

Diseño y evaluación *in silico* de nuevos antipalúdicos multitarget como alternativa terapéutica a la artemisina

ANA PAOLA GÓMEZ-RAMÍREZ, SUSANA FERNÁNDEZ-ROSAS, MARCO ANTONIO LOZA MEJIA

Resumen— El paludismo es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito *Plasmodium*. Las zonas de mayor incidencia son África, Asia y países con baja infraestructura para tratamientos preventivos, medicamentos y medidas de erradicación. Las manifestaciones asociadas a malaria son causadas principalmente por la invasión de los glóbulos rojos, ya que por medio de la sangre logran distribuirse en los órganos y dañar a otros glóbulos circundantes. El principal problema para el tratamiento de la malaria radica en que el parásito posee diferentes estadios a lo largo de su ciclo de vida. En cada uno posee diferentes enzimas que regulan su metabolismo y patogenicidad, por lo que encontrar un fármaco que pueda atacar al parásito en sus diferentes estadios, es un gran reto. En la literatura con respecto a los tratamientos, destaca la artemisina molécula que ha mostrado tener una gran eficacia en el tratamiento; su mayor limitante es que su actividad es mayor hasta la lisis del eritrocito, puesto que requiere del hierro que se libera por la destrucción del grupo hemo. Una de las formas de proponer nuevos ligandos, es a partir de la modificación analógica de ligandos con actividad conocida y la evaluación de sus potenciales propiedades farmacológicas mediante métodos *in silico* como lo son el acoplamiento molecular y las herramientas quimioinformáticas. Bajo este enfoque, se construyó una biblioteca de 78 ligandos, se evaluó la afinidad teórica por acoplamiento molecular, se determinó el perfil ADME/Tox teórico y con esto se seleccionaron los ligandos más prometedores para poder obtener una molécula más prometedor contra la malaria e incluso otras enfermedades parasitarias.

I. INTRODUCCIÓN

El paludismo se transmite al ser humano por medio de la hembra del mosquito perteneciente al género *Anopheles*; que con su picadura pasa el parásito de persona a persona [1]. Existen diferentes especies de *Plasmodium*; no obstante, las de mayor importancia clínica son *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* [2]. Siendo *P. falciparum* la más común y de mayor incidencia, así como la especie causante de la mayoría de las muertes asociadas a este padecimiento. A pesar de ser diferentes especies, sus manifestaciones clínicas y ciclo de vida es muy similar salvo algunas diferencias mínimas [1]) como la duración del ciclo de vida de la etapa asexual en *P. malariae*, que es mayor al de las otras especies o la rapidez de la proliferación del parásito, donde *P. falciparum*, muestra la mayor proliferación en el menor tiempo y presenta mayor resistencia a los antibióticos que se administran para este padecimiento [3].

Epidemiología

ANA PAOLA GÓMEZ-RAMÍREZ, SUSANA FERNÁNDEZ-ROSAS, REGINA NOEMÍ LLANO-TAMAYO, GABRIEL ALBARRÁN-VELÁSQUEZ pertenecen a la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Ciencias Químicas y realizaron el proyecto dentro del curso de Farmacología Molecular (Email: anapaola.gomezr@gmail.com).

El proyecto fue asesorado por Marco Antonio Loza Mejía

La incidencia de esta enfermedad se da en zonas con clima tropical ya que la humedad es vital para la reproducción del mosquito y los climas cálidos para la prevalencia del *Plasmodium* dentro de estos [4]. Según datos epidemiológicos hay mas de 200 millones de casos nuevos a nivel mundial cada año y se estima que cada dos minutos un infante muere por paludismo.

Ciclo de vida

El parásito tiene ciclos de desarrollo en el mosquito y en el humano (Figura 1). La fase sexual se da en el mosquito, mientras que la asexual en el humano. Su supervivencia en ambos hospederos, intra y extracelular está mediada por más de 5,000 genes, presentes según el estadio del parásito, estos codifican proteínas especializadas que permiten la invasión y evasión de respuestas inmunes del hospedero [5].

El ciclo inicia cuando la hembra del mosquito *Anopheles* ingiere sangre de alguien ya infectado. Se da un proceso llamado exfoliación del microgametocito, que da origen a los microgametos, este proceso inicia la fase sexual del parásito. Después de la fertilización del microgameto, se forma un ookinete, este se introduce en la membrana peritrófica que rodea la sangre, permitiéndole así llegar al intestino medio del mosquito, para así poder desarrollar un oocisto. Después de un período de 2 a 3 semanas (según la especie), se producen de cientos a miles de esporozoitos dentro de cada oocisto [5]. Eventualmente, la ruptura del oocisto libera esporozoitos en el sistema del mosquito, estos viajan y se acumulan en las glándulas salivales del mosquito.

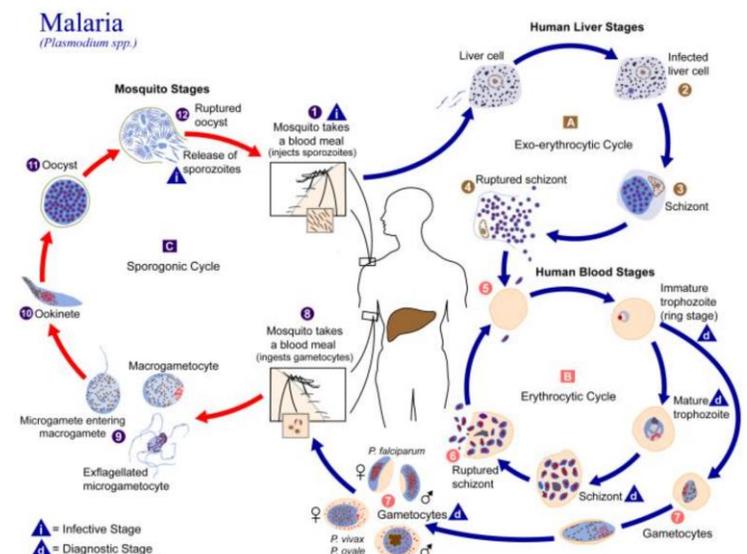


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* en ambos hospederos; humano y mosquito *Anopheles*.

Durante la alimentación del mosquito a partir de sangre estos, junto con la misma saliva de la hembra, se inyectan en las vénulas del humano mordido, esto da fin a la etapa sexual del mosquito e inicia el ciclo asexual dentro del humano. En el ser humano, después de llegar al torrente sanguíneo, los esporozoitos se introducen en unas células parenquimatosas, ya en estado intracelular el parásito madura en aproximadamente 15 días [6].

Dentro de la célula el parásito pasa a merozoito y se da una alta proliferación de estos (primera forma asexual), formando lo que se le conoce como esquizonte, los cuales, después de cierta cantidad de merozoitos sufren una ruptura y liberan su contenido. Según sea la especie es el tiempo de maduración para llegar a la lisis. Una vez liberados, estos merozoitos invaden los eritrocitos e inician el ciclo eritrocítico, igual conocido como “ring stage”.

Después de un ciclo de desarrollo en el eritrocito que dura, en promedio, 72 h, de 6 a 14 se liberan merozoitos para invadir otros eritrocitos. Lo que poco a poco va disminuyendo el número de eritrocitos, debilitando al hospedero y propiciando otras enfermedades asociadas como anemia [7].

Patología

Las manifestaciones asociadas a malaria son causadas principalmente por la invasión de los glóbulos rojos en su etapa asexual, ya que por medio de la sangre logran distribuirse en los órganos y dañar a otros glóbulos circundantes. Cuando se da por concluida la etapa de esquizonte en los eritrocitos, se da una lisis del eritrocito infectado liberando merozoitos en el torrente sanguíneo, cada uno capaz de invadir a una nueva célula. En esta lisis igual se liberan otros subproductos como hemozoina y otros componentes tóxicos como el glicosilfosfatidilinositol, que actúan como activadores de macrófagos, desencadenando secreción de citocinas y mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral, interferón E y diversas interleucinas entre ellas IL-1, IL-6, IL-8, igualmente el factor de estimulación colonial de macrófagos, linfotoxinas, superóxidos y óxidos de nitrógeno. La producción de estas citocinas es lo que explica diferentes manifestaciones clínicas de la malaria como dolor de cabeza, fiebre, náusea, vómitos, diarrea, anorexia, trombocitopenia, inmunosupresión, coagulopatías, y desequilibrios en el sistema nervioso [8].

Los síntomas más comunes de la enfermedad incluyen anemia, heces con sangre, fiebre, coma, convulsiones, ictericia. Estos son causados por la liberación de los merozoitos en el torrente sanguíneo y los subproductos de la lisis eritrocitaria, la anemia es resultante de la destrucción de glóbulos rojos y grandes cantidades de hemoglobina libre liberada en la circulación luego de la ruptura de estos [6].

El principal problema para el tratamiento de la malaria radica en que el parásito posee diferentes estadios a lo largo de su ciclo de vida. En cada uno posee diferentes enzimas que regulan su metabolismo y patogenicidad, por lo que encontrar un fármaco que pueda atacar al parásito en sus diferentes estadios, al menos ya dentro del humano es un gran reto [9].

En la literatura con respecto a los tratamientos, destaca el estudio que se ha hecho recientemente en la artemisina (Figura 2) [10], molécula que ha mostrado tener una gran eficacia en el tratamiento del parásito debido a su carácter promiscuo. Se cree que su poder radica en su activación puesto que esta forma un compuesto de tipo radicalario, formando centros reactivos de carbono al momento de que se da un clivaje del endoperóxido característico de su estructura [11].

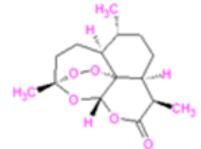


Figura 2. Estructura de Artemisina

Según estudios esta molécula interacciona con 124 blancos moleculares de las diferentes enzimas que *Plasmodium* posee en sus diversos estadios [12]. El problema con la artemisina es que su actividad es mayor hasta después de su activación, la cual se da después de la lisis del eritrocito, puesto que requiere del hierro que se libera por la destrucción del grupo hemo (Figura 3). En esta etapa el mayor daño ya está hecho que es la lisis y la salida de la hemozoina, junto otras moléculas citotóxicas. La actividad de la artemisina previa al estado eritrocítico es bastante limitada.

Nuestra propuesta es diseñar análogos donde se pudiera potencializar la actividad de la artemisina, en sus estadios previos a la lisis de los eritrocitos, disminuyendo la progresión de la enfermedad; y en medida de lo posible, ayudar a evitar algunos de los síntomas y daños producidos cuando se llega a esta etapa [13].

Como posibles blancos moleculares que se encuentran en las

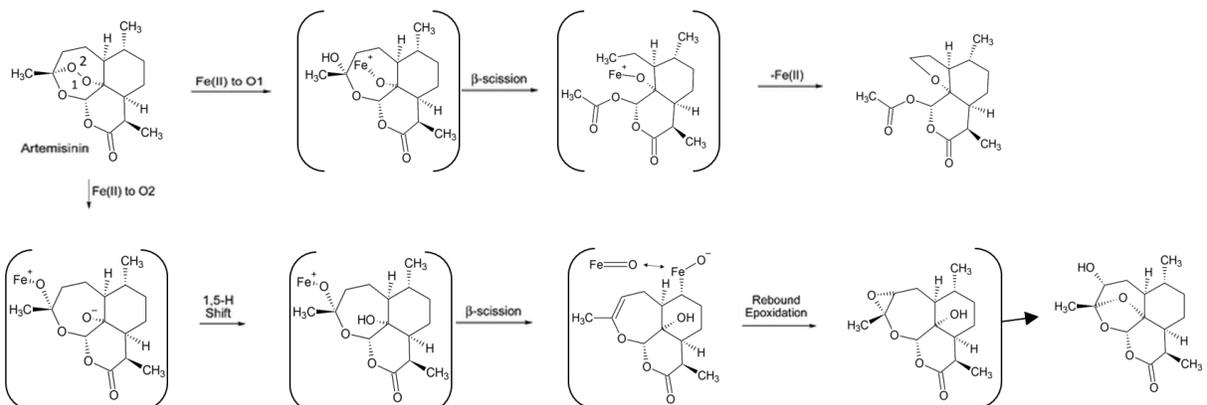


Figura 3. Posibles mecanismos de la activación de artemisina en presencia de hierro tras la hidrólisis del grupo hemo.

etapas tempranas del parásito dentro del humano se eligieron las siguientes enzimas [14].

- OAT. (Ornitina δ -aminotransferasa) Asociada al metabolismo de la ornitina y de la prolina esencial para la división mitótica [8].
- PyrK. Participa en la glucólisis y tiene actividad como piruvato cinasa [11].
- S-adenosilmetionina sintetasa (SAMS) la cual está involucrada en la biosíntesis de aminoácidos proteicos [15].

Los tres blancos moleculares propuestos están involucrados en procesos vitales de la supervivencia, proliferación y colonización por *Plasmodium*, haciéndolos blancos moleculares competentes para poder evitar la progresión de la enfermedad. Asimismo, están en diferentes etapas de la vida del patógeno, lo que permite evaluar la efectividad de la molécula a lo largo del desarrollo y no solo en una etapa tardía, esto con la intención de poder atacar al patógeno antes de llegar a la etapa eritrocítica, que es la fase crítica donde se dan los mayores daños al organismo [16] por la secreción de mediadores y productos de daño celular, junto con nuevos merozoitos.

Una de las formas de proponer nuevos ligandos, es a partir de la modificación analógica de moléculas con actividad conocida y la predicción de sus propiedades farmacológicas; mediante métodos *in silico*, como lo son el acoplamiento molecular y las herramientas quimiinformáticas. Bajo este enfoque, se construyó una biblioteca de 78 ligandos, se evaluaron en el programa Molegro Virtual Docker (para estimar la afinidad a cada proteína) y en las plataformas SwissADME y Osiris Property Explorer (para estimar las propiedades farmacocinéticas -perfil ADME- y toxicológicas, en conjunto perfil ADME/Tox).

II. METODOLOGÍA

Construcción de la biblioteca. El diseño de los nuevos ligandos partió de diversas modificaciones estructurales a la artemisina buscando preservar la porción molecular del endoperóxido, con la intención de evaluar si se podía mejorar las interacciones y afinidad ligando-receptor aun cuando está no estuviera activada por el grupo hemo. Igualmente se agregó a la colección de posibles ligandos una serie de moléculas derivadas de otras estructuras de las cuales se sabe que igual tienen cierta acción sobre estos organismos, estas moléculas; AQ13, DSM2065 y KAE609, se encuentran ya en diferentes etapas de estudios preclínicos para ser posibles alternativas de tratamiento [17]. Las moléculas se dibujaron en el programa ChemSketch, se optimizó su geometría por mecánica molecular y se guardaron en formato *.mol y se registraron los códigos SMILES.

Evaluación de la afinidad teórica por acoplamiento molecular. Los estudios de acoplamiento se realizaron en base a las estructuras cristalinas de las proteínas; ornitina delta-aminotransferasa (3LG0), S-adenosilmetionina sintetasa (2PT9) y piruvato cinasa (3KHD), las tres pertenecientes a *Plasmodium falciparum*. Todas las estructuras se descargaron del sitio web del ProteinDataBank (www.rcsb.org/pdb). Los

estudios de acoplamiento se llevaron a cabo utilizando una metodología previamente informada [18]. Brevemente, todas las moléculas de disolvente y los ligandos cocrystalizados se eliminaron de las estructuras. Los cálculos de acoplamiento molecular para todos los compuestos con cada una de las proteínas se realizaron utilizando Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 Los sitios activos de cada enzima se eligieron como sitios de unión y se delimitaron con una esfera de 15 Å centrada en el ligando cocrystalizado. Se utilizó el procedimiento estándar de software con 5000 iteraciones con 25 corridas para cada ligando. Después del acoplamiento, se seleccionó el algoritmo de puntaje de MolDock score como la afinidad de unión teórica, el cual a valores más negativos sugiere una mayor afinidad del ligando por la proteína.

Determinación del perfil ADME/Tox teórico. El perfil farmacocinético se evaluó en el portal de SwissADME (www.swissadme.com) La información suministrada fue el código SMILES de cada ligando. Este portal arroja como resultado la predicción de ciertos parámetros fisicoquímicos relacionados con la absorción oral, la permeabilidad a la pared hematoencefálica y el metabolismo por ciertas isoformas del citocromo P450. El perfil toxicológico se estimó con el portal Osiris Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>), el cual a partir de la estructura reconoce la presencia de porciones moleculares asociadas a irritabilidad y carcinogénesis.

Selección de los ligandos más prometedores.

Los criterios en los que se basó la evaluación y elección de los mejores compuestos fue Moldock score (valores menores a -120). Para cada una de las proteínas evaluadas, el promedio de los valores de Moldock Score, permeabilidad en barrera gastrointestinal (GIB) y en barrera Hematoencefálica (BBB), facilidad de síntesis química, así como las posibles alertas de toxicidad para cada una.

III. RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los resultados del estudio de acoplamiento molecular mostrando únicamente los ligandos más prometedores identificados dentro de este trabajo. Se incluye la artemisina como referencia, las estructuras se muestran en las figuras 4 y 5

Tabla 1. resultados del estudio de acoplamiento molecular.

Ligando	Moldock score			
	PyrVt	SAMS	OAT	Promedio
Artemisina	-123.94	-149.47	-104.73	
1a	-92.86	-98.48	-83.81	0.98
1b	-90.72	-94.66	-86.50	0.97
1c	-90.33	-94.14	-84.75	0.96
2a	-148.16	-149.11	-149.89	0.97
2b	-141.64	-150.47	-140.19	0.94
2c	-135.26	-151.38	-147.59	0.94

PyrVt: piruvato, SAMS: S-adenosilxxxx, OAT: ornitina aminotransferasa

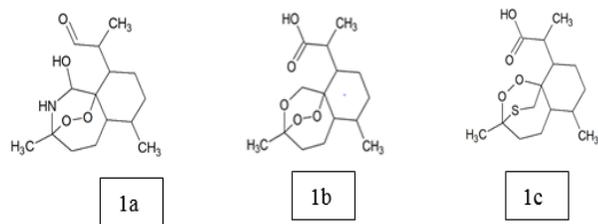


Fig. 4. Ligandos diseñados de la tabla 1 con menor valor de Moldock Score

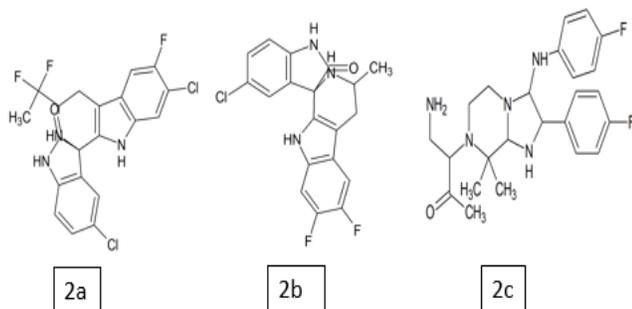
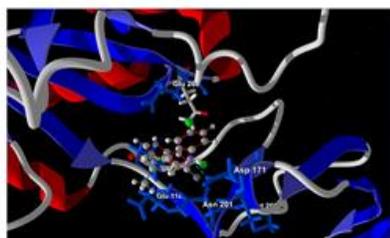
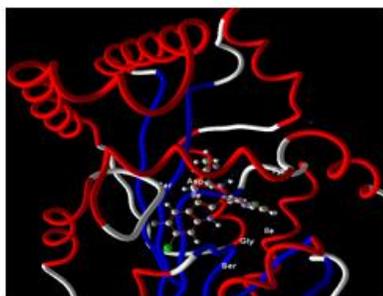


Fig. 5. Ligandos con menor valor de Moldock Score diseñados a partir de AQ13, DSM2065 y KAE609

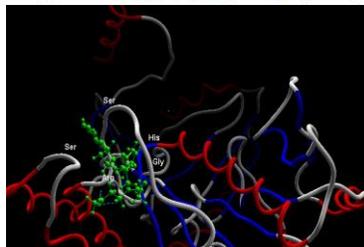
La serie de Figuras 6 muestra los complejos predichos de la molécula 2a con las dianas biológicas estudiadas.



(a)



(b)



(c)

Figuras 6. Complejos predichos de la molécula 2a con las dianas biológicas estudiadas.

(a)PyrVT; (b) SAMS; (c)OAT

La Tabla 2 muestra los resultados de la evaluación del perfil teórico ADME/Tox de los mismos ligandos de la Tabla anterior.

Tabla 2. resultados del perfil in silico adme/tox

Ligando	Moldock score		
	Absorción oral	Permeabilidad BBB	Alertas sobre la toxicidad
Artemisina	Alta	Presenta	Tumorigenico
1a	Alta	Presenta	mutagénico, tumorgénico, irritante
1b	Alta	Presenta	tumorgénico
1c	Alta	No presenta	tumorigenico
2a	Alta	Presenta	Mutagénico
2b	Alta	Presenta	Mutagénico
2c	Alta	Presenta	Reproductivo

BHE: barrera hematoencefálica

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos del acoplamiento molecular para las 78 moléculas propuestas fueron agrupados en dos categorías: Derivados de la artemisina y derivados de las otras moléculas en etapas de desarrollo (AQ13, DSM2065 y KAE 609), estas fueron comparadas entre sí, y a su vez con la Artemisina, siendo una nuestro punto de referencia. De manera muy general, se observaron dos patrones distintos. En las moléculas derivadas de artemisina, los resultados fueron similares e incluso menos favorables de lo esperado para las tres enzimas, teniendo un Moldock Score mayor que el ligando base; SAMS (-86), OAT (-82), y PyrK (-102) (Tabla 1), lo que indica que realmente las modificaciones a nivel estructural en la artemisina, tienen un mínimo efecto en la energía de unión entre ligando y proteína traducido a una menor afinidad, lo que atribuimos al hecho de que el verdadero carácter multitarget de la estructura, radica en su promiscuidad como forma radicalaria posterior a su activación, y no tanto, a los grupos funcionales adicionales que podría tener en el resto de su estructura.

Debido a esta limitante, se planteó tentativa un siguiente estudio en el que se realice modificaciones estructurales alternativas, que más allá de mejorar las interacciones y afinidad, permitan estabilizar la estructura del endoperoxido puesto que su poca estabilidad está asociada a un corto tiempo de vida media, disminuyendo la efectividad del tratamiento con esta molécula debido a los largos ciclos de vida del parásito, lo que ha comprometido su efectividad como agente antipalúdicos e incluso causando resistencia en algunos casos aislados.

No obstante, al realizar el docking molecular de las otras estructuras no derivadas de artemisina, los resultados mostraron una mayor afinidad de unión ligando-proteína con un con un Moldock Score más negativo, incluso que el de la Artemisina, con valores significativos para SAMS, Oat y PyrK de hasta -163, -149 y -148 respectivamente, contra los de artemisina de -142, -104 y -123 en el mismo orden. A pesar de que su mecanismo no es por vía radicales libres y pudieran por lo mismo tener un menor impacto como molécula

multitarget, estas mostraron tener resultados satisfactorios para las tres proteínas usadas en este estudio. Dentro de los 30 ligandos de esta clasificación, los que destacaron fueron en especial las estructuras 2a, 2b y 2c (ver tabla 1), las tres con valores de arreglo superiores al 0.96 indicativo de tener un mejor desempeño en los modelos *in silico*, en comparación con las otras moléculas.

Asimismo, al evaluar sus propiedades farmacocinéticas, sus estructuras y carácter lipofílico les permite el paso a través de la barrera gastrointestinal y hematoencefálica (ver tabla 2), que es esencial para la eficacia de éste, para que pueda pasar por membranas, permitiendo que las moléculas puedan llegar a torrente sanguíneo y por su alto volumen de distribución, sean capaces de distribuirse en tejidos y pasar las diversas barreras hasta los compartimentos celulares que es donde se encuentra de forma más común a este parásito por lo que el llegar a su blanco no sería limitante.

Estas tres estructuras a diferencia de la artemisina no requieren una activación por vía radicales y según los resultados obtenidos, tienen un buen desempeño como ligandos de las tres proteínas usadas, lo que indica su acción en diferentes etapas del ciclo de *Plasmodium*, coordinando procesos vitales de supervivencia y proliferación del patógeno. Esto es de vital importancia ya que sí pueden llegar al parásito e interactuar con sus enzimas desde etapas previas a la eritrocítica, hay la posibilidad de que el patógeno se detenido antes lo que detendría su proliferación y evitará que se desencadenaran estados críticos y daños irreversibles a la salud derivados de la lisis de los eritrocitos y la salida de compuestos citotóxicos al torrente sanguíneo. Su potencial carácter mutagénico y tumorigénico, no resulta alarmante dado que muchos antimicrobianos tienen esta característica. Por ello, es relevante el hallazgo del potencial efecto sobre blancos que se sobreexpresan, en distintas etapas del parásito, ya que se esperaba que los fármacos tuvieran efecto independientemente del estadio en el ciclo de vida de *Plasmodium*.

El planteamiento inicial del proyecto consideró el efecto sobre *Plasmodium*, pero los blancos estudiados están presentes en otros parásitos de difícil tratamiento como los de los géneros *Leishmania*, *Tripanosoma* y *Toxoplasma*, por lo que cabría la pena especular, si estas moléculas además de tener características multitarget, pudieran ser antiparasitarios de amplio espectro.

V. CONCLUSIONES

Por medio de este estudio se buscó evaluar posibles modificaciones a moléculas partiendo de estructuras con una actividad antipalúdica ya conocida y estudiada. Con el propósito de poder diseñar ligandos que pudieran tener un mejor acoplamiento que las moléculas originales, esto según los parámetros de Moldock score.

La idea inicial partió de algunas de las complicaciones que existen asociadas al tratamiento de la malaria en general, así como al uso de la artemisina como tratamiento, donde destaca la complejidad del ciclo de vida de *Plasmodium*, las variaciones enzimáticas de los diferentes estadios y la poca actividad de la Artemisina en un estado previo a la etapa

eritrocítica. Teniendo en mente estas limitantes del tratamiento fue que se buscó tener una colección de ligandos que fueran capaces de poder interactuar con las enzimas elegidas independientemente de su estado de activación o del estadio de *Plasmodium*, con el fin de poder encontrar una molécula con posible actividad antipalúdica en las diferentes etapas de la infección.

Al evaluar los resultados para las moléculas derivadas de Artemisina se llegó a la conclusión de que las modificaciones estructurales que se realizaron al endoperoxido tienen un efecto insignificante en su actividad como ligando. Sin embargo, al evaluar las estructuras derivadas de las modificaciones de las otras moléculas estudiadas los resultados fueron más prometedores.

Entre los posibles 78 ligandos diseñados, el ligando 2a mostro una mayor afinidad que la artemisina con las tres enzimas evaluadas, así como un perfil ADME, que nos indica una buena absorción, así como permeabilidad a través de membranas biológicas. Lo que lo hace un ligando de carácter multitarget y que a su vez no se ve limitado por el estado de activación de la molécula, puesto que este no es derivado de la Artemisina y no actúa vía radicales libres, logrando así el objetivo de proponer una estructura que pudiera ayudar a resolver las limitantes que existen en el tratamiento de la malaria. Asimismo, teniendo la idea de que esta misma molécula podría ser usada no solo como un posible ligando para el tratamiento de *Plasmodium*, de igual forma para otros parásitos que al igual que *Plasmodium*, dentro de su ciclo de vida poseen a las enzimas OAT, SAMS y PyrVT como reguladoras de importantes procesos metabólicos y de proliferación. Por lo tanto, un posible ligando que no solo el multitarget, de igual forma un posible multiparasitario.

REFERENCIAS

1. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood* [Internet]. 2011;117(2):381–92. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/117/2/381>
2. Ortiz-Ruiz A, Postigo M, Gil-Casanova S, Cuadrado D, Bautista JM, Rubio JM, et al. *Plasmodium* species differentiation by non-expert on-line volunteers for remote malaria field diagnosis. *Malar J* [Internet]. 2018 Jan 30;17(1):54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378588>
3. Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2012 Mar 10;4(1):e2012013–e2012013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22550559>
4. Lalremruata A, Jeyaraj S, Engleitner T, Joanny F, Lang A, Bèlard S, et al. Species and genotype diversity of *Plasmodium* in malaria patients from Gabon analysed by next generation sequencing. *Malar J* [Internet]. 2017 Oct 3;16(1):398. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28974215>
5. Lang-Unnasch N, Murphy AD. METABOLIC CHANGES OF THE MALARIA PARASITE DURING THE TRANSITION FROM THE HUMAN TO THE MOSQUITO HOST. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1998 Oct 1;52(1):561–90. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.561>
6. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE. Malaria: Mechanisms of Erythrocytic Infection and Pathological Correlates of Severe Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2007 Jan 23;2(1):217–49. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091913>

7. Molina-Cruz A, Zilversmit MM, Neafsey DE, Hartl DL, Barillas-Mury C. Mosquito Vectors and the Globalization of *Plasmodium falciparum* Malaria. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2016 Nov 23;50(1):447–65. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035211>
8. Jortzik E, Fritz-Wolf K, Sturm N, Hipp M, Rahlfs S, Becker K. Redox Regulation of *Plasmodium falciparum* Ornithine δ -Aminotransferase. *J Mol Biol* [Internet]. 2010;402(2):445–59. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283610008041>
9. Autino B, Corbett Y, Castelli F, Taramelli D. Pathogenesis of malaria in tissues and blood. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2012 [cited 2019 Jun 20];4(1):e2012061. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170190>
10. Kirchgatter K, Del Portillo HA. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2005 Sep [cited 2019 Jun 20];77(3):455–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16127552>
11. Wang J, Zhang C-J, Chia WN, Loh CCY, Li Z, Lee YM, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Dec 22 [cited 2019 Jun 20];6(1):10111. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms10111>
12. Burrows JN, Hooft van Huijsduijnen R, Möhrle JJ, Oouvray C, Wells TNC. Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malar J* [Internet]. 2013;12(1):187. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-187>
13. Guo Z. Artemisinin anti-malarial drugs in China. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2016 Mar [cited 2019 Jun 20];6(2):115–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27006895>
14. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Jul 30 [cited 2019 Jun 20];361(5):455–67. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0808859>
15. le Roux D, Burger PB, Niemand J, Grobler A, Urbán P, Fernández-Busquets X, et al. Novel S-adenosyl-L-methionine decarboxylase inhibitors as potent antiproliferative agents against intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. *Int J Parasitol Drugs drug Resist* [Internet]. 2014 Apr [cited 2019 Jun 20];4(1):28–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24596666>
16. Wrenger C, Lüersen K, Krause T, Müller S, Walter RD. The *Plasmodium falciparum* Bifunctional Ornithine Decarboxylase, S - Adenosyl-l-methionine Decarboxylase, Enables a Well Balanced Polyamine Synthesis without Domain-Domain Interaction. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Aug 10 [cited 2019 Jun 20];276(32):29651–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390378>
17. Wells TNC, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC. Malaria medicines: a glass half full? *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2015 May 22;14:424. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd4573>
18. Loza-Mejía M, Salazar J, Sánchez-Tejeda J, Loza-Mejía MA, Salazar JR, Sánchez-Tejeda JF. In Silico Studies on Compounds Derived from Calceolaria: Phenylethanoid Glycosides as Potential Multitarget Inhibitors for the Development of Pesticides. *Biomolecules* [Internet]. 2018 Oct 23 [cited 2019 Jun 20];8(4):121. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-273X/8/4/121>