

Potenciación del efecto antimalárico de combinaciones de cloroquina y mefloquina con acetaminofeno *in vivo* y niveles de glutatión total hepático

Potential of the antimalarial effect of combinations of chloroquine and mefloquine with acetaminophen *in vivo* and total hepatic glutathione levels

MARÍA EUGENIA ACOSTA^{A,*}, NEIRA GAMBOA DE DOMÍNGUEZ^B

Resumen

La cloroquina (CQ) y la mefloquina (MQ) ejercen su acción antimalárica mediante la inhibición de la cristalización de la hemozoina (HZ) y formación de complejos hemo-CQ o hemo-MQ, más tóxicos que el hemo libre. El glutatión (GSH) protege al parásito de los efectos oxidantes de estos complejos, participando en la degradación del hemo libre; por tanto, la combinación de CQ o MQ con fármacos consumidores del GSH, podría potenciar su efecto antimalárico. En esta investigación evaluamos el efecto antimalárico de las combinaciones de CQ o MQ con acetaminofeno (ACT), fármaco antipirético y analgésico, depletor de GSH, en ratones INH infectados con *Plasmodium berghei* así como su correlación con los niveles hepáticos de glutatión total (GSH+GSSG). Ratones infectados (10⁶ parásitos, vía i.p.), fueron tratados con dosis terapéutica de CQ o MQ (25 mg/Kg) y subterapéutica (15 mg/Kg) en combinación con el ACT (150 mg/Kg), 1 vez al día, por vía intraperitoneal, durante 5 días, en paralelo con sus respectivos controles. Tras determinar la parasitemia (día 5), los animales se sacrificaron para determinar los niveles hepáticos de GSH+GSSG. Los resultados indican que la infección por *P. berghei* incrementa significativamente los niveles de GSH+GSSG. El ACT reduce los niveles de GSH+GSSG en infectados y no infectados, y aumenta significativamente la actividad antimalárica de MQ y CQ, principalmente en combinaciones que contienen niveles subterapéuticos de CQ o MQ. Se plantea el uso de combinaciones que incluyan dosis subterapéuticas de los antimaláricos en el tratamiento de pacientes con malaria no complicada, ya que podrían contribuir al retraso en el desarrollo de la resistencia.

Palabras clave: *Plasmodium berghei*, Cloroquina, Mefloquina, Antimalárico, Hemo, Glutatión, depletors de GSH

Abstract

Chloroquine (CQ) and mefloquine (MQ) exert their antimalarial action through the inhibition of hemozoin crystallization (HZ) and hemo-CQ or hemo-MQ complexes formation, which are more toxic than free heme (FP IX). Glutathione (GSH) protects the parasite from the oxidative effects of these compounds, because it participates in the degradation of free heme; therefore, the combination of CQ or MQ with GSH-depletor drugs could enhance its antimalarial effect. In this study we evaluated the antimalarial effect of CQ or MQ combinations with acetaminophen (ACT), an antipyretic, analgesic, and GSH depletor drug, in INH mice infected with *Plasmodium berghei* as well as their correlation with hepatic levels of total glutathione (GSH + GSSG). Infected mice (10⁶ parasites, i.p.) were treated with therapeutic doses of CQ or MQ (25 mg/kg) and sub-therapeutic dose (15 mg/kg) in combination with ACT (150 mg/kg), once daily, i.p. for 5 days, in parallel with respect controls. After parasitaemia evaluation (day 5), the animals were sacrificed to estimate hepatic GSH + GSSG levels. The results indicate that *P. berghei* infection significantly increases GSH + GSSG levels. ACT reduces levels of GSH + GSSG in infected and uninfected mice, and significantly increases the antimalarial activity of MQ and CQ, mainly in combinations that contains sub-therapeutic levels of CQ or MQ. The use of combinations, which include sub-therapeutic doses of these antimalarials in the treatment of patients with uncomplicated malaria, is proposed, since they could contribute to the delay in the development of resistance.

Key words: *Plasmodium berghei*, Chloroquine, Mefloquine, Antimalarial, Heme, Glutathione, GSH-depletor

^A Cátedra de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

^B Unidad de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

* Correspondencia: Apartado Postal 40109, 1040-A, Caracas, Venezuela. mariuacosta0103@gmail.com.

Introducción

La malaria es una enfermedad infecciosa aguda y crónica, con carácter endemoepidémico distribuida en 106 países, especialmente en zonas tropicales y subtropicales. Aproximadamente 3.200 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad, con más de 240 millones de casos anuales y una estimación de 584.000 muertes al año (Brunner y col., 2012; OMS, 2015). Es causada por un protozooario del género *Plasmodium*, del cual cinco especies infectan al hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*, siendo *P. falciparum* el causante de la forma más severa de la enfermedad. Las poblaciones más susceptibles a la infección son los niños menores de 5 años y las mujeres embarazadas (Pettersen y col., 2011; Müller, 2015). En Venezuela prevalece la infección por *P. vivax* en el foco oriental y occidental, pero en el foco meridional (estados Bolívar y Amazonas), la infección por *P. falciparum* también es importante (MPPS, 2017).

A pesar de los esfuerzos de diferentes grupos de investigación, la disponibilidad de una vacuna efectiva para su prevención no se prevé en el corto plazo (Mishra y col., 2017). La erradicación de la malaria en los países industrializados y la insuficiencia de recursos para implementar los programas de intervención y control en los países endémicos, el desinterés de la industria farmacéutica para desarrollar nuevos fármacos antiparasitarios y la expansión de la resistencia de los parásitos a los antimaláricos en uso, han ocasionado que el tratamiento quimioterapéutico de la malaria humana se vea seriamente limitado. Por otra parte, el control de la transmisión es difícil por la gran diversidad de los vectores de la malaria (mosquitos del género *Anopheles*), las diferencias

en su comportamiento y el desarrollo de resistencia al DDT y otros insecticidas (Patarroyo, 2015; OMS, 2015).

La cloroquina (CQ) una 4-aminoquinolina y la mefloquina (MQ), un derivado metanólico, han sido fundamentales en la terapia antimalárica por su efectividad, siendo la CQ, durante las últimas cinco décadas, la más usada (Kouznetsov y Gómez-Barrio, 2009; Stepniewska y White, 2008).

La CQ ejerce su acción en la vacuola digestiva inhibiendo la formación de la HZ en los estadios eritrocíticos de anillo y trofozoítos (Slater y Cerami, 1992; Orjih, 1997; Gorka y col., 2013). La CQ entra en la vacuola digestiva del parásito por difusión simple, pero el pH ácido de la vacuola (pH ~ 5,2) conduce a su diprotonación, lo que impide su salida por difusión a través de la membrana. La CQ diprotonada atrapada en el interior de la vacuola inhibe la transformación del hemo (Ferroprotoporfirina IX, FP IX) en HZ, un proceso antes referido como polimerización y que hoy se describe como biocristalización de la FP IX (Slater y Cerami, 1992; Egan y col., 1994; Chou y Fitch, 1998). La acumulación de FP IX causa graves daños que producen la muerte del parásito (Goldberg, 1993). La CQ inhibe la formación de HZ iniciada por extractos de trofozoítos, interfiriendo con su ensamblaje (Slater y Cerami, 1992; Egan y col., 1994; Dorn y col., 1995). Sullivan y col. (1996) demostraron que la CQ inhibe la síntesis de HZ mediada por proteínas ricas en histidina (HRP II).

Mediante el uso de Espectroscopia Raman se evaluaron los efectos del tratamiento de CQ en cultivos de trofozoítos de *P. falciparum*. Se encontró que algunas bandas características de HZ se reducían en intensidad en las

células tratadas con CQ, atribuyéndose estos cambios a la unión intermolecular de la CQ con las unidades diméricas de FP IX a través de interacciones π - π (interacciones no covalentes entre anillos aromáticos) de porfirinas adyacentes, interrumpiendo así el agregado de HZ y reduciendo las interacciones entre grupos hemos adyacentes (Webster y col., 2008). En la búsqueda de pruebas directas que vincularan la inhibición de la formación de HZ con un aumento en la cantidad de moléculas de FP IX libres en el citoplasma de parásitos tratados con CQ, se utilizó la Difracción de Rayos X para corroborar que diferentes concentraciones de CQ y quinina eran capaces de reducir la tasa de formación de la HZ (Gildenhuis y col., 2013). Las mediciones de FP IX (III) por Microscopía Electrónica de Transmisión confirmaron el vínculo entre la caída en la formación de HZ y el aumento del FP IX (III) tóxico libre en el parásito (Combrinck y col., 2013).

Desafortunadamente, los parásitos causantes de la malaria han desarrollado resistencia a la CQ en la mayor parte del mundo (Enserink, 2010). El mecanismo de resistencia de *P. falciparum* a la CQ parece asociado a un aumento de la expulsión del fármaco desde el interior de la vacuola digestiva mediado por transportadores entre los que se incluyen el PfMDR1 (Resistencia a múltiples drogas *P. falciparum* 1) (Foley y Tilley, 1997) y el transportador PfCRT, (Transportador de Resistencia a la Cloroquina identificada en *P. falciparum*), siendo éste último el más aceptado (Paquio y col., 2009). Existe evidencia que indica que la clave de esta resistencia reside en la mutación específica de la proteína pfCRT, localizada en la vacuola digestiva del parásito que participa en el eflujo de la CQ diprotonada, evitando su acumulación en el organelo (Chinappi y col., 2010). En estudios acerca

del papel de PfCRT en la resistencia a la CQ mediante su expresión en la superficie de ovocitos de *Xenopus laevis*, se demostró que la actividad transportadora de la PfCRT para CQ protonada proveniente de cepas sensibles y resistentes a CQ, está directamente relacionada con el eflujo de la forma iónica del fármaco lo que destaca el importante papel de este transportador en la expresión de la resistencia (Martin y col., 2009), sin descartar otros posibles factores.

Al igual que la CQ, la MQ actúa principalmente sobre los estadios intraeritrocíticos del parásito (Schmidt y col., 1978; Geary y col., 1985).

Estudios ultraestructurales indican que la MQ produce cambios en la vacuola digestiva del *P. falciparum*, muy similares a los observados después del tratamiento con la CQ, con la excepción de que la MQ causa desgranulación de la HZ mientras que la CQ causa su agregación (Jacobs y col., 1987; Olliaro y col., 1989). El bloqueo de la liberación de FP mediante incubación de los cultivos de *P. falciparum* con inhibidores de proteasas antagoniza la acción de la MQ y de la CQ (Mungthin y col., 1998; Sullivan y col., 1998), hallazgos que sugieren que el mecanismo de acción de la MQ es muy similar al de la CQ. Sin embargo, aunque la evidencia indica que la MQ interactúa con la FP IX parece convincente, no está totalmente esclarecido si este es su principal modo de acción o si existe un blanco molecular diferente. La MQ inhibe la degradación peroxidativa de la FP y la degradación mediada por glutatión (GSH) con menor potencia que la CQ (Ginsburg y col., 1998; Loria y col., 1999).

La aparición de cepas de *Plasmodium* resistentes a estos antimaláricos ha limitado su uso en muchas áreas

geográficas para el control de la infección humana. Con la finalidad de retardar la expansión de la fármaco resistencia de los parásitos causantes de la malaria humana a los antimaláricos efectivos, la OMS ha recomendado el uso de combinaciones de fármacos como una estrategia útil para el control de las infecciones maláricas, la cual ha resultado exitosa en el tratamiento de otras infecciones como la tuberculosis, la lepra, el cáncer y más recientemente del VIH (OMS, 2015).

Las combinaciones entre antimaláricos (artesanato-mefloquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina, sulfadoxina-pirimetamina-cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina-amodiaquina, sulfadoxina-pirimetamina-mefloquina, atovaquona-proguanil, clorproguanil-dapsone) han sido utilizadas con éxito en distintas regiones de transmisión malárica (Kremsner y Krishna, 2004). Combinaciones entre antimaláricos y fármacos con otra indicación terapéutica (cloroquina-clorpromazina, cloroquina-clorfeniramina) se han evaluado tanto a nivel experimental como en infecciones de humanos (Kyle y col., 1993; Sowunmi y Oduola, 1997; Desgrouas y col., 2014).

La razón principal para combinar fármacos es aumentar la eficacia. Además, las combinaciones de fármacos pueden reducir la duración del tratamiento, aumentar el cumplimiento, y disminuir el riesgo de mutaciones que confieran resistencia al tratamiento por parte de los parásitos durante la terapia (Kremsner y Krishna, 2004). La farmacoresistencia en la malaria es definida como la capacidad de los parásitos de una cepa para sobrevivir o multiplicarse a pesar de la administración de un medicamento en las dosis recomendadas o superiores a las que se prescriben habitualmente, pero comprendidas entre los límites de

tolerancia. Las mutaciones que confieren resistencia se basan en una serie de mecanismos como: alteración de la permeabilidad a la membrana celular o de sus organelos para dificultar la entrada del fármaco o activando rutas metabólicas alternas (Mendoza, 2004), razón por la cual la OMS plantea la combinación de fármacos.

En cultivos de *P. falciparum* tratados con CQ y amodiaquina (AQ) en combinación con acetaminofeno (ACT) se observaron incrementos de la actividad antimalárica de ambas quinolinas, por lo que se postula un efecto potenciador del ACT sobre la actividad antimalárica de estos compuestos (Deharo y col., 2003). Esta propiedad del ACT se ha relacionado con su efecto depletor de los niveles de GSH. Asimismo, el ibuprofeno, la indometacina y el disulfirán, se señalaron como posibles potenciadores del efecto antimalárico, dado que también comparten la propiedad depletora de los niveles de GSH.

El ACT es un fármaco analgésico y antipirético perteneciente a los productos de venta libre OTC (siglas en inglés de "Over the counter", o sin prescripción médica). El uso de ACT ha sido extensivo a nivel mundial, debido a la alta incidencia de enfermedades infecciosas virales y bacterianas. Es frecuentemente prescrito como agente antipirético en forma concomitante con los antimaláricos para reducir la temperatura durante los episodios febriles asociados a la malaria (Ojiako y Nwanjo, 2006) permitiendo alcanzar el objetivo terapéutico del infectólogo como terapia de soporte en el control de la fiebre. Otros efectos del ACT se vinculan con su capacidad para reducir los niveles de GSH.

El GSH es el tripéptido γ -glutamil-L-cisteínil-glicina, el cual se encuentra

en estado reducido (GSH) y en menor proporción en su estado oxidado (GSSG). La enzima que reduce este tripéptido, la glutatión reductasa (GR), es constitutivamente activa e inducible en situaciones de estrés oxidativo. De hecho, la proporción GSH/GSSG dentro de las células se utiliza como un indicador del estado oxidativo de la célula y de la citotoxicidad. El GSH es el principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ERO), como los radicales libres y los peróxidos. Otra de sus funciones es la detoxificación de xenobióticos y agentes carcinógenos. También actúa en la modulación de la presentación de antígenos a los linfocitos, lo que influye en la producción de citoquinas y en el tipo de respuesta (celular o humoral) que se desarrolla. A su vez, aumenta la proliferación de los linfocitos, la actividad de las células T citotóxicas, las células NK, en la regulación de la apoptosis así como en la síntesis y reparación del ADN (Ginsburg y col., 1998; Hardwalt y col., 2002).

Durante la infección malarica el GSH representa un mecanismo de defensa esencial de los parásitos frente al estrés oxidativo generado tanto en el ciclo asexual eritrocítico como el hepático. En *P. falciparum*, además de sus funciones como antioxidante y como coenzima, también participa en la degradación de los grupos FP IX liberados en el metabolismo de la hemoglobina por parte del parásito (Ginsburg y col., 1998). Los primeros estudios de sistemas antioxidantes en los eritrocitos infectados con parásitos del género *Plasmodium* indicaron un incremento en el contenido de GSH en paralelo con aumentos en la carga parasitaria (Picard- Maureau y col., 1975). Los altos niveles de GSH en el parásito se han asociado con el desarrollo de

resistencia a la CQ (Ginsburg y col., 1998) mientras que los bajos niveles del tripéptido, más bien se relacionan con una mayor sensibilidad a la CQ y la AQ (Deharo y col., 2003).

El ACT es detoxificado en hígado por glucuronidación y sulfatación, pero cuando estos sistemas se saturan, el ACT se transforma en un intermediario tipo radical libre conocido como N-acetil p-benzoquinona-imina (NAPQI) y por las isoenzimas del citocromo P450 E1 y 1A2 (CYP1E1 y CYP1A2). Este metabolito es responsable del agotamiento del GSH y de la formación de complejos de inclusión covalentes con las proteínas hepáticas, con la consecuente alteración del estado redox y el consumo de GSH, a fin de revertir el estrés oxidativo producido (Mitchell y col., 1973). En consecuencia, el ACT, de una manera dependiente de la dosis, puede conducir a la depleción de los niveles de GSH.

En este trabajo evaluamos el efecto antimalárico *in vivo* de las combinaciones de CQ y MQ con el depletor de GSH, ACT, en ratones infectados con *P. berghei* y su correlación con los cambios en los niveles hepáticos de Glutatión total (GSH + GSSG)

Materiales y métodos

FÁRMACOS

La CQ fue adquirida en SIGMA-Aldrich Chemical Co. Lote. 109H1047. Las tabletas de MQ 250 mg fueron donadas por la Dirección de Salud del estado Amazonas, cuyo principio activo fue extraído y purificado por el Prof. Wilmer Guzmán, en el Laboratorio de Química Orgánica de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la UCV. El ACT fue suministrado por Laboratorio VIVAX Pharmaceuticals, Venezuela. Lote 0830394.

PREPARACIÓN DE LOS FÁRMACOS Y DOSIS

Se utilizaron las siguientes dosis subterapéuticas (DST) y terapéuticas (DT) en mg/Kg de peso: MQ (DST: 15 mg/Kg; DT: 25 mg/Kg), ACT (DT: 150 mg/Kg) y CQ (DST: 15 mg/Kg; DT: 25 mg/Kg). Se prepararon soluciones madre de CQ y de ACT en agua y de MQ en DMSO. A partir de ellas se prepararon los diferentes tratamientos diluyendo apropiadamente en el vehículo Tween 20 al 2% en solución salina.

INFECCIÓN DE RATONES

Los ratones (Cepa INH) fueron infectados por vía intraperitoneal con 1×10^6 eritrocitos parasitados con *P. berghei* (Cepa ANKA), diluidos en solución fisiológica. El curso de la

parasitemia se monitoreó a través del examen por microscopía de luz, de extendidos de sangre tomada de la cola de los animales infectados, coloreados con Giemsa.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se incluyeron 20 grupos totales con 5 ratones por grupo (**Tabla I**). Los grupos experimentales consistieron en ratones infectados y tratados con los fármacos CQ o MQ a dosis terapéutica y subterapéutica, solos o en combinación con el ACT a dosis terapéutica. Los controles consistieron de ratones no infectados y tratados de igual forma que los experimentales. También se incluyó un grupo de ratones infectado sin tratamiento farmacológico.

FORMA DE TRATAMIENTO, DETERMINACIÓN DE LA PARASITEMIA Y SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Los animales fueron tratados con 0,1 mL de las preparaciones correspondientes para cada grupo, por vía i.p., una vez al día, durante 5 días consecutivos. En el día 5° de tratamiento, se determinó la parasitemia (Peter y Robinson, 2000). Posteriormente, los ratones fueron anestesiados con éter para extraer el hígado por medio de una incisión en el abdomen. Se procedió de igual forma con los respectivos controles.

HOMOGENEIZADO DE HÍGADO

El tejido obtenido se lavó, se pesó y se homogenizó en una solución de sacarosa 0,25 M en proporción 1:5, utilizando homogeneizador con pistilo de teflón. El homogenado se filtró a través de gasa y se centrifugó a 5000 g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, alicuotizado en tubos Eppendorf, se almacenó a -20°C, hasta el momento de su utilización.

Tabla I
Diseño experimental

No.	GRUPO EXPERIMENTAL (INFECTADOS)	No.	GRUPO CONTROLES (NO INFECTADOS)	Tratamiento i.p./ día (0,1 mL)
1	E (infectado)	11	C (no infectado)	NaCl 0,9%
2	E (MQ25)	12	C (MQ25)	25 mg/Kg
3	E (MQ15)	13	C (MQ15)	15 mg/Kg
4	E (CQ25)	14	C (CQ25)	25 mg/Kg
5	E (CQ15)	15	C (CQ15)	15 mg/Kg
6	E (ACT150)	16	C (ACT150)	150 mg/Kg
7	E (MQ15 +ACT150)	17	C (MQ15 +ACT150)	15+150 mg/Kg
8	E (MQ 5 +ACT150)	18	C (MQ 25 +ACT150)	25+150 mg/Kg
9	E (CQ15 +ACT150)	19	C (CQ15 +ACT150)	15+150 mg/Kg
10	E (CQ25 +ACT150)	20	C (CQ25 +ACT150)	25+150 mg/Kg

Infectados con *Plasmodium berghei*, MQ: mefloquina, CQ: Cloroquina, ACT: acetaminofeno

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH + GSSG)

Se empleó el método descrito originalmente por Tietze (1969), en el cual el GSH reacciona con el dinitro-benceno (DTNB) formando un complejo de color amarillo que absorbe a 405 nm. La formación del complejo está acoplada a la oxidación de NADPH. Los homogeneizados de hígado se trataron con HCL 10 mM (1:5) a fin de evitar la oxidación del GSH presente en la muestra. La mezcla se sometió a 3 ciclos de congelación/descongelación y se centrifugó a 10000 g x 5 min. El sobrenadante se desproteinizó con 0,5 volúmenes de ácido-5-sulfosalicílico al 10% y se centrifugó a 1000 g x 5 min. En los pozos de una placa de 96 pozos se colocaron en el mismo orden: 20 µL de cada sobrenadante, 175 µL de una mezcla de buffer fosfato 10 mM/NADPH + H⁺ 0,2 mM, pH 7,5, 25 µL de DTNB 0,6 mM y 30 µL de buffer fosfato 10 mM. Tras agitación por 10 seg, se cuantificó la absorbancia desarrollada en un lector de placas (Microplate Reader THERMO Accent, Biorad) a 405 nm. Esta primera lectura corresponde al GSH. Tras reducir el GSSG de la muestra con la enzima Glutación reductasa (GR) y permitir su reacción con el DTNB presente, se realiza una segunda lectura que corresponde al contenido de glutatión total (GSH + GSSG). Los resultados se compararon con una curva patrón de GSH (0,02 – 200 µM) y se expresaron como µM/mg de proteínas.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó el método de Lowry y col. (1951), adaptado a microplacas de 96 pozos utilizando la albúmina sérica de bovino (BSA) como proteína estándar.

Aspectos bioéticos

Los procedimientos experimentales utilizados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Todos los experimentos se ajustaron al cumplimiento de las Buenas Prácticas para el Manejo de Animales de Laboratorio (NIH Guide, 1966).

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media ± error estándar de la media (E.E.M), donde n corresponde al número de determinaciones realizadas. Los resultados fueron analizados y graficados mediante el programa GraphPad Prism versión 4.1, aplicando la Prueba *t de student*, considerando como estadísticamente significativo todos aquellos valores con $p < 0,05$.

Resultados

EFFECTO DEL ACT SOBRE LOS NIVELES HEPÁTICOS DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH+GSSG) EN RATONES INFECTADOS CON *P. BERGHEI*

En la **Figura 1** se muestran los efectos del tratamiento de ratones no infectados (C) e infectados (E) con *P. berghei* con ACT (150 mg/Kg), sobre los niveles de glutatión total hepático (GSH+GSSG). Los mismos indican que la infección por *P. berghei* produce un incremento significativo en los niveles hepáticos de GSH+GSSG, lo cual podría representar un mecanismo compensatorio para controlar el disparo oxidativo que caracteriza a la infección. Del mismo modo, es evidente la disminución significativa de los niveles de GSH+GSSG, producido por el ACT en los animales no infectados (C) e infectados (E) tratados con ACT.

EFECTO DEL ACT Y SUS COMBINACIONES CON CQ Y MQ SOBRE LOS NIVELES HEPÁTICOS DE GLUTATIÓN TOTAL (GSH+GSSG)

En las **Figuras 2.1** y **3.1** se muestran los efectos del tratamiento de ratones controles (no infectados) con CQ y MQ y sus combinaciones con ACT sobre los niveles de GSH+GSSG hepático. Tanto la CQ como la MQ aumentan significativamente y de manera dependiente de la dosis, los niveles de este indicador sugiriendo el carácter pro-oxidantes de estos fármacos. Los tratamientos con las combinaciones de CQ25+ACT150 y CQ15+ACT150 respectivamente, conducen a una moderada reducción de los niveles hepáticos de GSH+GSSG. Los valores observados guardan relación con la concentración del pro-oxidante (CQ) presente en la combinación.

El tratamiento con la CQ sola o en combinación con el ACT redujo significativamente el nivel de GSH+GSSG de los animales infectados no tratados. Este efecto fue más pronunciado en

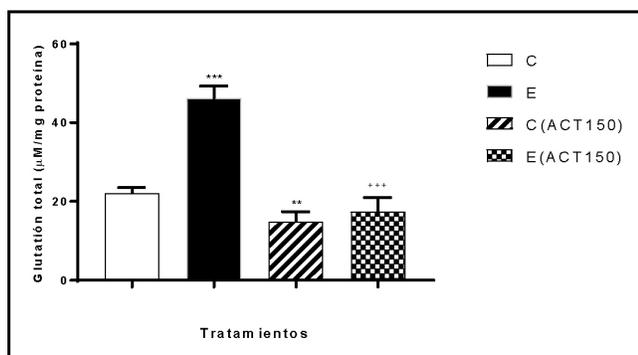


Figura 1. Efecto del acetaminofeno (ACT) sobre los niveles del glutatión total (GSH+GSSG) hepático de ratones no infectados e infectados con *Plasmodium berghei*. Los valores representan la media \pm E.E.M. y se expresan en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. $n=5$. ACT: Acetaminofeno. Dosis de ACT: 150 mg/Kg. C: Controles no infectados y no tratados; E: Infectados no tratados $**p<0,05$ comparado con el control infectado, $***p<0,01$ comparado con el control no infectado, $+++p<0,01$ con respecto al control infectado

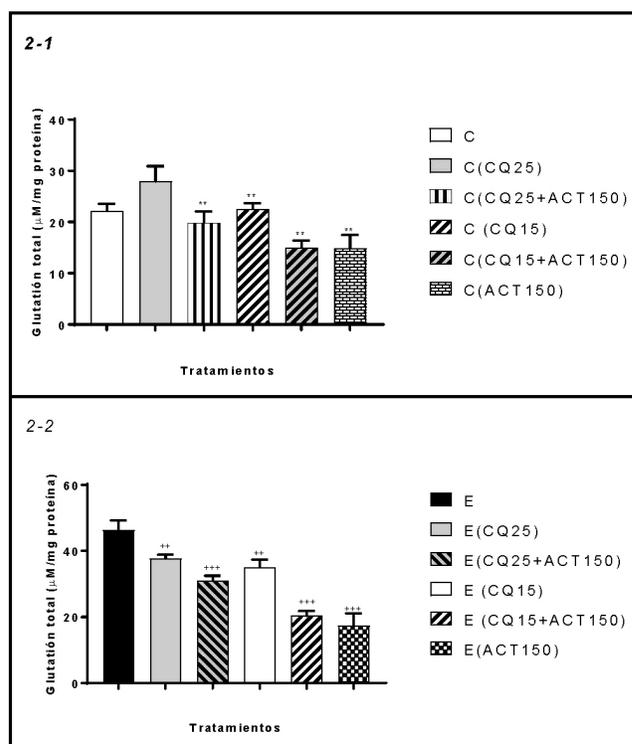


Figura 2. Efecto de la combinación CQ+ACT sobre el nivel de GSH+GSSG hepático de ratones no infectados (2-1) e infectados (2-2) con *Plasmodium berghei*. Los valores representan la media \pm E.E.M. y se expresan en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. $n=5$. ACT: Acetaminofeno. Dosis de ACT: 150 mg/Kg. C: controles no infectados y no tratados; E: Infectados no tratados. C (CQ 15+ACT 150): No infectados tratados con CQ 15 mg/Kg y ACT 150 mg/Kg; C (CQ 25+ACT 150): No infectados tratados con CQ 25 mg/Kg y ACT 150 mg/Kg; E (CQ 15+ACT 150): Infectados tratados con CQ 15 mg/Kg y ACT 150 mg/Kg; E (CQ 25+ACT 150): Infectados tratados con CQ 25 mg/Kg y ACT 150 mg/Kg. $**p<0,05$ comparado con el control no infectado, $++p<0,05$ y $+++p<0,001$ con respecto al control infectado.

el grupo tratado con CQ15+ACT150 (**Figura 2.2**). La MQ sola también redujo los altos niveles del metabolito hepático de animales infectados con *P. berghei* de una manera independiente de la dosis (**Figura 3.2**). Este efecto es más acentuado para la combinación MQ15+ACT150, la cual también reduce significativamente el nivel de GSH+GSSG hepático de los animales no infectados. Ambas quinolinas tiene un comportamiento similar en

su capacidad para normalizar los niveles de GSH+GSSG hepático de los animales infectados hacia los valores correspondientes a los controles no infectados. Sus combinaciones con el ACT incrementan este efecto.

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PARASITEMIA DE RATONES INFECTADOS CON *P. BERGHEI*, TRATADOS CON LAS COMBINACIONES DE MQ Y CQ CON ACT.

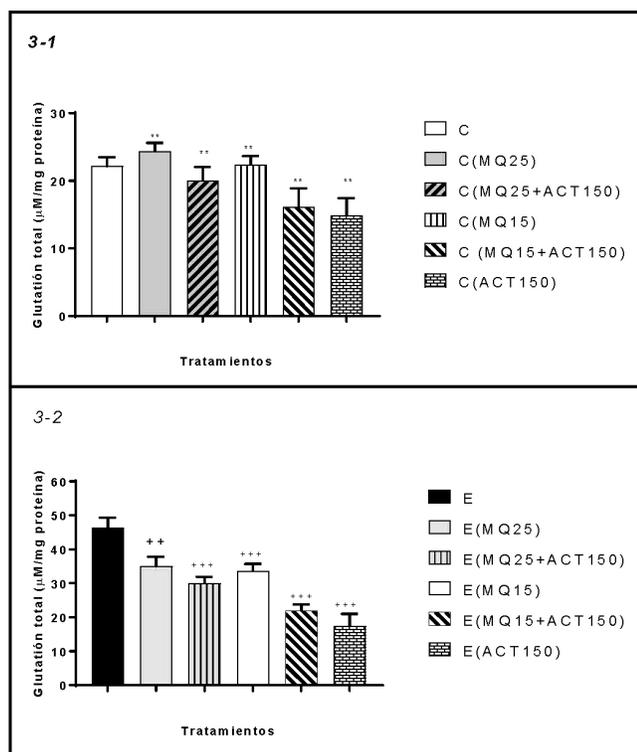


Figura 3. Efecto de la combinación MQ +ACT sobre el nivel hepático de GSH+GSSG en ratones no infectados (3-1) e infectados (3-2) con *Plasmodium berghei*. Los valores representan la media \pm E.E.M. y se expresan en μ M/mg de proteína. $n=5$. MQ: Mefloquina; ACT: Acetaminofeno. C: Controles no infectados y no tratados; E: Infectados no tratados. C (MQ 15+ACT 150): No infectados tratados con MQ 15 mg/Kg y ACT 150 mg/Kg; C (MQ 25+ACT 150): No infectados tratados con MQ 25 mg/Kg y ACT 150 mg/Kg; E (MQ 15+ACT 150): Infectados tratados con MQ 15 mg/Kg y ACT 150 mg/Kg; E (MQ 25+ACT 150): Infectados tratados con MQ 25 mg/Kg y ACT 150mg/Kg; ACT 150: ACT150 mg/Kg. ** $p<0,05$ comparado con el control no infectado, ++ $p<0,05$ y +++ $p<0,001$ con respecto al control infectado.

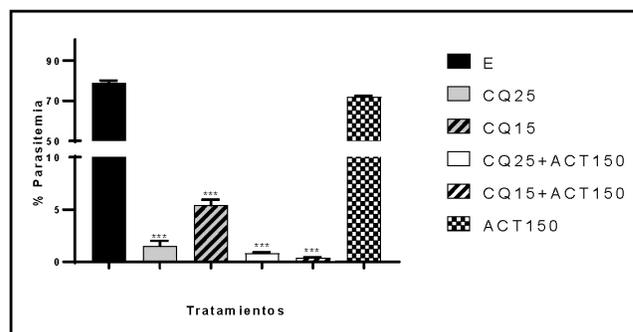


Figura 4. Efecto antimalárico al quinto día post-infección de ratones tratados con CQ+ACT. Las barras representan la media \pm E.E.M. CQ25: Cloroquina 25 mg/Kg, CQ25 +ACT150: Cloroquina 25 mg/Kg + Acetaminofeno 150 mg/Kg, CQ15: Cloroquina 15 mg/Kg, CQ15+ACT150: Cloroquina 15 mg/Kg + Acetaminofeno 150 mg/Kg *** $p<0,001$ comparado con control infectado sin tratamiento (E)

En las Figuras 4 y 5, se muestran las modificaciones de la parasitemia al quinto día postinfección de los diferentes grupos de tratamiento, respecto al grupo infectado y no tratado. Se observa que las combinaciones de CQ15+ACT150 y MQ15+ACT150 produjeron una mayor reducción ($p<0,001$) de la parasitemia que las dosis terapéutica de los antimaláricos CQ25 y MQ25. Resultados similares se observan para las combinaciones de CQ25+ACT150 y MQ25+ACT150.

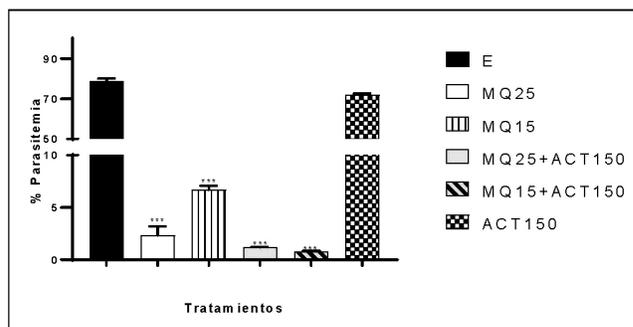


Figura 5. Efecto antimalárico al quinto día post-infección de ratones tratados con MQ+ACT. Las barras representan la media \pm E.E.M. MQ25: Mefloquina 25 mg/Kg, MQ25 +ACT150: Mefloquina 25 mg/Kg + Acetaminofeno 150 mg/Kg, MQ15: Mefloquina 15mg/Kg, MQ15+ACT150: Mefloquina15mg/Kg + Acetaminofeno 150 mg/Kg *** $p<0,001$ comparado con control infectado sin tratamiento (E)

Discusión

La CQ y la MQ, tienen en común la propiedad de inhibir el proceso de formación de HZ o pigmento malárico debido a su unión específica al grupo hemo formando los complejos Hemo-CQ o Hemo-MQ, respectivamente. Sin embargo, el parásito posee mecanismos adicionales para evitar la toxicidad de los grupos hemo no incluidos en la estructura cristalina de la HZ que implican su degradación vía H_2O_2 y/o vía GSH (Ginsburg y col., 1998; Loria y col., 1999), por tanto, la interferencia con estos procesos de degradación podría reforzar el efecto antimalárico de los inhibidores de la síntesis de la HZ. En relación a la vía degradativa de hemo dependiente de GSH, hay evidencias que permiten asociar bajos niveles del tripéptido, con una mayor sensibilidad a la CQ y la AQ (Deharo y col., 2003). Por el contrario, altos niveles de GSH en el parásito se asocian con el desarrollo de resistencia a la CQ (Ginsburg y col., 1998).

La estrategia utilizada en este trabajo consistió en limitar la disponibilidad del GSH necesario para la degradación de los grupos hemo mediante el tratamiento de los animales infectados con el *P. berghei*, adicionalmente al antimalárico CQ o MQ, con el ACT, conocido depletor de este tripéptido tiólico. Nuestros resultados indican que el ACT produce efectivamente, la reducción de los niveles de GSH+GSSG hepático en los animales no infectados e infectados y tratados con el ACT a la dosis de 150 mg/Kg (**Figura 1**). Esta disminución significativa de los niveles de GSH+GSSG, se atribuye a la conjugación del GSH con el NAPQI resultante del metabolismo del ACT por las enzimas CYP1A1 y CYP1A2. En los animales infectados el tratamiento con ACT produjo una reducción más pronunciada del nivel de GSH+GSSG. Sin

embargo, en ningún caso los niveles de los péptidos tiólicos fueron depletados completamente. La disponibilidad de esta fracción de GSH remanente garantiza un manejo adecuado del NAPQI evitando los efectos necrosantes de este metabolito tóxico del ACT, los cuales se inician una vez agotados los niveles de GSH (Hinson y col., 2010). Estudios ultraestructurales realizados en nuestro laboratorio sobre preparaciones de hígado de ratones infectados con *P. berghei* y tratados con las combinaciones de CQ y MQ con el ACT lo confirman. En los mismos se evidencia que las alteraciones producidas por la infección malárica en el hepatocito (disminución del contenido de glucógeno, presencia de gotas de lípidos en el citoplasma y cambios en las microvellosidades, las mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi) se reducen significativamente por el tratamiento con las combinaciones de CQ o MQ (15 mg/Kg) con ACT (150 mg/Kg) (Datos no mostrados). La cuantificación de los niveles de NAPQI-GSH en el tejido hepático o de los niveles de conjugados no tóxicos de cisteína y ácido mercaptúrico excretados en la orina de los animales tratados en relación a la dosis de ACT utilizada, podrían aportar evidencias adicionales al respecto.

En concordancia con lo esperado, la evaluación de los efectos antimaláricos de las combinaciones de MQ15+ACT150 y CQ15+ACT150, sugieren el efecto potenciador del ACT sobre la actividad antimalárica de la MQ y CQ, al conducir a efectos similares o mejores a los observados para la MQ25 y CQ25 sobre los parámetros de parasitemia de los ratones infectados con *P. berghei*, en correspondencia con los niveles hepáticos de GSH+GSSG más bajos encontrados (**Figuras 4 y 5**).

Deharo y col. (2003) utilizando modelos de infección murino proponen que la caída en los niveles eritrocíticos de GSH+GSSG es la responsable del aumento de la eficacia antimalárica de CQ y amodiaquina (AQ) pero no de MQ y quinina (Q) cuando se combinan con indometacina, disulfirán y ACT. La aparente discrepancia entre nuestros resultados y los reportados por Deharo y col. (2003) en relación con las combinaciones MQ+ACT podría deberse a que las dosis empleadas en el presente estudio fueron más altas para ambos fármacos. Por otra parte, debe considerarse también que el efecto reductor de los niveles de GSH+GSSG en el hígado ocurre de una manera inmediata y sostenida en contraste con la que ocurre en el eritrocito, la cual es transitoria y más tardía debido a que el NAPQI se produce a nivel hepático durante el metabolismo del ACT (Moore y col., 1985). Por otra parte, no podemos obviar la contribución de la síntesis de *novo* del GSH que realizan los parásitos intraeritrocíticos. La vía biosintética de GSH representa una fuente constante del tripéptido en el citoplasma de los parásitos, siempre y cuando los aminoácidos precursores (glutamato, cisteína y glicina) estén disponibles. La biosíntesis de GSH es de particular importancia en los eritrocitos infectados por *Plasmodium* porque estos lo utilizan rápidamente y por lo tanto tienen que reabastecerlo constantemente a través de su vía biosintética (Patzewitz y col., 2013). También se ha sugerido que la absorción de GSH puede contribuir a sostener los niveles de GSH (Raj y col., 2009).

El metabolismo del GSH de eritrocitos infectados con *Plasmodium* ha sido el foco de una serie de estudios que han revelado su papel en el mecanismo de defensa esencial de los parásitos frente al estrés oxidativo generado en el tejido hepático y en los eritrocitos durante la

infección (Rodrigues y Gamboa, 2009; Rodrigues y Gamboa, 2012).

El efecto antimalárico observado con las combinaciones de CQ y MQ con el ACT, también podría relacionarse con la activación metabólica del ACT la cual conlleva a un incremento de la síntesis de peroxinitrito a partir de óxido nítrico y radical superóxido, dada la sensibilidad de *Plasmodium* a este compuesto (Clark y Rockett, 1996; Hinson y col., 1998).

La infección por *Plasmodium* en modelos animales compromete diversas vías de detoxificación del ACT (Manson y col., 1991; Kokwaro y col., 1993). Sin embargo, se ha encontrado que en los pacientes infectados con *Plasmodium falciparum* tratados con el ACT para reducir la fiebre asociada a la enfermedad, no se afecta el metabolismo ni la excreción de la droga (Ismail y col., 1995; Wilairatana, 1995).

La reducción observada en los niveles de GSH+GSSG hepático de los animales infectados producidas por los antimaláricos CQ y MQ, específicamente a dosis subterapéutica, podría explicarse en base a su capacidad para reducir la parasitemia y controlar la infección. La intensificación del efecto de ambas quinolinas por sus combinaciones con el ACT150, se corresponden con la mayor eficacia antimalárica observada para las combinaciones CQ15+ACT150 y MQ15+ACT150. Estos resultados sugieren efectos antimaláricos aditivos o sinérgicos.

La reducción de las dosis de CQ, podrían influir en la tasa de mutación de los parásitos a esta quinolina, debido a que en relación con las dosis, la biomasa parasitaria expuesta es menor. Por su baja toxicidad, solubilidad en agua,

farmacocinética y bajo costo, se ha tratado de prolongar su uso en base a estrategias, entre las cuales la combinación con acetaminofeno, pudiera ser apropiada (Faye y col., 2007).

Conclusión

Los resultados demuestran que el ACT puede ser usado para potenciar la acción antimalárica de CQ y MQ *in vivo*, un indicativo de que estas combinaciones a dosis subterapéuticas de los antimaláricos podrían servir como tratamiento de primera línea para tratar pacientes infectados con malaria que sean sensibles a CQ o MQ, lo que podría retardar la aparición de la resistencia a estos antimaláricos en esa área geográfica.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dirección de Salud del estado Amazonas por la donación de las tabletas de MQ 250mg y a Laboratorios VIVAX Pharmaceuticals por la donación de Acetaminofeno (ACT). Agradecemos al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) por el financiamiento del Proyecto CDCHPG-06-8821-2013 /1/2.

Referencias bibliográficas

Brunner R, Aissaoui H, Boss Ch, Bozdech Z, Brun R, Corminboeuf O. 2012. Identification of a new chemical class of antimalarials. *J Infect Dis* 206: 735–743.

Clark IA, Rockett KA .1996. Nitric oxide and parasitic disease. *Adv Parasitol* 37: 37–56.

Combrinck JM, Mabothe TE, Ncokazi KK, Ambele MA, Taylor D, Smith PJ, Hoppe HC, Egan TJ. 2013. Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. *ACS Chem Biol* 8: 133–137.

Chinappi M, Via A, Marcatili P, Tramontano A. 2010. On the mechanism of

chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* 5: e14064.

- Chou AC, Fitch CD. 1998. Heme polymerase: modulation by chloroquine treatment of a rodent malaria. *Life Sci* 51: 2073–2078.
- Deharo E, Barhkan D, Krugliak M, Golenser J, Ginsburg H. 2003. Potentiation of the malarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathione levels. *Biochem Pharmacol* 66: 809–817.
- Desgrouas C, Dormoi J, Chapus C, Ollivier E, Parzy D, Taudon N. 2014. *In vitro* and *in vivo* combination of cepharanthine with anti-malarial drugs. *Malar J* 13:90. doi: 10.1186/1475-2875-13-90.
- Dorn A, Stoffel R, Matile H, Bubendorf A, Ridley RG. 1995. Malarial haemozoin/betahaematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* 374: 269–271.
- Egan TJ, Ross DC, Adams PA. 1994. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment) *FEBS Lett* 352: 54–57.
- Enserink M. 2010. Malaria's drug miracle in danger. *Science* 328: 844–846.
- Faye B, Ndiaye D, Ndiaye J, Dieng Y, Faye O. 2007. Efficacy and tolerability of four antimalarial combinations in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* in Senegal. *Malar J* 80: 1–9.
- Foley M, Tilley L. 1997. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Int J Parasitol* 27:231–240.
- Geary TG, Bonanni LC, Jensen JB, Ginsburg H. 1985. Effects of combinations of quinoline-containing antimalarials on *Plasmodium falciparum* in culture. *Ann Trop Med Parasitol* 80: 285–291.
- Gildenhuis J, LeRoex T, Egan TJ, de Villiers KA. 2013. The single crystal X-ray structure of β -Hematin DMSO solvate grown in the presence of chloroquine, a β -hematin growth-rate inhibitor. *J Am Chem Soc* 135: 1037–1047.

- Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak. 1998. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem Pharmacol* 56: 1305–1313.
- Goldberg DE. 1993. Hemoglobin degradation in *Plasmodium*-infected red blood cells. *Semin Cell Biol* 4: 355–361.
- Gorka AP, Alumasa JN, Sherlach KS, Jacobs LM, Nickley KB, Brower JP, de Dios AC, Roepe PD. 2013. Cytostatic versus cytotoxic activities of chloroquine analogues and inhibition of hemozoin crystal growth. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 356–364.
- Harwalt P, Rahlfs S, Becker K. 2002. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic formation. *J Biol Chem* 249: 7130–7139.
- Hinson JA, Pike SL, Pumford NR, Mayeux PR. 1998. Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem Res Toxicol* 11: 604–607.
- Hinson JA, Roberts DW, James LP. 2010. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol* 196: 369–405.
- Ismail S, Na BK, Karbwang J, Back DJ, Edwards G. 1995. Paracetamol disposition in Thai patients during and after treatment of *falciparum* malaria. *Eur J Clin Pharmacol* 48: 65–69.
- Jacobs GH, Aikawa M, Milhous WK, Rabbege JR. 1987. An ultrastructural study of the effects of mefloquine on malaria parasites. *Am J Trop Med Hyg* 36: 9–14.
- Kokwaro GO, Glazier AP, Ward SA, Breckenridge AM, Edwards G. 1993. Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on phenacetin O-deethylation by rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 45: 1235–1241.
- Kouznetsov VV, Gómez-Barrio A. 2009. Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. *Eur J Med Chem* 44: 3091–3113.
- Kremsner PG, Krishna S. 2004. Antimalarial combinations. *Lancet* 364: 285–294.
- Kyle DE, Milhous WK, Rossan RN. 1993. Reversal of *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine in Panamanian Aotus monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 48: 126–133.
- Loria P, Miller S, Foley M, Tilley L. 1999. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinolone antimalarials. *Biochem J* 15: 363–370.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Manson SM, Edwards G, Roberts PJ, Ward SA. 1991. The effect of malaria infection on paracetamol disposition in rat. *Biochemical Pharmacol* 41: 1707–1711.
- Martin RE, Marchetti RV, Cowan AI, Howitt SM, Bröer S, Kirk K. 2009. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science* 325: 1680–1682.
- Mendoza DL. 2004. Malaria y la resistencia a antimaláricos. *DUAZARY* 1(2): 114–123.
- Mishra M, Mishra VK, Kashaw V, Iyer AK, Kashaw SK. 2017. Comprehensive review on various strategies for antimalarial drug discovery. *Eur J Med Chem* 125: 1300–1320.
- Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldeus P, Orrenius S. 1985. The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca⁺². *J Biol Chem* 260: 13035–13040.
- Mitchell J, Jollow D, Potter W, Gillette J, Brodie B. 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacology Exp Ther* 187: 211–217.

- MPPS (Ministerio del Poder Popular para la Salud). 2017. Boletín Epidemiológico Nro. 26.
- Müller S. 2015. Role and regulation of glutathione metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Molecules* 20: 10511–10534.
- Mungthin M, Bray PG, Ridley RG, Ward SA. 1998. Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-aminoquinolines, quinolinemethanols, and phenanthrenemethanols. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2973–297297.
- NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Guide. The National Academies Press: Washington, DC. 1996. 25: I–III.
- Ojiako OA, Nwanjo HU. 2006. Effects of co-administration of chloroquine with paracetamol or ibuprofen on renal function of rabbits. *African J Biotechnology* 8: 668–670.
- Olliaro P, Castelli F, Caligaris S, Druilhe P, Carosi G. 1989. Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* "in vitro". II. Morphological patterns of different quinolines effects. *Microbiologica* 12: 15–28.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016–2030. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186671/1/9789243564999_spa.pdf
- Orjih AU. 1997. Heme polymerase activity and the stage specificity of antimalarial action of chloroquine. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 108–112.
- Paguio MF, Cabrera M, Roepe PD. 2009. Chloroquine transport in *Plasmodium falciparum*. 2. Analysis of PfCRT-mediated drug transport using proteoliposomes and a fluorescent chloroquine probe. *Biochemistry* 48(40): 9482–9491.
- Patarroyo M. 2015. Desarrollo de una vacuna contra *Plasmodium vivax*. *Innovaciencia* 3: 1–4.
- Patzewitz EM, Salcedo-Sora, JE, Wong E, Sethia S, Stocks PA, Maughan, SC, Murray JMH, Krishna S, Bray PG, Ward SA, Muller S. 2013. Glutathione transport: a new role for PfCRT in chloroquine resistance. *Antioxidants Redox Signaling* 19(7): 683–695.
- Peter W, Robinson BL. Parasitic infection models. In: Handbook of animal models of infection. Eds: Zak O, Sande M. Academic Press: London. 2000. pp. 757–773.
- Petersen I, Eastman R, Lanzer M. 2011. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett* 585: 1551–1562.
- Picard-Maureau A, Hempelmann E, Krämmer G, Jackish R, Jung A. 1975. Glutathione status of *Plasmodium vinckei* parasitized erythrocytes in correlation to the intraerythrocytic development of the parasite. *Tropenmed Parasitol* 26: 405–416.
- Raj DK, Mu J, Jiang H, Kabat J, Singh S, Sullivan M, Fay MP, McCutchan TF, Su XZ. 2009. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *J Biol Chem* 284: 7687–7696.
- Rodrigues J, Gamboa de Dominguez N. 2009. Effects of dequalinium on the oxidative stress in *Plasmodium berghei* - infected erythrocytes. *Parasitol Res* 104: 1491–1496.
- Rodrigues J, Gamboa de Dominguez N. 2012. Modulation of the oxidative stress in malaria infection by clotrimazole. *Braz J Pharm Sci* 48(3): 519–528.
- Schmidt LH, Crosby R, Rasco J, Vaughan D. 1978. Antimalarial activities of the 4-quinolinemethanols WR-184,806 and WR-226, 253. *Antimicrob Agents Chemother* 14: 680–689.
- Slater AF, Cerami A. 1992. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355: 167–169.
- Sowunmi A, Oduola AM. 1997. Comparative efficacy of chloroquine/

- chlorpheniramine combination and mefloquine for the treatment of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Nigerian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 689–693.
- Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, Goldberg DE. 1996. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* 271: 219–222.
- Sullivan DJ, Matile H, Ridley RG, Goldberg DE. 1998 A common mechanisms for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *J Biol Chem* 273: 31103–31107.
- Stepniewska K, White NJ. 2008. Pharmacokinetic determinants of the window of selection for antimalarial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1589–1596.
- Tietze F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502–522.
- Webster GT, Tilley L, Deed S, McNaughton D, Wood BR. 2008. Resonance Raman spectroscopy can detect structural changes in haemozoin (malaria pigment) following incubation with chloroquine in infected erythrocytes. *FEBS Lett* 582: 1087–1092.
- Wilairatana P, Looareesuwan S, Kaojarern S, Vanijanonta S, Charoenlarp P. 1995. Gastric emptying in acute uncomplicated *falciparum* malaria. *J Trop Med Hyg* 98(1):22–24.