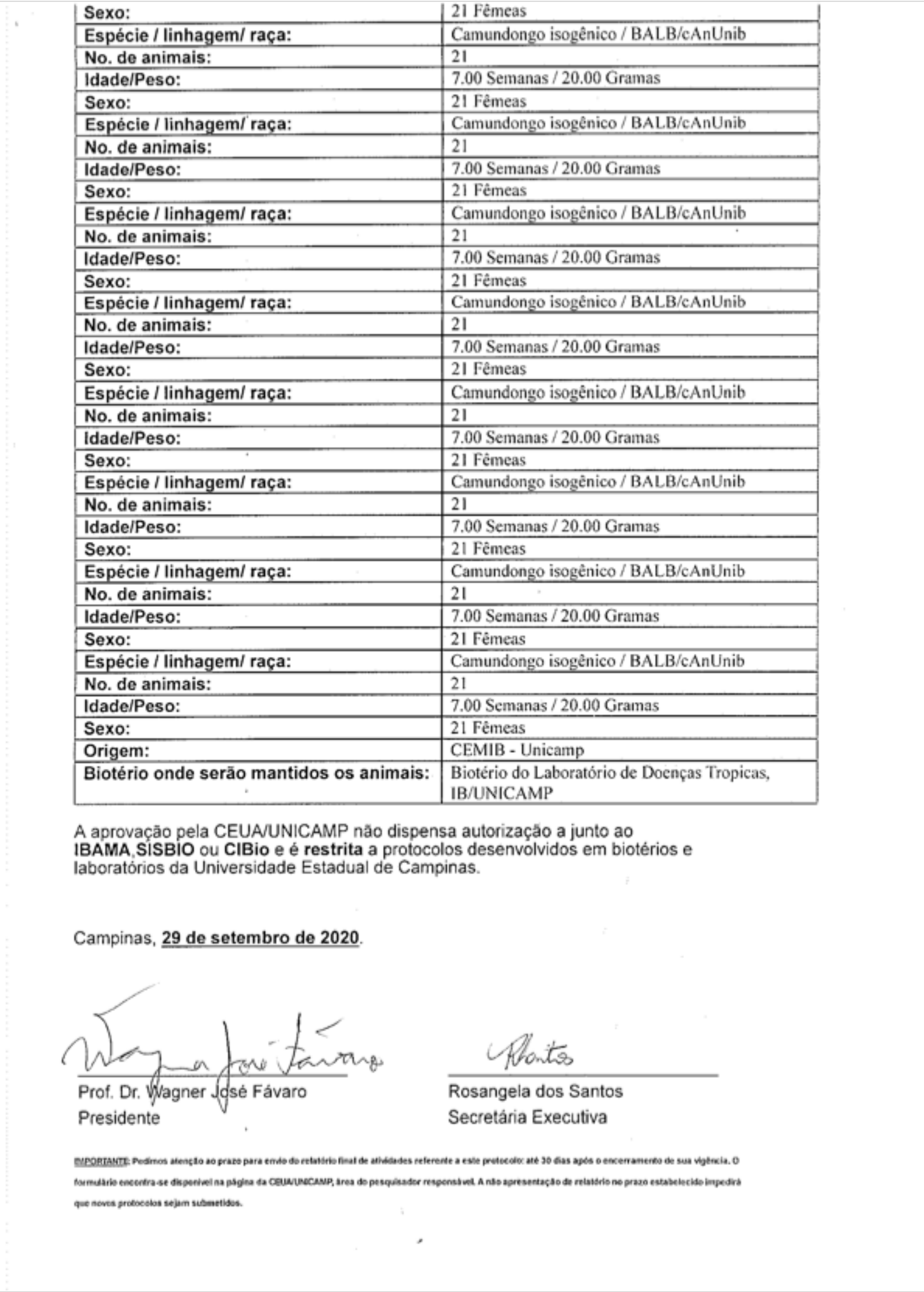
UNICAMP

CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Investigação da atividade antimalárica e de alvos moleculares de compostos naturais identificados por quimioinformática contra Plasmodium vivax**, registrada com o nº **5614-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa e Letícia Tiburcio Ferreira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal** (**CONCEA**), **tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/09/2020**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	01/11/2020 a 01/12/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/09/2020 a 01/12/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	4
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	4 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	4
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	4 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	4
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	4 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	27
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	27 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas



Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	21
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	21 Fêmeas
Origem:	CEMIB - Unicamp
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Doenças Tropicas, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**,**SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **29 de setembro de 2020**.

Wagner José Fávaro

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Inibidores multiestágio de Plasmodium spp derivados da biodiversidade: da descoberta na quimioinformática à dissecção da atividade biológica e mecanismos de resistência** , não infringem os dispositivos da Lei n.° 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de Novembro de 2023.

Assinatura : _____
Nome do(a) autor(a): **Letícia Tiburcio Ferreira**
RG n.° 14.405.465

Assinatura : _____
Nome do(a) orientador(a): **Fabio Trindade Maranhão Costa**
RG n.° 1.263.942

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Durante o período em que este doutorado foi desenvolvido, os seguintes trabalhos foram publicados:

- LIMA, M. N. N. *et al*. Integrative Multi-Kinase Approach for the Identification of Potent Antiplasmodial Hits. **Frontiers in chemistry**, 2019. doi.org/10.3389/fchem.2019.00773.

- LIMA, M. N. N. *et al*. Chalcones as a basis for computer-aided drug design: Innovative approaches to tackle malaria. **Future Medicinal Chemistry**, 2019. doi: 10.4155/fmc-2018-0255.

- FERREIRA, L. T. *et al*. Chemical Genomic Profiling Unveils the *in Vitro* and *in Vivo* Antiplasmodial Mechanism of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Polyphenols. **ACS Omega**, 2019. doi: 10.1021/acsomega.9b02127.

- FERREIRA, L. T. *et al*. Computational chemogenomics drug repositioning strategy enables the discovery of epirubicin as a new repurposed hit for *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020. doi: 10.1128/AAC.02041-19.

- FERREIRA, L. T. *et al*. QSAR-Based Virtual Screening of Natural Products Database for Identification of Potent Antimalarial Hits. **Biomolecules 2021**, 2021. doi: 10.3390/biom11030459.

- TAVELLA, T. A. *et al.* Violacein-Induced Chaperone System Collapse Underlies Multistage Antiplasmodial Activity. **ACS Infectious Diseases**, 2021. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00454.

- BORBA, J. V. V. B. *et al.* Update and elucidation of *Plasmodium* kinomes: Prioritization of kinases as potential drug targets for malaria. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2022. doi: 10.1016/j.csbj.2022.07.003.