ADRIANA ALEJANDRA MARIN RODRIGUEZ

Avaliação do Álcool Perílico como potencial antimalárico em *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

ADRIANA ALEJANDRA MARIN RODRIGUEZ

Avaliação do Álcool Perílico como potencial antimalárico em *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Marin Rodriguez, Adriana Alejandra.
Avaliação do álcool perílico como potencial antimalárico em *P. falciparum* e *P. berghei* / Adriana Alejandra Marin Rodriguez. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Bioquímica.

Versão do título para o inglês: Evaluation of perillyl alcohol as potential antimalarial in *P. falciparum* and *P. berghei*.

1. *Plasmodium falciparum* 2. Isoprenoides 3. Via MEP 4. *Plasmodium berghei* 5. Malária cerebral experimental 6. Isoprenilação de proteínas I. Katzin, Prof. Dr. Alejandro Miguel II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0146/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Adriana Alejandra Marin Rodriguez.

Título da Dissertação: Avaliação do álcool perílico como potencial antimalárico em *P. falciparum* e *P. berghei.*

Orientador (a): Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,considerou

( ) **Aprovado**(a) ( ) **Reprovado**(a)

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 –e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.071/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 140/09/CEUA, datado de 29.10.2009 e com vigência até 29.10.2015, por solicitação do Prof. Dr. **Alejandro Miguel Katzin** , responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Adriana Alejandra Marin Rodriguez** ao Projeto de Pesquisa *"Estudo de substâncias com potencial antimalárico em Plasmodium falciparum "in vitro"* e na malária experimental por Plasmodium berghei em camundongos", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de agosto de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

A Deus porque sempre está presente na minha vida, ao meus pais, por serem minha motivação e meu melhor exemplo de vida, a minha irmã por ser minha eterna amiga, ao meu namorado, por ser meu amor e minha companhia neste longo caminho.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin, pelo acolhimento em seu laboratorio, ensinamentos, e confiança depositada todo esse tempo.

A Emilia e Valnice, pelos ensinamentos, apoio e imensa colaboração durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao pessoal do laboratorio, Raquel, Heloisa, Rodrigo e Mario, pela amizade e convivência.

Aos professores, Silvia Uliana, Claudio Marinho e Henrique Krieger, pelas discussões e colaboração neste trabalho.

Ao Professor Leonardo Carvalho do laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz-Rio de janeiro, pela sua grande ajuda, ensinamentos e discussões durante a ultima etapa do trabalho.

Ao Professor Jackson Cioni Bittencourt e a especialista técnica, Joelcimar Martins da Silva, pela sua grande ajuda e colaboração durante a ultima etapa do trabalho.

A todo o Pessoal técnico do Departamento de Parasitologia.

Ao pessoal do Bioterio do Departamento de Parasitologia, em especial a Danielle, Luiz e Juliane, pela grande ajuda durante todo o trabalho.

Aos meus amigos do Departamento, Paola, Oneida, Eliana, Larissa, Lina, Oscar, Carolina, Brian, Flavia zimbres, Flavia lima, Erika, pela amizade, incondicionalidade e carinho.

Porfim, a minha família, pelo apoio, motivação e amor., ao meu namorado yony, pela sua incondicionalidade e amor . A Deus, porque sempre me deu força para continuar.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq),Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

"Hay un momento en que todos los obstáculos se derrumban, todos los conflictos se apartan y a uno se le ocurren cosas que no había soñado, y entonces, no hay en la vida nada mejor que escribir" G. Garcia Marquez.

RESUMO

Rodriguez AM. Avaliação do álcool perílico como potencial antimalárico em *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

No mundo a malária mata mais de um milhão de pessoas por ano, sendo uma das doenças infecciosas mais relevantes e um grande problema de saúde pública. Além disso, o surgimento de cepas resistentes aos quimioterápicos utilizados faz necessário o estudo de novos alvos para tratamentos contra esta doença. No nosso laboratório foi demonstrada a biossíntese de produtos derivados de isoprenóides, em *Plasmodium falciparum*, pela via 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Sabe-se que substâncias inibidoras da biossíntese de isoprenóides, dentre essas os terpenos, apresentam atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*. Levando em consideração o anterior, nós avaliamos o potencial antimalárico do álcool perilico (POH) em *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei.* Nossos resultados demonstraram que o POH teve efeito inibitório contra o crescimento do *P. falciparum in vitro*, nas cepas 3D7 e K1 com uma IC_{50} de 4,8 ± 0,5 μM, e 10,41±2,33 μM, respectivamente. Além disso, o POH não teve efeito tóxico na linhagem celular Vero. Ainda, Comprovamos que o POH inibiu a farnesilação de proteinas entre 20 e 37 KDa de *P. falciparum.* Por outro lado, os experimentos *in vivo* não mostraram eficácia do tratamento do POH contra PbGFP em camundongos Balb/c. Em contraste, foi demostrada a eficácia do POH na de malária cerebral experimental (MCE), em camundongos C57BL6 infectados com PbGFP, indicando uma redução na taxa de incidência da MCE no grupo tratado com POH, tendo 70% de taxa de sobrevivência no grupo tratado com POH comparado com o 30% de sobrevivência os animais não tratados ($P<0,05$). Além disso, o POH reduziu a inflamação no cérebro dos animais tratados, uma vez que teve uma redução significativa na adesão de leucócitos aos vasos cerebrais ($P<0.001$), como também, o numero de hemorragias foi menor comparados com os animais não tratados. ($P<0.0001$). Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa abrem novas alternativas no estudo do mecanismo de ação do POH como um terpeno com grande potencial para tratar MC.

Palavras-chave: Via MEP. Isoprenoides. Malaria cerebral experimental. Isoprenilação de proteinas. Álcool perílico. Via intranasal. *Plasmodium falciparum. Plasmodium berghei.*

ABSTRACT

Rodriguez AM. Evaluation of perillyl alcohol as potential antimalarial in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*. [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Malaria kills over one million people a year worldwide, and is one of the most important infectious diseases and a major public health problem. Furthermore, the emergence of resistant strains to chemotherapeutic agents used, make it necessary to study new targets for treatments against this disease. In our laboratory we have demonstrated the biosynthesis of isoprenoid-derived products in *Plasmodium falciparum*, by the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway. It is known that the substances that inhibit isoprenoid biosynthesis, among these terpenes, have antimalarial activity in vitro and in vivo. Considering this, we evaluate the antimalarial potential of PA (POH) in *P. falciparum* and *P. berghei.* Our results showed that the POH had inhibitory effect against the growth of strains 3D7 and K1 of *P. falciparum* in vitro, with an IC_{50} of 4.8 μM ± 0.5, and 10.41 ± 2.33 μM, respectively. Furthermore, the POH had no toxic effect on cell line Vero. Moreover, the POH proved that inhibited proteins farnesylation from 20 to 37 kDa of *P.falciparum.* By the other hand, in vivo experiments did not show efficacy on treatment against POH PbGFP in BALB/c mice. In contrast, the effectiveness of POH in the experimental cerebral malaria (MCE) was demonstrated in C57BL6 mice infected with PbGFP, indicating a reduction in the incidence rate of MCE in the group treated with POH, with 70% survival rate in the group treated POH compared with the 30% survival of untreated animals ($P < 0.05$). In addition, the POH reduced inflammation in the brain of treated animals, since it had a significant reduction in leukocyte adhesion to cerebral vessels ($P < 0.001$), as also the number of bleeding was lower compared to untreated animals ($P < 0.0001$). Therefore, the results obtained in this work provide new alternatives to study the POH's mechanism of action as a terpene with great potential to treat MC.

Keywords: MEP pathway. Isoprenoids. Experimental cerebral malaria. Proteins isoprenylation. Perillyl alcohol. Intranasally. *Plasmodium falciparum. Plasmodium berghei.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium*.....20
Figura 2. Países com transmissão de malaria. 21
Figura 3. Tendência do financiamento total para o controle e eliminação da malaria, 2005-2013, e falta de financiamento estimada em 2013.....22
Figura 4. Numero de casos de malaria registrados anualmente (1961-2013) no Brasil de acordo as espécies de *Plasmodium.* 23
Figura 5. Distribuição global da malária, mostrando áreas onde o *P. falciparum* é resistente às drogas antimaláricas comumente usadas, cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina. 26
Figura 6. Vias do MVA e MEP para a biossíntese de IPP e DMPP.....28
Figura 7. Diagrama da via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) de biossíntese dos isoprenoides em *P. falciparum.* 30
Figura 8. Isoprenilação de proteínas.....33
Figura 9. Estrutura do Álcool Perilico (POH) e seus metabolitos. Ácido Perílico (PA) Ácido dihidroperilico (DHPA). 34
Figura 10. Esquema representativo da malária cerebral experimental (MCE) com camundongos C57BL6 infectados com PbGFP.....45
Figura 11. Relação entre a parasitemia e fluorescência medida.....50
Figura 12. Curva de dose-resposta ao teste de POH determinado pelo ensaio de fluorescência 51
Figura 13. Porcentagens de crescimento de *Plasmodium falciparum.* 52
Figura 14. Curva de dose-resposta ao teste de POH determinado pelo ensaio do MTT. 53
Figura 15. Tratamento de *P. falciparum* em cultura *in vitro* com 3 μM POH e marcação metabólica com [^{3}H] FPP e [^{3}H] GGPP.....55
Figura 16. Curva de mortalidade de camundongos Balb/c infectados com diferentes densidades de inóculos de PbGFP após 18 dias da infecção.....57
Figura 17. Porcentagens de parasitemia e sobrevida dos animais tratados com POH e o veiculo.....58
Figura 18. Curvas de RMCBS do grupo POH e controle após 4 dias da infeção.....60
Figura 19. Porcentagem de parasitemia do grupo tratado com POH e o veiculo nos dias 4, 6, 8 e 10 após infecção.....61
Figura 20. Sobrevida dos animais tratados com POH e o veiculo.....62

Figura 21. Inibição da inflamação no cérebro dos camundongos com MCE infectados com PbGFP 8 dias após o tratamento com 500mg/kg/dia de POH. 63
Figura 22. Inibição da inflamação no cérebro dos camundongos com MCE infectados com PbGFP 8 dias após o tratamento com 500mg/kg/dia de POH. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala quantitativa rápida de comportamento e coma murino.....47
Tabela 2. IC_{50} e índice de seletividade (IS) do álcool perílico (POH) em cultura de células Vero e MCF7. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE	Barreira Hematoencefálica
CDP-ME	4- (citidina-difosfato-5) -2-C-metil-D-eritritol
CDP-MEP-2P	4-citidina-difosfato-5,-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato
CQ	Cloroquina
CSP	Proteína Circumsporozoito
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DHPA	Ácido dihidroperílico
DMAPP	Dimetilalil Pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOXP	1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato
EDTA	Acido Etilenodiaminotetracetico
FPP	Farnesil pirofosfato
FTase	Farnesiltransferase
GBM	Glioblastoma recorrente
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
GGTase-I	Geranilgeraniltransferase-tipo 1
GGTase-II	Geranilgeraniltranferase tipo II
HMG-CoA	3-hidroxi-3- metilglutaril-CoA
INL	Liberação Intranasal
IPP	Isopentenil Pirofosfato
MC	Malária Cerebral
MCM	Barreira Hematoencefálica
Me-2,4-CPP	2-C-metil-D-eritritol -2,4-ciclodifosfato
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MSP	Proteína do Merozoito
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
MVA	Àcido Mevalônico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Ácido perílico

PbGFP	*Plasmodium berghei* ANKA GFP
POH	Álcool Perílico
RMCBS	*quantitative, rapid murine coma and behavior scale*
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sulfadoxina-Pirimetamina
TRIS	Hidroximetilaminometano
TRITON-X 100	Polietilenoglicol-p-isooctifenileter

LISTA DE SÍMBOLOS

^{o}C	Grau Celsius
gr	Grama
g	Gravidade
h	Hora
i.p.	Intraperitoneal
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
Mg/mL	Miligrama por mililitro
Mg/kg	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
%	Porcentagem
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Revoluções por minuto

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 19

1.1 Malária: Aspectos gerais 19

1.2 Epidemiologia da malária 21

1.1.1 Epidemiologia da malária no Brasil 22

1.3 Medidas de prevenção e controle da malária 24

1.4 Vacinas 24

1.5 Quimioterapia e resistência aos antimaláricos em *Plasmodium falciparum* 25

1.6 Isoprenóides 27

1.6.1 Generalidades 27

1.6.1.1 Via do mevalonato: via clássica na formação dos compostos isoprênicos 27

1.6.2 Biossíntese de isoprenóides em P. falciparum 29

1.6.2.1 Terpenos: inibidores eficazes dos produtos finais da via de isoprenóides 30

1.7 Isoprenilação de proteínas 32

1.7.1 Generalidades 32

1.7.1.1 Álcool perílico: generalidades 34

1.7.1.2 Mecanismo de ação do POH: estudos em animais e in vitro 34

1.7.1.3 Estudos clínicos 35

1.7.1.4 Liberação intranasal 36

2 JUSTIFICATIVA 37

3 OBJETIVOS 39

3.1 Objetivo geral 39

3.2 Objetivos específicos 39

4 MATERIAIS E MÉTODOS 40

4.1 Cultura de *Plasmodium falciparum* 40

4.2 Padronização do método de fluorescência para contagem de parasitas usando Sybrgreen I na cultura de *Plasmodium falciparum* 40

4.3 Determinação da IC_{50} do álcool perílico em *Plasmodium falciparum* 41

4.4 Cultura de células Vero e MCF7 41

4.4.1 Determinação da toxicidade do POH em células MCF7 e Vero 42

4.5 Marcação metabólica com precursores radioativos (FPP-GGPP) 43

4.6 Animais experimentais 43

4.7 Infecção 44

4.8 Parasitemia 44

4.9 Tratamento com POH em camundongos BALB/c infectados com PbGFP 44

4.10 Tratamento com POH em camundongos C57Bl6 infectados com PbGFP 45

4.10.1 Medição dos RMCBS 46

4.10.2 Sacrifício, perfusão e histologia do cérebro dos camundongos 46

4.11 Análise estatística 48

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 49

5.1 Determinação da linearidade da fluorescência vs parasitemia 49

5.2 Inibição de crescimento de parasitas de P. falciparum (3D7 e K1) pelo álcool perílico (POH) 50

5.3 Determinação da toxicidade do POH em células MCF7 e Vero 52

5.4 Avaliação do efeito do POH na isoprenilação de proteínas em *Plasmodium falciparum*, através da marcação metabólica com precursores radioativos (FPP – GGPP). 54

5.5 Determinação da Dose letal 50 (DL_{50}) em camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA GFP (PbGFP). 56

5.6 Avaliação da Influência do álcool perilico (POH) sobre a evolução da malária não complicada nos camundongos BALB/c infectados com PbGFP. 58

5.7 Avaliação do efeito do POH por via intranasal sobre a taxa de incidência da malária cerebral experimental (MCE) em camundongos C57BL/6 infectados com PbGFP. 59

6 CONCLUSÕES 67

REFERÊNCIAS 68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: Aspectos gerais

A malária humana é uma doença parasitária que pode ter evolução rápida e grave. A doença é causada pelo protozoário do gênero Plasmodium, sendo que a transmissão natural dá-se pela picada das fêmeas dos mosquitos do gênero Anopheles (1). Cinco espécies do protozoário são descritas como agentes causadores da doença em humanos. Nas infecções por *Plasmodium vivax, Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale, e Plasmodium knowlesi,* predomina a forma não complicada da doença, caracterizada classicamente por febre intermitente (paroxismo febril), sudorese, mal estar, vômitos e intensa debilidade física.

A sintomatologia da malária é inespecífica e, primariamente, decorrente da ruptura de eritrócitos parasitados, já que nesta etapa ocorre a liberação na circulação sangüínea de antígenos constituintes do parasito e os formados em consequência de seu metabolismo, que causam uma intensa ativação do sistema imune (2). Na figura 1 mostra-se detalhadamente o ciclo de vida do *Plasmodium.*

As infecções por *Plasmodium falciparum*, a espécie mais virulenta, na ausência de um diagnóstico precoce e tratamento adequado, podem evoluir para a forma complicada, denominada malária grave. A manifestação da malária grave é dependente da idade do paciente e de uma exposição prévia ao parasito (3). Esta síndrome é caracterizada como uma doença multissistêmica capaz de causar malária cerebral (MC), entre outras complicações (4).

A malaria cerebral humana é a manifestação mais grave e principal causa de óbitos em crianças menores de cinco anos e primíparas que vivem nas áreas endêmicas, formando os principais grupos de risco. Esta síndrome apresenta uma patogênese complexa, sendo definida como uma encefalopatia difusa potencialmente reversível, cujo diagnóstico requer a presença dos seguintes critérios: 1) estado de coma; 2) exclusão de outras encefalopatias; 3) o encontro de formas assexuadas de *P. falciparum* em exame de gota espessa (3). O sequestro de eritrócitos infectados no epitélio ocasiona processos de inflamação que desencadeiam permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) do cérebro, e por sua vez alterações morfológicas, como ativação da microglia, redistribuição de astrócitos, modificações na BHE e dano neuronal (1).

Varios modelos de MC têm sido desenvolvidos em macacos, ratos e camundongos, embora nenhum destes modelos representa exatamente a síndrome humana, eles podem mostrar muitos aspectos da CM humana (5).

A grande maioria dos estudos têm-se centrado na malária cerebral murina (MCM) e em comparações entre cepas resistentes para desenvolver MCM (por exemplo, camundongos Balb/c) e susceptíveis (por exemplo, CBA, C57BL/6) (6). Cepas de *P. berghei* (ANKA [PbA] ou K173 [PBK] tem sido escolhidas por causa da sua capacidade de se sequestrar dentro da microcirculação. Camundongos sensíveis infectados com *P. berghei* desenvolvem sinais e sintomas neurológicos típicos da CM humana (por exemplo, coma), e morrem 8-10 dias após a infecção. As cepas resistentes de camundongos para desenvolver MCM que recebem a mesma dose de infecção não desenvolvem sintomas de CM, porém, morrem aproximadamente de 21 dias após infecção de anemia grave e hiperparasitemia (7).

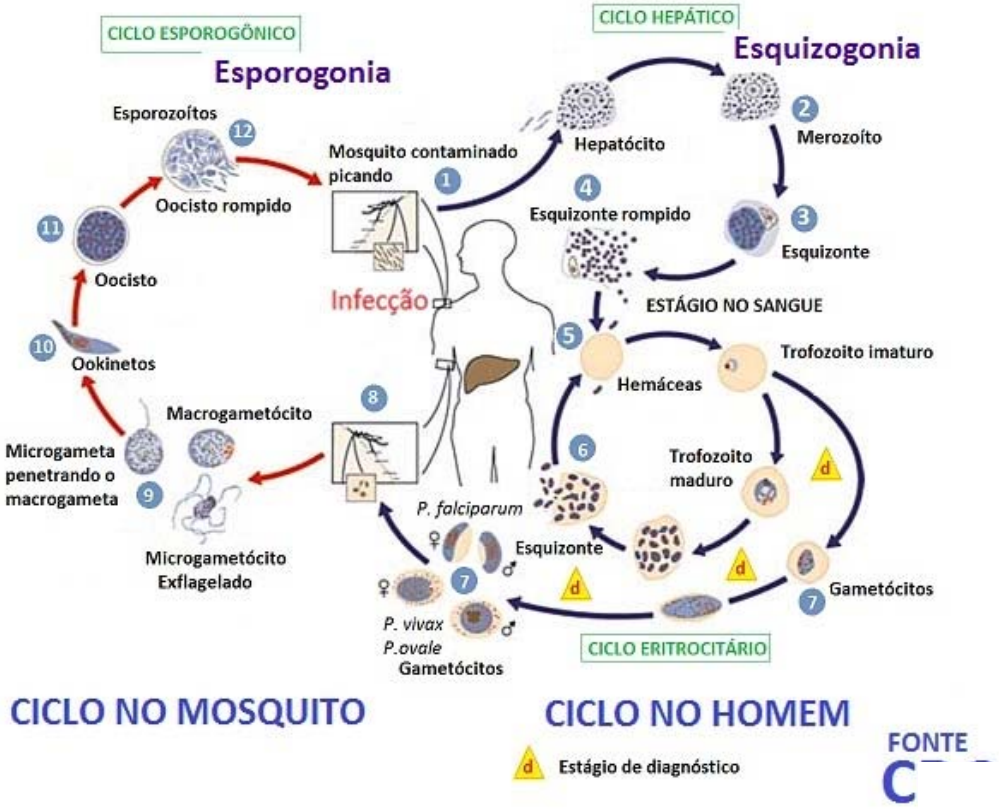

Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium.* O ciclo de vida tem duas fases, uma assexuada no hospedeiro humano (setas azuis) e uma sexuada que ocorre no vector Anopheles spp. (setas vermelhas). Durante a alimentação sanguinea, a femêa do mosquito Anopheles inocula os esporozitos no hospedeiro humano (1). Os esporozoitos infectam as celulas do fígado (2). Formando esquizontes (3). A ruptura dos hepatócitos leva a liberação dos merozoitos (4). Após a replicação no fígado, ciclo pre-eritrocitico. Os parasitas sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos, ciclo eritrocítico. Os merozoitos infectam as hemácias (5). O estagio de anel diferencia-se em trofozoito e esquizonte (6). Alguns parasitas diferenciam-se em gametocitos (7), os quais são ingeridos pelo mosquito (8). No mosquito a multiplicação é conhecida como esporogônio. No estomago do mosquito, ocorre a geração

dos zigotos (9). Os oocinetos (10) invadem a parede do estomago, onde se desenvolvem em oocistos (11). No oocisto são produzidos os esporozoítos (12) os quais, após liberados, migram até a glândula salivar, e após o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, se dá a continuidade no ciclo do parasita. Fonte: division of parasitic diseases/centers for disease control and prevention (DPDx/CDC).

1.2 Epidemiologia da malária

A malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo, especialmente na maioria dos países africanos. Ela afeta particularmente as crianças, adultos jovens envolvidos em atividades de desenvolvimento econômico, mulheres grávidas e grupos de pessoas que se movimentam em áreas endêmicas de malária (8). No mundo, estima-se que haja 3,3 mil milhões pessoas, em 97 países e territórios, em risco de contraírem a doença, e 1,2 mil milhões em risco elevado (>1 caso de malária por 1000 habitantes todos os anos) (Figura 2). (9). Além disso, a malária concentra-se nos países de baixa renda. Nesses países, as comunidades mais gravemente afetadas são as mais pobres e marginalizadas. Essas comunidades têm os riscos mais elevados associados à malaria por falta de serviços eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento. (10)

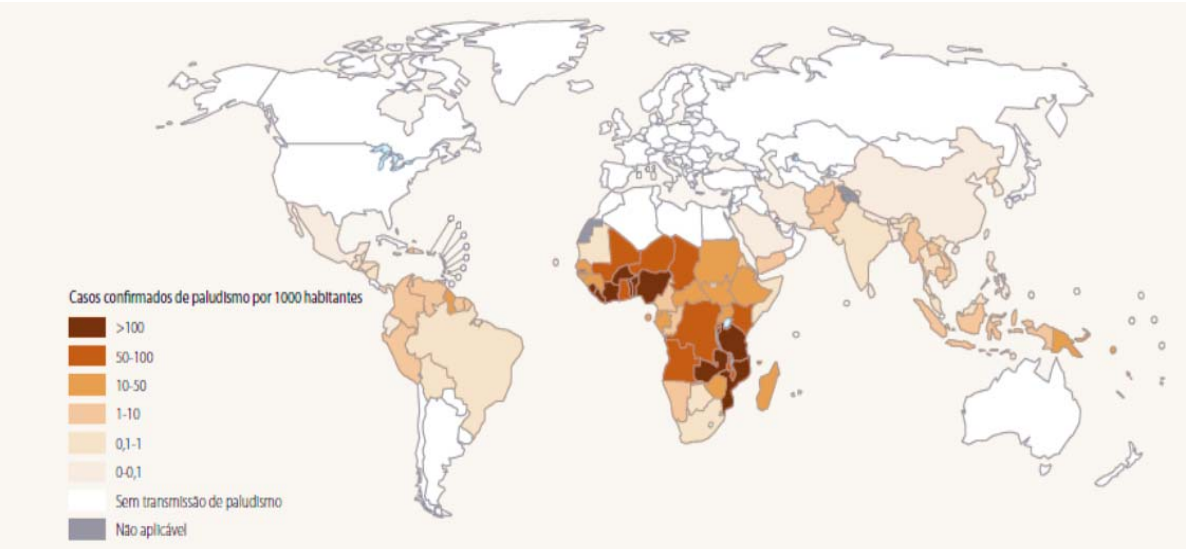

Figura 2. **Países com transmissão de malaria.** A partir do ano 2000, o financiamento e a cobertura dos programas de luta contra a malaria aumentaram consideravelmente. O resultado foi uma redução em larga escala da incidência da doença e das respectivas taxas de mortalidade. Dos 106 países com transmissão que continuam apresentando casos de malária no ano 2000, 64 estão atingindo a meta de reversão da incidência da malária fixada nos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (10). Fonte: World Health Organization. 2013.

Desses 64 países, 55 estão no bom caminho para atingirem as metas da Assembleia Mundial da Saúde que estabelecem uma redução das taxas de incidência dos casos de malaria em 75%, até 2015. Estima-se que estas taxas tenham baixado 30% a nível mundial, entre 2000 e 2013, enquanto as taxas estimadas de mortalidade caíram 47%. Em 2013, o financiamento dos programas da malária correspondia somente a 53% dos 5,1 milhões de dólares americanos estimados, necessários anualmente para se atingirem as metas mundiais (Figura 3). Há milhões de pessoas, em risco de contraírem a malária, que ainda não têm acesso à intervenções como mosquiteiros tratados com inseticida (MTI), testes de diagnóstico e tratamento com associações medicamentosas à base de artemisinina (ACT). Consequentemente, ocorrem todos os anos 198 milhões de casos (margem de incerteza: 124-283 milhões) e 584 000 óbitos (margem: 367 000-755 000). É necessário aumentar o financiamento para manter os esforços de controle da malária e para garantir que as populações mais vulneráveis tenham acesso a intervenções salva-vidas. (9).

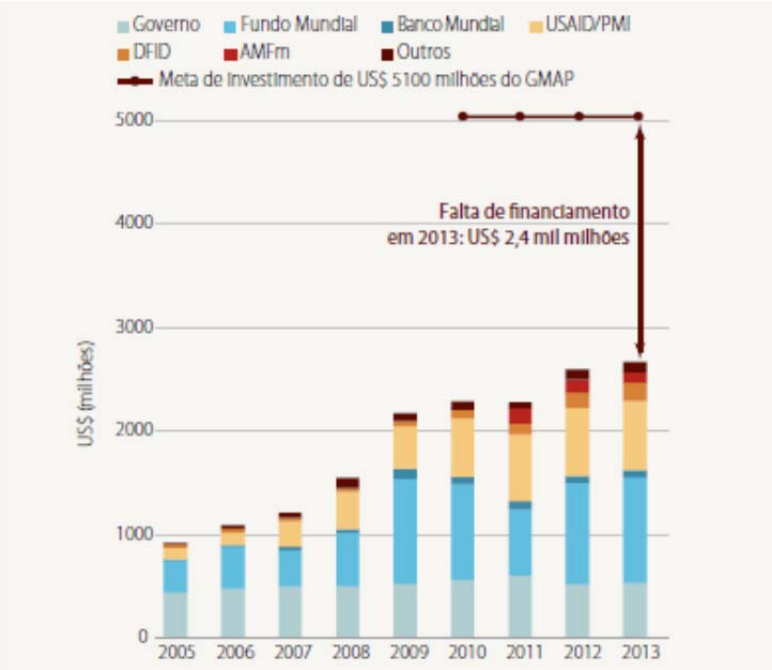

Figura 3. Tendência do financiamento total para o controle e eliminação da malaria, 2005-2013, e falta de financiamento estimada em 2013. Fonte: World Health Organization. 2013.

1.1.1 Epidemiologia da malária no Brasil

No final do século XIX, a malária estava presente em todo o território brasileiro, particularmente ao longo da costa. A situação manteve-se inalterada, sem surtos epidêmicos,

até que dois movimentos migratórios importantes ocorreram na Amazônia. Atraídos pela febre de extração do látex de borracha e a construção da ferrovia Madeira Mamoré Road, um grande número de trabalhadores sem imunidade anterior ou experiência cultural com *Plasmodium* ficaram expostos ao parasita na Amazônia, resultando em uma explosão epidêmica que causou milhares de mortes. (11). Estimou-se que foram cerca de seis milhões de casos (isto é, 15% da população total), levando a 80 mil mortes por ano no país na década de 1940. (11).

Atualmente no Brasil, cerca de 241 mil casos clínicos e 64 mortes foram registradas em 2012, a maioria deles (99,88%) na Amazônia. A malária é endêmica em nove estados, Acre, Amapá (AP), Amazonas (AM), Mato Grosso, Pará (PA), Rondônia, Roraima, Tocantins e Maranhão. PA e AM registraram quase 70% dos casos em 2012; foram 14,4% nas áreas urbanas, 25% em outras áreas de exploração de minas e o restante em assentamentos rurais e áreas indígenas. A redução gradual do número total de casos tem sido observado nos últimos cinco anos, mas houve um aumento significativo no número de casos na Amazônia brasileira, em 2012. Fora da Região Amazônica, houve 914 casos registrados em 2012, em diferentes estados brasileiros, principalmente em São Paulo (SP) (188), Rio de Janeiro (130), Minas Gerais (105), Goiás (82) e Piauí (72). (12)

Atualmente, o número de casos de malária registrados no Brasil vem caindo anualmente. Na seguinte figura se apresentam os casos desde 1961 até 2013.

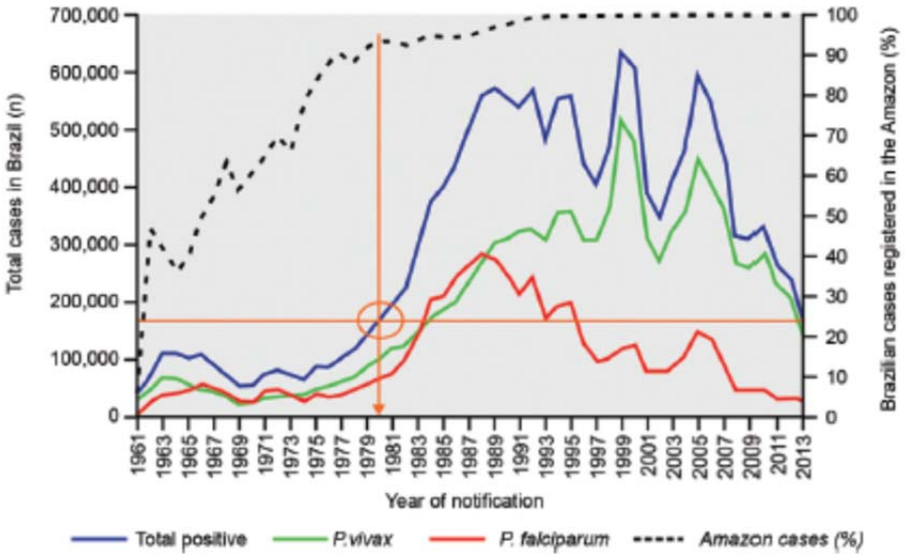

Figura 4. Numero de casos de malaria registrados anualmente (1961-2013) no Brasil de acordo as espécies de *Plasmodium*. O numero de casos aumentaram de forma constante como resultado da rápida colonização da Amazônia, chegando a mais de 573 mil casos em 1989. Dois picos foram registrados em 1999 e 2005 (em torno de 630 e 600 mil casos, respectivamente), apesar de mostrar uma tendência geral na diminuição dos casos nas duas últimas décadas. O círculo com as linhas de intersecção que mostra o número atual de casos corresponde aos valores registrados por volta de 1980,

quando a percentagem de casos registrados na Amazônia excedeu 90%. Observa-se também a proporção progressivamente decrescente de casos por *Plasmodium falciparum* desde 1988. Fonte. Pina-costa. et al (11).

1.3 Medidas de prevenção e controle da malária

Em maio de 1955, a Assembleia Mundial da Saúde aprovou a Oitava Campanha Global de Erradicação da Malária com base na utilização generalizada de diclorodifeniltricloroetano (DDT) contra mosquitos e de fármacos antimaláricos para tratar a malária. Como resultado da campanha, a malária foi erradicada em 1967 de todos os países desenvolvidos onde a doença era endêmica e, grandes áreas tropicais da Ásia e da América Latina foram liberados do risco da infecção. Apesar desse sucesso, a melhora da situação da malária não foi mantida indefinidamente, além disso, a resistência do vetor para o DDT e dos parasitas à cloroquina, um fármaco seguro e acessível, começou a afetar as atividades do programa. Uma Estratégia Global de Controle da Malária foi aprovada pela Conferência Ministerial sobre o Controle da Malária em 1992 e confirmada pela Assembleia Mundial da Saúde em 1993. Esta estratégia difere consideravelmente da abordagem usada na era de erradicação. Ela foi focada na abordagem dos cuidados primários de saúde baseados na doença ao invés de controle dos parasitas, utilizando o uso racional e seletivo de ferramentas para combater a malária. (13).

Infelizmente, há várias razões pelas quais os esforços globais de controle não são tão bem sucedidos quanto o esperado. Em muitas áreas, há uma escassez de pessoas com suficiente conhecimento para lidar com questões relacionadas à epidemiologia, planejamento global e gestão do controle. Muitas vezes, os serviços de saúde relacionados com o diagnóstico e tratamento são insuficientes, como também, a resistência aos antimaláricos, ausência de vacinas, e a falta de gestões politicas para garantir o sucesso das campanhas de erradicação (14).

1.4 Vacinas

Com o desenvolvimento da cultura *in vitro* de *P. falciparum*, técnicas de engenharia genética e outras técnicas mais recentes, e alguns avanços na produção de vacinas podem levar a uma proteção eficaz contra as infecções por *Plasmodium*. A vacina ideal contra a malária induziria respostas imunes contra todas as fases do ciclo de vida do *Plasmodium*, uma vez que diferentes e distintos mecanismos imunes operam contra as diferentes fases do ciclo

de vida. Vários alvos para vacinas incluem os estágios pre-eritrocíticos, eritrocíticos e sexuados (14).

A proteína circumsporozoito (CS), que é a proteína mais abundante presente na superfície do esporozoitos, foi o primeiro antígeno protetor identificado utilizando soro imune a partir de hospedeiros experimentais. Estudos mais recentes em camundongos transgênicos CS confirmaram que a proteína CS é o alvo para induzir respostas imunes protetoras usando esporozoítos irradiados (15). Outras tentativas de vacina tem sido desenvolvidas baseadas em antígenos recombinantes, a partir de proteínas do merozoíto de *Plasmodium,* do estagio intraeritrocítico (MSP1, MSP2). Estudos em fase I com adultos e fase I / IIb em crianças de 5-9 anos de idade foram realizados, mostrando eficácia de 62%, com essas vacinas (16). No entanto, apesar de décadas de investigação, ainda não existe uma vacina eficaz que pode ser utilizada como uma estratégia para controlar este parasita, isso devido principalmente à complexidade do ciclo de vida do *Plasmodium,* a localização intracelular, sua grande variação antigênica e a sua capacidade para evadir do sistema imune inato e adaptativo (17).

1.5 Quimioterapia e resistência aos antimaláricos em *Plasmodium falciparum*

A busca de novas drogas antimaláricas tornou-se um objetivo prioritário de pesquisa devido ao desenvolvimento da resistência do Plasmodium aos antimaláricos, outro ponto que desfavorece o controle deste parasita (18).

A cloroquina (CQ) - 4 aminoquinolina- durante muitos anos foi utilizada como a principal droga no tratamento para malária, devido à sua eficácia, baixa toxicidade e o baixo custo. A cloroquina foi sintetizada pela primeira vez na Alemanha, mas não foi reconhecida como um antimalárico potente até a década de 1940. Por volta de 1946, verificou-se ser muito superior a outros antimaláricos sintéticos contemporâneos. Contudo, a aparição da resistência à cloroquina levou ao desenvolvimento de outras drogas como a mefloquina, sulfadoxina-pirimetamina, derivados de artemisinina, e atovaquona-proguanil (Malarone). Posteriormente, a resistência também ocorreu para estas drogas mais recentes. Na China, infusões preparadas a partir de absinto (*Artemisia annua*) foram utilizadas para o tratamento da febre por muitos anos. A eficácia das infusões foi atribuída aos sesquiterpenos, tais como, a artemisinina (19).

No entanto, com os primeiros casos de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina na Ásia e na América do Sul, tornou-se o principal problema para o controle desta doença. Esta resistência também se espalhou para a África durante os anos oitenta e agora é encontrado na África Oriental. Diante disso, mais de dez países africanos mudaram o fármaco

de primeira escolha, pela sulfadoxina-pirimetamina (SP) (20). (figura 5). Além disso, cepas de *Plasmodium spp* resistentes a SP se desenvolve rapidamente quando é introduzida como monoterapia principalmente, em países que mudaram a CQ como medicamento de primeira escolha (21) (22). Na Nigéria e países da África Ocidental, CQ e SP permanecem como drogas de primeira e segunda linha contra a malária, respectivamente. No entanto, há indícios de que na última década houve um aumento da resistência à sulfadoxina-pirimetamina (23).

As áreas mais afetadas pela resistência aos antimaláricos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), são a península indo-chinesa e a região amazônica da América do Sul (24).

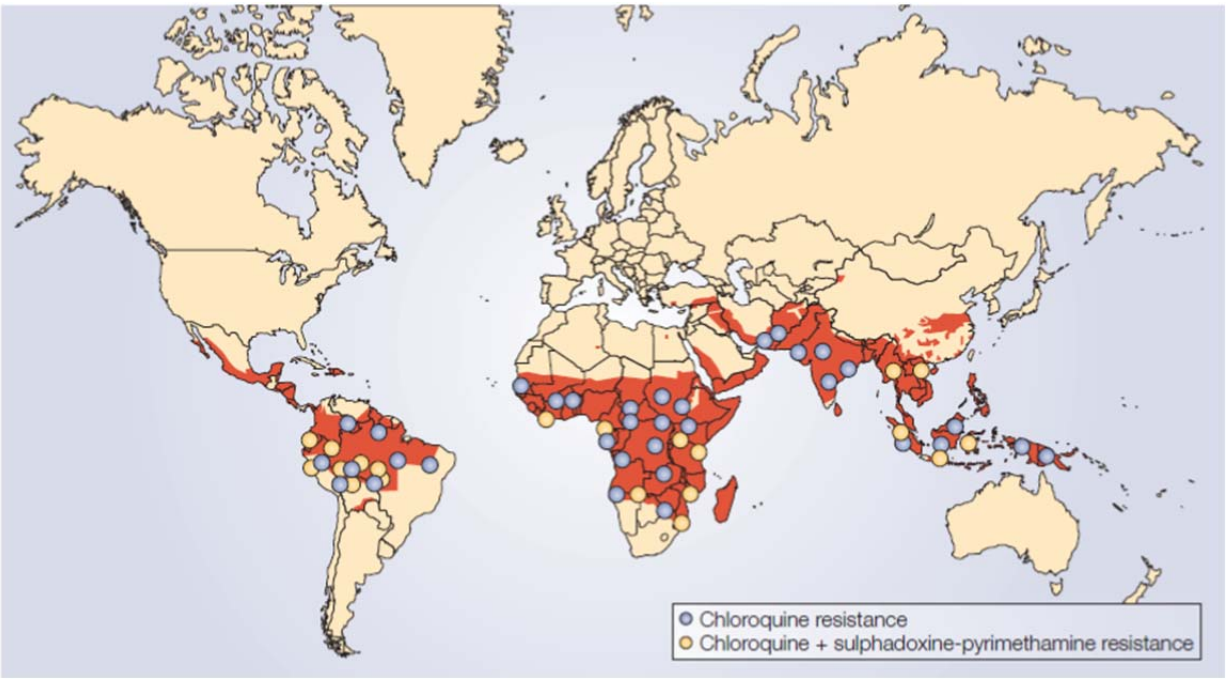

Figura 5. Distribuição global da malária, mostrando áreas onde o *P. falciparum* é resistente às drogas antimaláricas comumente usadas, cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina. A resistência é amplamente disseminada através das zonas endêmicas para malaria (áreas vermelhas). Fonte: Fidock A. et al (20).

Levando em consideração esses fatos, é necessário identificar novos alvos potenciais específicos no parasita, e uma das estratégias para o desenvolvimento de novas drogas é a identificação de vias metabólicas próprias e essenciais para a sobrevida do parasita. Portanto, uma das vias importantes para serem estudadas é a via de isoprenoides de *P. falciparum* uma vez que poderia ser essencial para a sobrevivência e desenvolvimento do parasita.

1.6 Isoprenóides

1.6.1 Generalidades

Os isoprenóides compreendem uma grande família de produtos naturais, com mais de 20.000 compostos individuais descritos na literatura (25). Vários tipos de isoprenóides (esteróides, colesterol, retinóides, carotenóides, ubiquinonas e proteínas preniladas) são componentes essenciais da maquinaria celular, participando de uma variedade de processos biológicos: os carotenóides, clorofila e plastoquinona são componentes essenciais do aparato fotossintético, a ubiquinona, menaquinona e plastoquinona são usadas como transportadores de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, as proteínas preniladas incluindo Ras e Rho GTPases, funcionam como transdutores de sinal, o dolicóis estão envolvidos em modificações pós-traducionais das proteínas, e finalmente, os dolicóis fosforilados têm um papel como portadores de oligossacarídeos na biossíntese de glicoproteínas (26).

Apesar da sua diversidade estrutural e funcional, todos os isoprenóides são derivados de um precursor comum, o pirofosfato de isopentenila (IPP) e o seu isómero, o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). O número de repetições dessas unidades, reações de ciclização, rearranjos e reações redox são responsáveis pela grande diversidade de estruturas isoprênicas (27).

1.6.1.1 Via do mevalonato: via clássica na formação dos compostos isoprênicos

Bloch e Lynen, em 1958, foram os primeiros a descrever a via do mevalonato em animais e levedura, revisto por Spurgeon e Porter em 1981. Durante várias décadas, a via do mevalonato foi considerada a única via biossintética através do IPP e DMAPP. Esta via usa sete enzimas para fornecer os precursores para a maioria dos eucariontes (todos os mamíferos) e em arqueobactérias, eubactérias, algas (exceto as clorofíceas), plantas superiores, briófitas e alguns protozoários, como *Trypanosoma sp* e *Leishmania sp* (28). Esta via começa com uma reação catalisada por uma tiolase que produz acetoacetil-CoA a partir de duas moléculas de acetil-CoA. Um terceiro acetil-CoA é então condensado com acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxi-3- metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por HMG-CoA sintase. A HMG-CoA-redutase dependente de NADPH, em seguida, converte o composto de CoA-ligado em ácido mevalónico (MVA). Em seguida, o MVA é fosforilado sequencialmente pelas difosfomevalonato quinases para formar MVA-5-difosfato. Este difosfato é subsequentemente

descarboxilado por mevalonato difosfato descarboxilase, para obter-se um conjunto de IPP, que é então convertido em DMAPP por uma isomerase. (29) (figura 5).

Outros autores demonstraram através da analise filogenética que a via do mevalonato é provavelmente a via ancestral não só em archaea e eucariotas, mas também em bactérias (30).

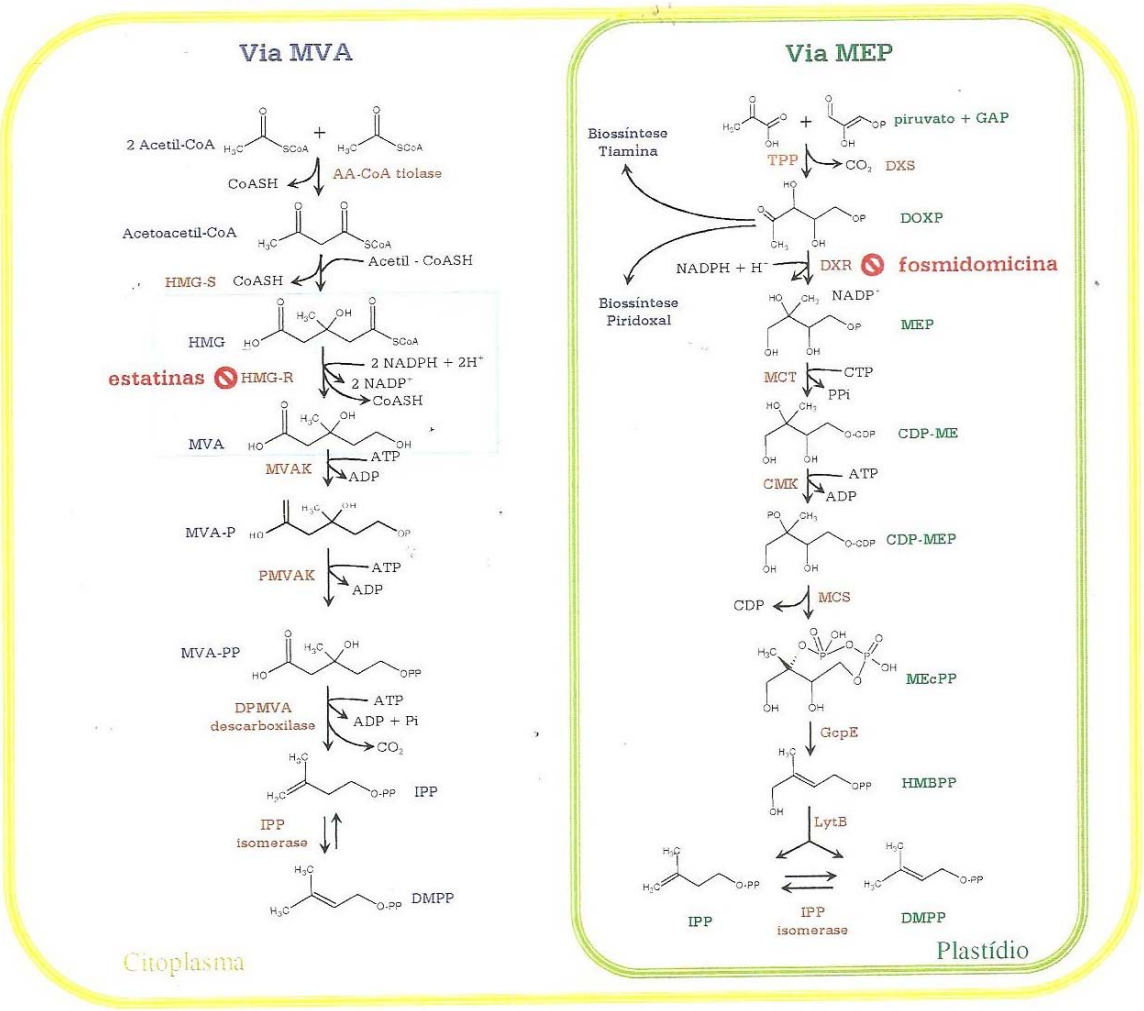

Figura 6. Vias do MVA e MEP para a biossíntese de IPP e DMPP. Em azul encontram-se os nomes de cada intermediário da via do mevalonato (MVA). Em verde encontram-se os intermediários da via MEP. Ø inibição. Fonte: Goulart H. et al (41).

1.6.1.2. Via do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP): Via alternativa na formação dos compostos isoprênicos

A via MEP foi descrita pela primeira vez em eubactérias (31), seguido por vários organismos fotossintéticos como cianobactérias (32), algas, e plantas superiores. Mais tarde, foi descrito em parasitas apicomplexa e *Mycobacterium tuberculose*. O passo inicial, catalisada pela 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP) sintase, é a formação de DOXP pela

condensação de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. O gene que codifica esta enzima foi o primeiro a ser clonado a partir de *Escherichia coli* (33). Esta enzima chave da via requer difosfato de tiamina e íons divalentes, tais como Mg 2+ ou Mn 2+ para a sua atividade. A enzima reductoisomerase DOXP catalisa o rearranjo e subsequente redução de DOXP. A atividade desta enzima é inibida por fosmidomicina.

O MEP é então convertido em 4- citidina-difosfato-5, -2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME). O próximo passo é catalisado pela enzima CDP-ME quinase e leva à fosforilação da CDP-ME. O produto desta reação, 4-citidina-difosfato-5,-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP-2P), é subsequentemente convertido em 2-C-metil-D-eritritol -2,4-ciclodifosfato (Me-2,4-CPP) pela enzima 2-C-metil-D-eritritol 2,4- ciclodifosfato sintase (figura 5). IPP e DMAPP são sintetizados através de rotas independentes nas últimas etapas da via MEP. Além disso, a via MEP produz o precursor (DOXP) para a síntese dos cofatores essenciais de difosfato de tiamina e fosfato de piridoxal (30).

1.6.2 Biossíntese de isoprenóides em P. falciparum

Desde a caracterização da síntese de isoprenóides em *Plasmodium falciparum,* pela via MEP, diversas pesquisas têm sido conduzidas, no nosso laboratório, no estudo desta via. A via MEP está localizada numa organela denominada apicoplasto, presente em parasitas do *Phillum* Apicomplexa e ausente nas células de mamíferos.(34)

O apicoplasto é um plastídeo não fotossintetizante (35), que foi inicialmente descrito em *Toxoplasma gondii* e posteriormente em *Plasmodium falciparum*. Foi demonstrado que esta organela possui função vital para esses parasitas (36). Sabe-se que a via de biossíntese de ácidos graxos, e juntamente com a via inicial da biossíntese de isoprenóides estão localizadas nesta organela(37). Estudos em nosso laboratório mostraram que o *Plasmodium falciparum* sintetiza dolicóis de 11 e 12 unidades isoprênicas, coenzima Q 7 8 -9, vitaminas K1 e K2, bem como tocoferol e proteínas isopreniladas e doliquiladas, e carotenoides (37)(38)(39)(40) (figura 6). Ainda, sobre o metabolismo do *Plasmodium*, foi demonstrado que algumas sustâncias como os terpenos, derivados de plantas, são inibidores de alguns produtos finais na via de isoprenóides de *P. falciparum* (41) (42).

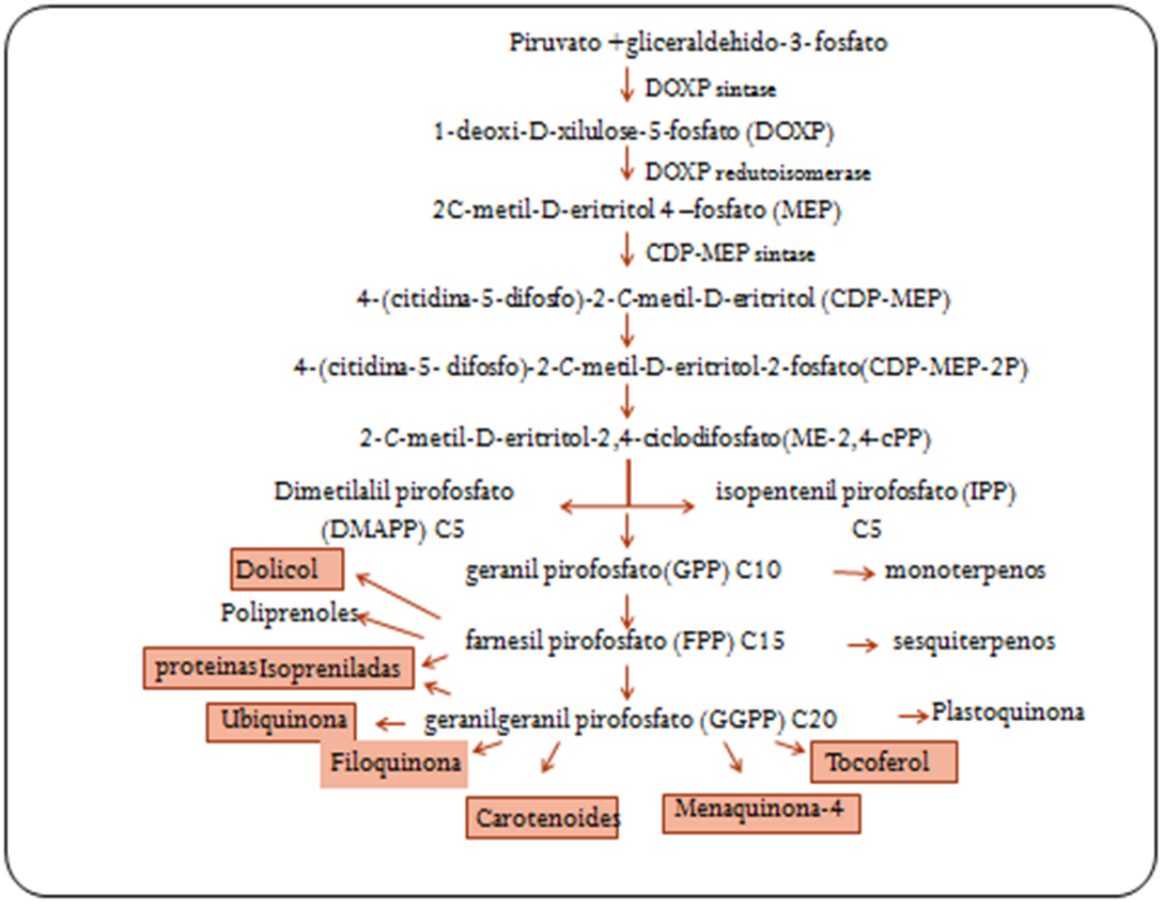

Figura 7. Diagrama da via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) de biossíntese dos isoprenoides em *P. falciparum*. Os isoprenoides são sintetizados por dois precursores, isopentenil pirofosfato e seu isômero, dimetilalil pirofosfato (DMPP). As caixas sombreadas indicam os produtos finais identificados em *P. falciparum*. Fonte: Katzin AM. et al (38).

1.6.2.1 Terpenos: inibidores eficazes dos produtos finais da via de isoprenóides

Os terpenos (ou isoprenóides, ou terpenóides) são uma grande classe de metabólitos lipofílicos secundários derivados da via do mevalonato. A maior diversidade de estruturas ocorre em plantas, sendo um componente importante do "óleo essencial", da fração do extrato vegetal (43). Esses terpenóides possuem uma grande variedade de aplicações, desde a fabricação de cosméticos como aromatizantes até em estudos microbiológicos aumentando a atividade microbicida de antibióticos em testes com *Staphylococcus* aureus (44).

Estudos anteriores no nosso laboratório mostraram que terpenos como o farnesol, nerolidol, linalol e limoneno são inibidores da biossíntese de dolicol, cadeias isoprênicas ligadas a ubiquinona e proteínas isopreniladas, em parasitas da fase eritrocítica *de P.*

falciparum. Os valores de IC_{50} *in vitro*, foram de 64 µM, 760 nM, 1,22 mM, 1mM, respectivamente.

O mecanismo de ação do nerolidol e farnesol é baseado em uma possível competição com o substrato, impedindo o alongamento das cadeias isoprênicas e bloqueando o sitio ativo da enzima octaprenil pirofosfasto sintase de *P. falciparum*, enzima responsável pela formação dos dolicóis e isoprenoides ligadas ao anel benzoquinona da coenzima Q. (41).

Por outro lado, a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), do óleo essencial extraído de Viola surinamensi,- que é uma planta com que os Índios da etnia Waiãpi costumam tratar pessoas com malária, através da inalação de vapor oriundo da infusão dela-, constatou-se a presença de 11 monoterpenos entre eles o nerolidol, 11 sesquiterpenos e três fenilpropanóides. (45). Baseados nesses resultados, o nosso laboratório começou a testar drogas, utilizando uma nova metodologia, em experimentos *in vivo,* em camundongos infectados. Trata-se de usar uma estratégia de liberação intranasal para tratar os camundongos infectados com *P. berghei*. Os resultados demonstraram que camundongos Balb/c infectados com *P. berghei* Anka, tratados com 1000 mg/kg/dia de nerolidol via oral e intranasal, tiveram uma porcentagem de inibição do crescimento do parasita >50% durante os primeiros 15 dias de tratamento em relação ao controle. A sobrevida dos animais tratados foi de 70% após 30 dias de infecção, além de não apresentar efeitos genotóxicos em linfócitos isolados de camundongos (dados não publicados). Levando em consideração esses resultados, nós concluímos que o tratamento inalatório é uma estratégia promissora para tratar malária murina, além das vantagens de ser um tratamento não invasivo e de baixo custo.

Também, outros estudos feitos no nosso laboratório demostraram que o limoneno tem um efeito inibitório na isoprenilação de proteínas da família RAS (*p*21) de *P. falciparum* as quais estão envolvidas na transdução de sinais e a regulação do crescimento e proliferação celular. (42). O limoneno, um monoterpeno amplamente distribuído em plantas, é um dos poucos compostos conhecidos que inibe a isoprenilação de proteínas e tem atividade antitumoral *in vivo* (46).

1.7 Isoprenilação de proteínas

1.7.1 Generalidades

A prenilação de proteínas foi descoberta pela primeira vez em fungos em 1978 (47), e quase 10 anos mais tarde, foi detectada a primeira proteína prenilada em células de mamíferos, (laminina B farnesilada) (48) (49). Embora, o conhecimento deste processo seja muito limitado, a prenilação de proteínas também tem sido demonstrada em parasitas como *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania mexicanan , Toxoplasma gondii e Plasmodium falciparum.*(50).

A partir dessas descobertas, esta modificação tem sido estudada extensivamente, devido à sua importância para que ocorra a atividade celular normal de numerosas proteínas. A prenilação de proteínas é uma modificação pós-traducional covalente irreversível encontrada em todas as células eucarióticas, que é compreendida pela farnesilação e geranilgeranilação.

Três enzimas preniltransferases catalisam esta modificação. Farnesiltransferase (FTase) e geranilgeranil-tipo 1 (GGTase-I) catalisam a fixação de um único farnesil (15 carbonos-FPP) ou geranilgeranil (20 carbonos-GGPP), respectivamente, a um resíduo de cisteína localizado numa sequência de consenso da região C-terminal normalmente conhecida como “caixa CAAX” (Figura 7), onde "C" é cisteína, “a” geralmente representa um aminoácido alifático, e o resíduo "X" em grande parte o responsável por determinar qual cadeia isoprenica vai ligar-se à proteína. A geranilgeraniltranferase tipo II (GGTase-II ou geranilgeraniltransferases Rab) catalisa a adição de dois grupos geranilgeranil para dois resíduos de cisteína em sequência como CXC ou CCXX perto da região C-terminal das proteínas Rab (Figura 7) (51). Essas modificações lipofílicas facilitam a associação das proteinas isopreniladas à membrana celular o qual é um requerimento funcional.

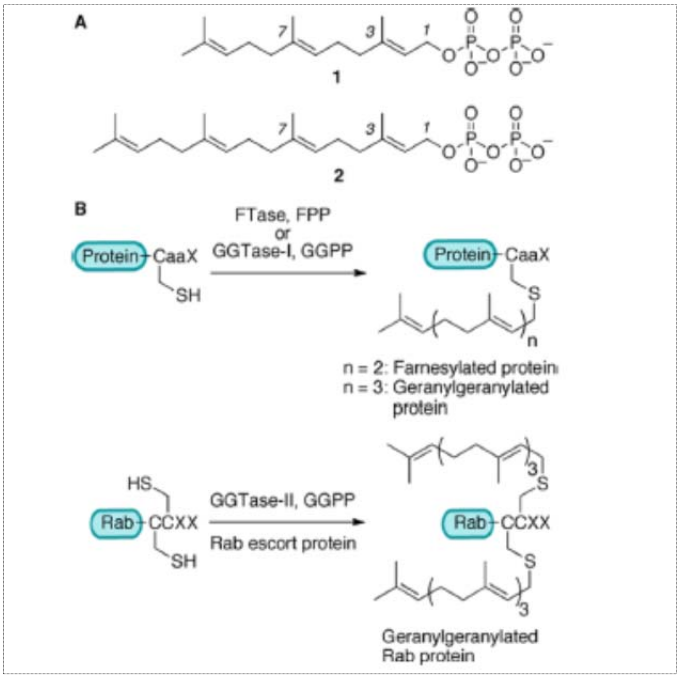

Figura 8. Isoprenilação de proteínas. (A) Estruturas de 1 (farnesil difosfato, FPP) e 2 (geranilgeranil difosfato, GGPP); (B). Reações catalisadas por enzimas preniltransferases. Fonte: Palsuledesai CC. et al (51).

A farnesilação de RAS, por exemplo, aumenta a sua associação com o fator de GTP/GDP, como também, aumenta grandemente sua habilidade para estimular enzimas transdutoras de sinais, incluindo a proteína quinase em células de mamíferos. (46). A proteína RAS não farnesilada não se associa à membrana celular e é incapaz de exercer função de transformação celular. (52)

A inibição da isoprenilação de proteínas vem sendo usada como alvo para testar compostos com possíveis efeitos antitumorais e antiproliferativos. Por exemplo, o limoneno tem sido amplamente testado *in vitro* e *in vivo.* O limoneno tem atividade quimiopreventiva contra tumores mamários, de pulmão e de fígado em camundongos. Curiosamente, inibe seletivamente a isoprenilação de proteínas de 21-26 kDa (46), sem afetar o farnesilação da lamina nuclear B. Baseados nesta seletividade é possível que o alvo principal do limoneno não seja a inibição da formação dos precursores FPP e GGPP, e sim a inibição das transferases que são as responsáveis de ligar esses grupos prenil às proteínas. (53).

Também, dados da literatura demonstraram que os metabolitos do limoneno (álcool perílico, acido perílico e cis/trans-ácido dihidroperílico) também atuam na regressão do carcinoma mamário em ratos, como também, na inibição da isoprenilação de proteínas em celulas 3T3 e demonstrou-se que são inibidores potentes das FTPase e GTPase em leveduras (53).

1.7.1.1 Álcool perílico: generalidades

O álcool perílico (POH) também chamado P-Meta,1,7-dieno-6-ol ou 4-isopropylcyclohexanol, é um monoterpeno natural encontrado em óleos essenciais de hortelã, cerejas, lavandas, entre outras. POH é um produto hidroxilado de *d*-limoneno formado pela condensação de duas unidades de isopreno, é 5 a 10 vezes mais ativo do que o limoneno. Ainda mais, mostrou ter atividade terapêutica e quimioterapia preventiva em câncer mamário (54). O POH é rapidamente metabolizado a ácido perílico (PA) e ácido dihidroperilico (DHPA) em animais (figura 8), entretanto, o PA é o maior metabólito em circulação nos humanos. Acredita-se que o mecanismo de ação de POH é a inibição das enzimas farnesil transferase e geranilgeranil transferase, impedindo a isoprenilação de proteínas da família *RAS* através da ligação dos grupos FPP e GGPP (53).

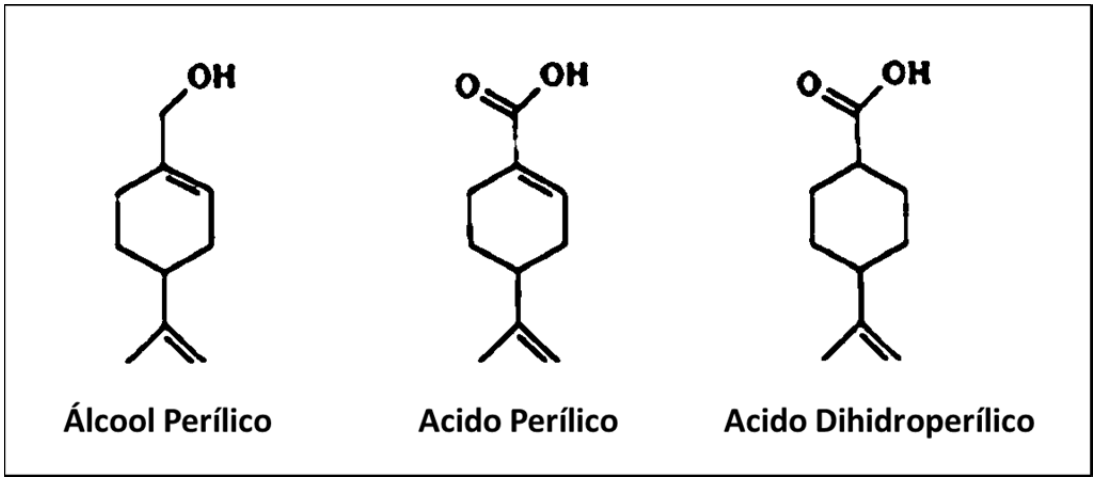

Figura 9. Estrutura do Álcool Perilico (POH) e seus metabolitos. Ácido Perílico (PA) Ácido dihidroperilico (DHPA). Fonte: Yeruva L et al. (54).

1.7.1.2 Mecanismo de ação do POH: estudos em animais e in vitro

Muitos estudos têm mostrado que o álcool perílico é um potente agente quimioterapêutico contra vários tipos de câncer, incluindo pâncreas, mama, ovário e fígado. Vários pesquisadores mediram os efeitos de diferentes concentrações de álcool perílico em linhagens celulares de tumores pancreáticos humanos e de hamster. O tratamento das células tumorais pancreáticas durante dois dias resultou num decréscimo dependente da dose na proliferação celular, com valores de IC_{50} de 290 e 480 μM para as linhas de células de hamster e humanas, respectivamente. (55)

Por outro lado, foi investigado os efeitos do POH sobre a proliferação de células de câncer de pulmão (A549, H520).Os resultados indicaram que o POH induziu citotoxicidade dependendo da dose, induzindo retenção do ciclo celular e apoptose, com o aumento da expressão de bax, p21 e atividade caspase-3 em ambas linhagens celulares. (54). Também, encontrou-se que o POH atinge na regulação da via do mevalonato e a via Ras-Raf-MEK-ERK nas células U87 e U343 de glioblastoma, afetando a modificação pós-translacional de H-Ras e Rac1. POH inibiu as enzimas responsáveis pela isoprenilação de proteínas. (56). Ainda, o POH exibiu um efeito antiproliferativo contra células cancerosas humanas pancreáticas MIA PaCa-2 (57), além disso, induziu uma parada do ciclo celular em G0 / G1 que coincidiu com um aumento na expressão de inibidores de ciclinas, p21Cip1 e p27Kip1 e uma redução dos níveis da ciclina A, ciclina B1, e de proteínas quinase dependente de ciclina (CDK) 2 (57).

Outras pesquisas tiveram a finalidade de investigar qual das três proteínas transferases são inibidas por POH observando a prenilação das proteínas Ras, RhoA e Rab6 a partir de ['4C] mevalonolactona marcada em células NIH3T3 sendo que as proteínas Ras, RhoA e Rab6 são preniladas por FPTase, GTPase tipo I, e GGPTase II, respectivamente. Os resultados mostraram que a isoprenilação de RhoA e Rab6 foram inibidas por POH com valores de 1,0 e 0,5 mM, respectivamente (58).

Além disso, ratas fêmeas C57BL alimentadas com dietas experimentais baseadas em compostos ricos em terpenóides, entre esses, o álcool perílico, 10 dias antes e 28 dias após da implantação do melanoma agressivamente crescente e altamente metastático B16 (F10) produziu 50% de retardo no crescimento do tumor dos animais tratados como também, aumentou a taxa de sobrevida. (59).

Também, camundongos tratados com 164 ug/dia de POH via intranasal, a porcentagem de macrófagos alveolares (83%) e linfócitos que produzem IgA (15%) foi maior, um padrão característico do sistema imune inato pulmonar. Esses resultados sugerem que a administração intranasal do POH pode ter um possível efeito quimioterápico em processos patológicos do pulmão (60).

1.7.1.3 Estudos clínicos

Levando em consideração os resultados promissores na redução da proliferação celular tumoral do POH em sistemas *in vitro e in vivo,* vários ensaios clínicos têm sido desenvolvidos usando o POH em pacientes que apresentam alguns tipos de gliomas e tumores.

Um primeiro estudo foi feito para estudar o efeito do álcool perílico no tratamento de câncer de ovário avançado. O álcool perílico foi administrado por via oral, quatro vezes ao dia, numa dose de 1200 mg-/-m2. A taxa livre de progressão de 6 meses foi de 17% e a sobrevida global mediana foi de 9,1 meses, porém, a toxicidade gastrointestinal (grau 1-2 náuseas, saciedade, e fadiga (grau 1-2 em 40%) foram comuns (61). Por outro lado, mulheres que apresentavam câncer de mama metastático foram submetidas ao tratamento com POH quatro vezes por dia a 1200-1500 mg m^{-2} $dose^{-1}$ e tiveram uma mediana de progressão de 35 dias, no entanto, também apresentaram sintomas de fadiga e efeitos tóxicos gastrointestinais grau 1 e 2 (62).

1.7.1.4 Liberação intranasal

Os nervos olfativos e trigêmeos que inervam o epitélio nasal representam a única conexão direta entre o ambiente externo e o cérebro. Dada a facilidade de administrar drogas por inalação nasal, esta via fornece um método prático, não invasivo, rápido e simples de liberar agentes terapêuticos ao sistema nervoso central (SNC). Esse é um dos motivos no interesse pelo seu potencial no tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Em relação à terapia de tumores cerebrais, a liberação intranasal (INL) tem sido apenas estudada e atualmente está tendo resultados que indicam um potencial promissório para o tratamento do câncer do SNC (63).

A eficácia terapêutica em humanos, particularmente para o SNC, está frequentemente diminuída ou anulada pela incapacidade dos fármacos de atingirem e manterem concentrações eficazes no cérebro, durante um período adequado de tempo. Geralmente, as moléculas são muito grandes ou tem grupos polares funcionais que a barreira hematoencefálica limita o seu acesso ao SNC (64).

Levando em consideração os fatos mencionados e devido à toxicidade do POH via oral em vários ensaios clínicos, alguns estudos foram focados em administrar o POH via intranasal para tratar gliomas cerebrais malignos, uma vez que minimiza os riscos de desenvolver toxicidade, além de ser uma via não invasiva para o paciente. Os resultados mostraram que a administração intranasal de POH (400mg/kg) aumentou a sobrevida global dos pacientes com GBM (Glioblastoma recorrente) em comparação com os controles não tratados, especialmente com os pacientes com GBM primário e secundário e com tumor localizado em regiões profundas do cérebro. Os efeitos colaterais do tratamento POH foram quase inexistentes, mesmo em pacientes tratados por mais de 4 anos (65) (52) (64).

2 JUSTIFICATIVA

A malária atualmente é uma das principais parasitoses humanas e um dos problemas de saúde publica mundial, especialmente nos países africanos. Os casos de malária tendem a aumentar, já que têm surgido parasitas resistentes a drogas e vetores aos inseticidas. Assim, observa-se a importância do desenvolvimento de estratégias que objetivem tratamentos eficazes, possíveis vacinas e novas drogas antimaláricas.

O conhecimento sobre a biologia e a bioquímica do *Plasmodium* é de vital importância para aprofundar em novas alternativas e novos alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas. A via MEP, cujos produtos finais já foram caracterizados pelo nosso grupo em *P. falciparum*, se apresenta como possível alvo quimioterápico, por ser uma via compartilhada por vários microrganismos patogênicos e não com o homem, além de ser uma via essencial para a sobrevida do parasita.

Por outro lado, vários isoprenóides derivados de plantas, tais como, o limoneno, farnesol, linalol e nerolidol já foram testados em cultura *in vitro* e encontrou-se que são inibidores eficazes de dolicóis (41), cadeias isoprenicas ligadas a ubiquinona (41) e isoprenilação de proteinas em *P. falciparum* (42). Como também, foi comprovada a ação antimalárica do nerolidol contra as formas intraeritrociticas de *P. berghei* ANKA, através do tratamento em camundongos Balb/c, por via oral e intranasal (Dados não publicados).

Levando em consideração estes fatos, o presente trabalho destinou-se a estudar o álcool perílico (POH) e seu efeito contra *Plasmodium falciparum* em cultura *in vitro* e em modelos experimentais *in vivo*. O POH é um monoterpeno derivado do limoneno que está sendo amplamente estudado por ter ação na inibição da proliferação de muitos tipos de tumores. Um dos mecanismos de ação conhecidos é através da inibição da isoprenilação de proteínas, inibindo a transferência dos precursores isoprênicos GGPP e FPP às proteínas. Levando em consideração esses fatos, espera-se que o POH tenha efeito inibitório nos processos de farnesilação e geranilgeranilação de proteinas de *P. falciparum*.

Além disso, atualmente o POH está sendo testado em ensaios clínicos, através de uma estratégia de liberação intranasal, contra gliomas cerebrais malignos. Baseados nesta estratégia de tratamento, além de ser uma técnica rápida, simples e não invasiva, o POH poderia ter um efeito promissor contra a malária não complicada e em quadros mais severos da doença, tal como, a malária cerebral murina. Essa técnica permite um contato direto com o cérebro, além de manter uma maior concentração no SNC através da via intranasal. O efeito

quimioterapêutico teria como consequência uma diminuição na taxa de incidência de malária cerebral nos camundongos tratados com POH.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimalárico do álcool perílico (POH) através de ensaios *in vitro* e em modelos experimentais *in vivo.*

3.2 Objetivos específicos

-
- Determinar a IC_{50} do álcool perílico em parasitas *de Plasmodium falciparum* cultivados *in vitro.*
- Determinar a toxicidade do álcool perílico para células MCF7 e Vero.
- Avaliar o efeito do POH na isoprenilação de proteínas em parasitas de *Plasmodium falciparum* cultivadas in vitro através da marcação metabólica, com precursores radioativos (FPP – GGPP).
- Determinar a DL50 de *Plasmodium berghei* AnkaGFP em Camundongos BALB/c.
- Avaliar a Influência do álcool perílico sobre a evolução da malária em camundongos Balb/c infectados com *P. berghei* ANKAGFP.
- Avaliar o efeito do álcool perílico sobre a taxa de incidência da malária cerebral, em camundongos C57BL6 infectados com *P. berghei* ANKA GFP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

O clone 3D7 da cepa NF54 e a cepa K1 de *P. falciparum* foram cultivados *in vitro* de acordo com o método de Trager e Jensen (66) modificado como descrito por Kimura et al (67). Os mesmos foram cultivados em eritrócitos (A ou O^+) separados de leucócitos, em meio RPMI 1640 suplementados com 25 mM de Hepes, 21 mM de bicarbonato de sódio, 370 µM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 µg/ml de gentamicina e 0,5% (v/v) de Albu-max. As culturas de *P. falciparum* foram incubadas e mantidas a 37 °C com uma mistura gasosa de 5,05% CO_2, 4,93% O_2, 90,02% N_2.

A cultura assincrônica com mais de 10% de parasitemia, no estagio anel jovem, foi centrifugada, retirado o sobrenadante, após a sincronização com sorbitol 10 % na proporção 1:25 (v/v, precipitado: solução sorbitol 5% a 37 °C por 5 min. Os parasitas foram centrifugados a 800 x g por 10 min. O precipitado, que corresponde ao concentrado de parasitas no estagio anel, foi introduzido novamente à cultura (68).

Para sincronizar parasitas no estagio maduro (esquizonte), utilizamos o método de flotação por plasmagel onde parasitas maduros são separados dos parasitas jovens. Após centrifugação a 1500 xg. O pellet foi medido e adicionado 1,4 do volume com meio RPMI, em seguida foi adicionado, gentilmente, o plasmagel 6%, seguido de incubação por 20 minutos a 37 °C. Por ultimo, o sobrenadante foi adicionado novamente à cultura (formas maduras) (69).

4.2 Padronização do método de fluorescência para contagem de parasitas usando Sybrgreen I na cultura de *Plasmodium falciparum*

Para avaliar o efeito de alguma droga sobre o crescimento dos parasitas em microtestes e substituir o método do esfregaço sanguíneo, foi padronizado o ensaio de fluorescência incorporando Sybrgreen I (Invitrogen, Itape-SP, Brasil) (70) aos parasitas em cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum* 3D7. Para esta finalidade, foram utilizadas diferentes porcentagens de parasitemia partindo de 0% até 13 %, previamente sincronizadas com sorbitol (trofozoitos jovens). Foi colocado 100 µl de SYBR Green I em tampão de lise (0,2 µl de SYBR Green I / ml de 20 mM Hidroximetilaminometano (TRIS), 5 mM Acido

etilenodiaminotetracetico (EDTA) pH 7.5, 0,008% p/v saponina e 0,08% p/v polietilenoglicol-p-isooctifenileter (triton-X 100)) a cada poço (triplicata) e incubados por 1 hora a temperatura ambiente e no escuro. Após este período, a fluorescência foi medida no fluorímetro PolarStarOmega (BMG Labtech) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 520 nm respectivamente. Por fim, as curvas foram construídas a partir das unidades relativas de fluorescência versus as diferentes porcentagens de parasitemia, fazendo a subtração da fluorescência basal das hemácias não parasitadas com Sybrgreen I (*background).* Uma analise de regressão linear de Pearson foi feita para determinar a correlação entre as duas variáveis.

4.3 Determinação da IC_{50} do álcool perílico em *Plasmodium falciparum*

Cultura sincronizada de *Plasmodium falciparum* (3D7 e K1) (trofozoito jovem) foi usada para a determinação da IC_{50} utilizando o ensaio de fluorescência segundo o método de Smilkstein *et al* (70). Após um período de 24 e 48 horas de crescimento (parasitas tratados com POH e controle) 100 µl de SYBR Green I (Invitrogen) em tampão de lise (0,2 µl de SYBR Green I / ml de 20 mM TRIS, 5 mM EDTA, pH 7.5, 0,008% p/v saponina e 0,08% p/v triton-X 100) foi adicionado e misturado a cada poço (em triplicata) e incubado por 1 hora, no escuro e à temperatura ambiente. Após este período, a fluorescência foi medida no fluorímetro Polarstar Omega, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 520 nm respectivamente. As unidades relativas de fluorescência foram analisadas e transformadas em porcentagens de crescimento (%) a partir das contagens máximas nos poços controle (sem droga). Foi realizada uma curva de porcentagens de crescimento contra o logaritmo da concentração de droga e posteriormente, uma análise através de regressão não linear (Dose-resposta/variável equação sigmoidal) para obter a concentração de droga que produz 50% do declínio no crescimento do parasita (IC_{50}).

4.4 Cultura de células Vero e MCF7

Células MCF7 (adenocarcinoma mamário) e Vero (rim de macaco verde africano), foram cultivadas em meio DMEM suplementado com L-glutamina, glucose e 10% de soro fetal bovino e meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, respectivamente. Essas linhagens foram mantidas em fase de crescimento exponencial, subcultivando duas vezes por semana em garrafas de 25 cm^2 a 37 °C e 5% CO_2. Para a subcultura, o meio foi

removido das garrafas e as células foram lavadas com 0.007 M Na_2HPO_4, 0.01 M NaH_2PO_4, pH 7.4, 0.15 M NaCl (PBS) e separadas por incubação com 2 ml de solução Tripsina 10 mg/ml/ EDTA 100 mM (Vitrocell Embriolife, Campinas-SP, Brasil) durante 5-10 minutos, seguido da inativação com DMEM. As células foram contadas e colocadas em meio de crescimento com 10^5 célula /mL.

4.4.1 Determinação da toxicidade do POH em células MCF7 e Vero

Após a obtenção de 80% de confluência, as células foram removidas e contadas na câmara de Neubauer (Knittel- Glaser, SP- Brasil). Em seguida, usando placas para cultura celular de poliestireno de 24 poços (Biosystems, Curitiba-PR, Brasil), colocou-se $3x10^5$ células por poço, tanto para MCF7 quanto para Vero. A seguir, as células foram incubadas durante a noite a 37 °C , 5% CO_2, para obtenção de uma boa adesão celular. Após este período, 100 µL de POH (1-500 µM) foram colocados em cada poço (triplicata). Após 48 horas de incubação das placas com as células tratadas (POH) e os poços livres de droga (controles), realizou-se o ensaio do sal de tetrazólio, 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). O MTT foi dissolvido em PBS (5mg/ml) e 50 µL foram adicionados para cada poço, seguido pela incubação a 37°C por 4 horas. Após a incubação, o meio foi retirado manualmente e os cristais formados foram dissolvidos com DMSO. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida utilizando um fluorímetro PolarStarOmega (BMG Labtech) com um comprimento de onda de 595 nm e 690 nm de referencia (71). A absorbância permitiu calcular a porcentagem de toxicidade usando a seguinte formula:

$$\text{Porcentagem de toxicidade} = 1 - \frac{(\text{DO tratado} - \text{DO controle})}{(\text{DO controle- do tratado})} \times 100$$

A concentração de droga necessária para inibir o crescimento celular em 50% (IC_{50}) em comparação com o crescimento de uma célula controle, foi determinada a partir da curva dose-resposta.

4.4.2 Cálculo do índice de seletividade (SI)

O índice de seletividade correspondeu ao valor de IC_{50} determinado para a atividade do álcool perílico em células Vero e MCF7 dividida pela IC_{50} determinada para eritrócitos

parasitados com *P. falciparum*. O índice de seletividade foi considerado interessante para valores maior do que três (71).

4.5 Marcação metabólica com precursores radioativos (FPP-GGPP)

Cultura sincronizada com sorbitol e com 5% de parasitemia aproximadamente foi tratada com 3 µM de POH durante 30 h e marcadas durante as ultimas 18 h, na presença de cada droga com [1- (n) -3H] sal triamônio geranilgeranil pirofosfato ([3H] GGPP) (16,5 Ci / mmol, 3.125 Ci/ml; GE Healthcare, São Paulo-SP, Brasil), [1- (n) -3H] sal triamônio farnesil pirofosfato ([3H] FPP) (16,5 Ci / mmol, 3.125 Ci / ml; GE Healthcare, São Paulo- SP, Brasil). Garrafas de cultura livres de droga foram usadas como controle do teste.

Após 48 h de tratamento e 18 h de marcação, as formas maduras (esquizontes) foram purificadas pela coluna magnética (aproximadamente >95% de formas maduras). Os parasitas maduros, eluidos pela coluna, foram centrifugados a 1000 x g por 8 minutos, seguido pela lise das células em duas vezes o seu volume de uma solução de lise fria de 10 mM de Tris-HCl pH 7,2, NaCl 150 mM, 2% (vol / vol) Triton X-100, 0.2 mM fenilmetilsulfonil de fluoreto, 5 mM iodoacetamida, 1 mM N-(p-tosilisina) clorometil cetona, e leupeptina (1µg/ml), Solução em dimetilsulfóxido (DMSO). Após incubação durante 15 min a 4 °C, os lisados foram centrifugados a 10.000 x g durante 30 minutos e os sobrenadantes foram armazenadas em N2 líquido para subsequente análise por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

O SDS-PAGE foi realizado em géis de 15% seguindo a metodologia descrita (72). A mesma concentração de parasitas tratados com POH e não tratados como se mencionou acima, foi solubilizada e aplicada para cada poço. Todos os géis foram tratados com Amplify (Amersham^{TM}, Buckinghamshire -UK), secados e expostos a filmes de RX, Kodak X- Omat (Amersham^{TM}, Buckinghamshire –UK) com intensificadores a- 70 °C, aproximadamente por 60 dias.

4.6 Animais experimentais

Camundongos BALB/c e C57BL6 machos, com 6 - 8 semanas de idade e com peso de 25 ± 2 gramas, fornecidos pelo Biotério Setorial do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), foram mantidos em salas com temperatura e umidade padrão, com ciclo claro/escuro de 12 horas, em gaiolas de polietileno com maravalha de pinho

autoclavada e alimentadas com ração e água *ad libitum*. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as normas de cuidados de animais de laboratório e o uso dos animais estava de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), processo n° 140/2009.

4.7 Infecção

Para obter os inóculos experimentais, inicialmente a cepa *P. berghei* ANKAGFP *(*PbGFP), letal em infecções em camundongos Balb/c e C57BL6, mantida em nitrogênio, foi descongelada a 37 ºC e inoculada via intraperitoneal (i.p.), em camundongos Balb/c. Posteriormente, durante a fase logarítimica da parasitemia (7 dias após inoculação), o sangue O sangue dos camundongos aproximadamente 8 dias após infecção, foi coletado por punção cardíaca, utilizando o citrato de sódio como anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi lavado 2 vezes com PBS por 5 minutos a 4 °C, e o pellet foi ressuspendido em 1 ml de PBS. Uma alíquota foi retirada para analise e contagem dos eritrócitos em Câmara de Neubauer (Knittel-Glaser). Por ultimo, cada camundongo Balb/c (n=20) foi infectado via intraperitoneal com 150000/200µL eritrócitos parasitados de PbGFP, um inóculo de 1000000/200µl eritrócitos parasitados de PbGFP para cada camundongo C57BL6 (n=20).

4.8 Parasitemia

2 µl do sangue foi coletado através de uma pequena incisão na ponta da cauda do camundongo, e foi depositado em 400 µl de tampão a 0,05% azida e 2 % de soro fetal bovino. A parasitemia de todos os animais foi acompanhada em dias pré-definidos e determinada usando o Facscalibur e o programa Cellquest pro versão 5.2.

4.9 Tratamento com POH em camundongos BALB/c infectados com PbGFP

Camundongos Balb/c infectados com PbGFP foram distribuídos aleatoriamente em dos grupos experimentais (grupo tratado e grupo controle). Após duas horas da infecção, 10 camundongos foram tratados durante 15 dias (12/12h) com 150mg/kg/dia e 500mg/kg/dia de POH (via inalatória com a ajuda de um nebulizador comercial da marca Sonicar, com taxa de nebulização de 1,0 ml/min. Cada animal foi mantido em uma “câmara” de inalação durante 2

minutos com uma solução de POH diluído em etanol 70% e 10 % de glicerol. O grupo controle inalou durante 2 minutos apenas a solução de etanol a 70% em glicerol 10%. A influência do tratamento na evolução da parasitemia dos camundongos Balb/c durante a infecção pelo *P. berghei,* foi avaliada através da porcentagem de parasitas presentes no sangue dos animais tratados em relação ao grupo não tratado. Além disso, se avaliou a sobrevida dos animais tratados com POH via inalatória comparado com o grupo controle.

4.10 Tratamento com POH em camundongos C57Bl6 infectados com PbGFP

O tratamento de camundongos C57BL6 infectados com PbGFP seguiu a mesma metodologia descrita no item anterior, com a diferença que foi usada a concentração de POH (500/mg/dia) por 7 dias.

No curso do tratamento foi avaliado também as porcentagens de parasitemia sanguinea dos dois grupos, como também, avaliou-se uma escala quantitativa rápida do comportamento e coma murino (*quantitative, rapid murine coma and behavior scale,* RMCBS*)* com o objetivo de determinar manifestações precoces e avançadas da malária cerebral nos camundongos C57BL6, além da medição de outros parâmetros como, hipotermia, histologia do cérebro e morte espontânea. Na seguinte figura se apresenta um esquema geral do experimento.

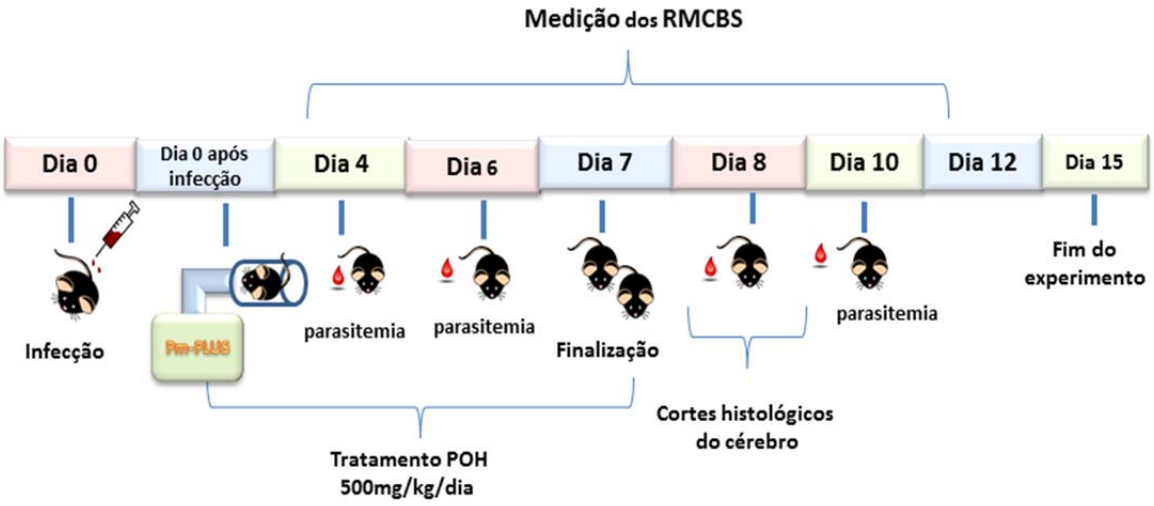

Figura 10. Esquema representativo da malária cerebral experimental (MCE) com camundongos C57BL6 infectados com PbGFP. 20 animais foram infectados com 1 x 10^6 eritrócitos parasitados de PbGFP e foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. Um grupo (n=10) foi tratado duas horas após a infecção com 500mg/kg/dia por 7 dias via intranasal, o grupo controle recebeu apenas o veiculo (n=10). A partir do dia 4 após infecção foram retiradas amostras do sangue dos dois grupos para análise de parasitemia, também, avaliou-se o RMBCS até o dia 12 após infecção. No oitavo dia após a

infecção, 20 animais foram sacrificados para análise histológica do cérebro. Foram realizados três experimentos independentes.

4.10.1 Medição dos RMCBS

A medição RMCBS foi feita segundo a metodologia descrita (73). Os RMCBS consistem em 10 parâmetros (Tabela 1), e cada parâmetro tem sua pontuação que pode ser de 0 até 2, considerando zero quando o comportamento do animal está anormal e doente, e 2 quando tem o comportamento normal e saudável. A pontuação máxima pode chegar a 20 para cada animal no final da avaliação dos 10 parâmetros. Esse protocolo foi avaliado a partir do dia 4 após infecção nos dois grupos experimentais até o dia 12 após a infecção.

O protocolo RMCBS baseia-se em parâmetros semelhantes aos componentes da avaliação do SHIRPA (74), que é um protocolo usado para avaliar alterações comportamentais em camundongos com malária cerebral. Porém, o RMCBS usa apenas aqueles parâmetros que refletem em tempo real a função do sistema nervoso central (SNC), e aqueles que poderiam ser avaliados em poucos minutos (3 minutos por animal). A avaliação dos RMCBS é usada para classificar objetivamente um camundongo como afetado, ou não, fornecendo um ponto de partida para ensaios de terapia. Este método de avaliação é o que simula mais de perto o modelo animal à doença humana (73).

4.10.2 Sacrifício, perfusão e histologia do cérebro dos camundongos

No oitavo dia após a infecção foram sacrificados 20 animais (n=10 por grupo). Definiu-se esse dia para fazer o sacrifício dos dois grupos, uma vez que a maioria dos animais apresentavam sintomas de CM neste dia.

Os animais foram submetidos à perfusão seguida de microtomia. Os animais foram anestesiados profundamente, por via subcutânea com uma solução anestésica formada por acepromazina (1 mg/ml), xilazina (5 mg/ml) e cetamina (25 mg/ml) em veículo aquoso. A seguir, foram perfundidos inicialmente com NaCl 0,9% (100 ml em 1 minuto) e a seguir, com 300 ml por 10 minutos em um fluxo lento de fixador a 4% de paraformaldeído pH 9,5 a 4 ^{o}C . O encéfalo, dos animais, foi retirado da calota craniana e pós-fixado na mesma solução fixadora acrescida de 20% de sacarose (LabSynth, Diadema – BR) por um período de 4 horas a 4 ^{o}C, em seguida, colocados em solução de PBS (tampão fosfato de sódio 10 mM e NaCl 140mM, pH, 7.4) com 20% de sacarose para crioproteção até o momento da microtomia.

Depois de completa a fixação, os encéfalos foram incluidos em blocos de parafina e foram realizados cortes semiseriados de 5 µm cada um, para posterior coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). A etapa anterior foi realizada em colaboração com a especialista do laboratorio Joelcimar Martins da Silva do centro de facilidades de apoio pesquisa (CEFAP-USP).

Após a obtenção dos cortes histológicos, foram quantificados o numero de vasos totais e com isso, porcentagem e numero de vasos com adesão de leucócitos, como também, nível de adesão e numero de hemorragias para os animais tratados com POH, não tratados e animais não infectados. A analise histológica foi realizada em colaboração com Laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz-Rio de janeiro, sob orientação do Professor Dr. Leonardo Carvalho.

Tabela 1. Escala quantitativa rápida de comportamento e coma murino.

Parâmetro	Contagem	Descrição
Coordenação		
Marcha	**(0-2)**	Nenhum - ataxico- normal
Equilíbrio	**(0-2)**	Não alongamento do corpo - alongamento patas dianteiras - alongamento o corpo inteiro
Comportamento exploratório		
Desempenho motor	**(0-2)**	Nenhum- 2 a 3 cantos explorados em 90 seg- 4 cantos explorados em 15 seg
Força		
Posição do corpo	**(0-2)**	De lado- curvado- normal
Força das patas	**(0-2)**	Sem força- força só patas dianteiras- normal
Reflexo e autopreservação		
Escape	**(0-2)**	Nenhum – unilateral- instantâneo e bilateral
Reflexo	**(0-2)**	Nenhum – unilateral- instantâneo e bilateral
Toque no pé	**(0-2)**	Nenhum – unilateral- instantâneo e bilateral
Agressão	**(0-2)**	Nenhum- tentativa de mordida – normal
Comportamento da higiene		
Limpeza	**(0-2)**	Com faixas de pelo fora do lugar - piloereção - Normal / com brilho

Adaptado de Carroll RW et al. (73)

4.11 Análise estatística

Dentre as variáveis estudadas, quando as mesmas apresentavam distribuição normal usou-se a análise de variância (*one-way analysis of variance*),e quando não, nós usamos o teste não parametrico de kruskal wallis, complementadas pelo pós-teste de comparação mútiplo de tukey e dunn, respectivamente, para comparar as médias entre mais de dois tratamentos, e o teste *T-student* não pareado para comparar as médias entre dois grupos. Também, foram construídas curvas de sobrevida para os testes *in vivo*, pelo método de Kaplan-Meier e as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste log rank. Por outro lado, foram feitas análises de regressão linear de Pearson para determinar as correlações entre diferentes variáveis estudadas. As análises e os gráficos foram feitos com ajuda do programa GraphPad Prism® 5.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da linearidade da fluorescência vs parasitemia

Para avaliar o crescimento de parasitas de *P. falciparum,* e substituir o método do esfregaço sanguíneo, foi padronizado um ensaio de fluorescência incorporando Sybrgreen I (70) aos parasitas em cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum* 3D7 (75). Na figura 11 estão apresentadas as diferentes porcentagens de parasitemia versus as unidades relativas de fluorescência, observando uma correlação linear entre a fluorescência e a parasitemia, (r=0,99). Estes dados corroboram os dados obtidos por varios autores, onde foi demonstrada uma correlação linear direta entre estas duas variáveis (r=0,976).(70).

Os resultados anteriores mostram que o ensaio de fluorescência incorporando Sybrgreen I é um método rápido, objetivo e sensível para quantificação de parasitas cultivados "*in vitro*". Também, foi demonstrada sua similaridade com outros métodos de quantificação como, Giemnsa, incorporação de hipoxantina radioativa, lactato desidrogenasse (PLDH), entre outros métodos (76)(77)(78). Ainda, parasitas em estagio de trofozoíto jovem apresentam uma incorporação menor de Sybrgreen I do que os estágios maduros ou esquizontes. Isto pode ser explicado pelo fato de ter uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de DNA presente e a fluorescência emitida, já que o Sybrgreen é um intercalante de DNA que prefere pares de bases de G-C, porém, consegue-se mostrar uma boa incorporação no parasita, apesar do parasita de *Plasmodium falciparum* ter uma seqüência rica em A-T (77). Além disso, foi demonstrada a correlação das unidades relativas de fluorescência com diferentes porcentagens de parasitemia, tendo formas jovens e maduras, (r=0,996; 0,998) respectivamente (78). Os dados de literatura foram confirmados pelos nossos resultados uma vez que, as formas jovens apresentaram os valores de fluorescência mais baixos, comparados com as formas maduras (76).

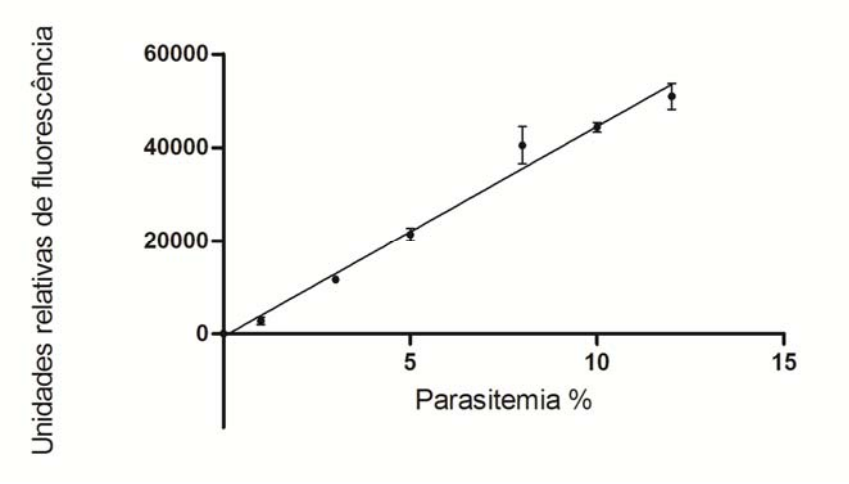

Figura 11. Relação entre a parasitemia e fluorescência medida. Cultura sincronizada no estagio jovem (anel) com diferentes porcentagens de parasitemia foi usada para a incorporação de Sybrgreen I, como descrito no item 4.2. Os valores são representados como a média ± desvio padrão para poços em triplicata após da subtração da fluorescência de eritrócitos não parasitados. Este experimento é representativo de três ensaios diferentes.

5.2 Inibição de crescimento de parasitas de *P. falciparum* (3D7 e K1) pelo álcool perílico (POH)

Depois de comprovar a linearidade do teste de fluorescência, realizou-se um microteste para determinar a concentração inibitória do álcool perílico que inibe 50% do crescimento do parasita de *Plasmodium falciparum* usando a cepa 3D7 e K1.

Foi determinada uma relação dose resposta entre o crescimento do parasita *in vitro* e as concentrações usadas de POH (figura 12). Encontramos uma concentração inibitória 50% do álcool perílico para a cultura *in vitro* de parasitas de *P. falciparum* clone 3D7, o qual é sensível à cloroquina de 4.873 ± 0.520 μM. Também, testamos a droga na cepa K1 que é resistente a cloroquina e o valor de IC_{50} foi de 10,41±2,33 μM. Esses dados não tiveram uma diferença estatisticamente significativa entre si, revelando que o POH tem um efeito inibitório sobre duas cepas com sensibilidade diferente à cloroquina. Esses dados são promissores uma vez que, se pretende achar novos alvos potenciais de drogas, principalmente contra cepas de *Plasmodium* resistentes a drogas já utilizadas. No entanto, esses dados contrastam com os dados obtidos por Olagnier D. *et al,* que encontrou uma IC_{50} para POH de 184 μM para a FCM29, que é outra cepa resistente a cloroquina. (79).

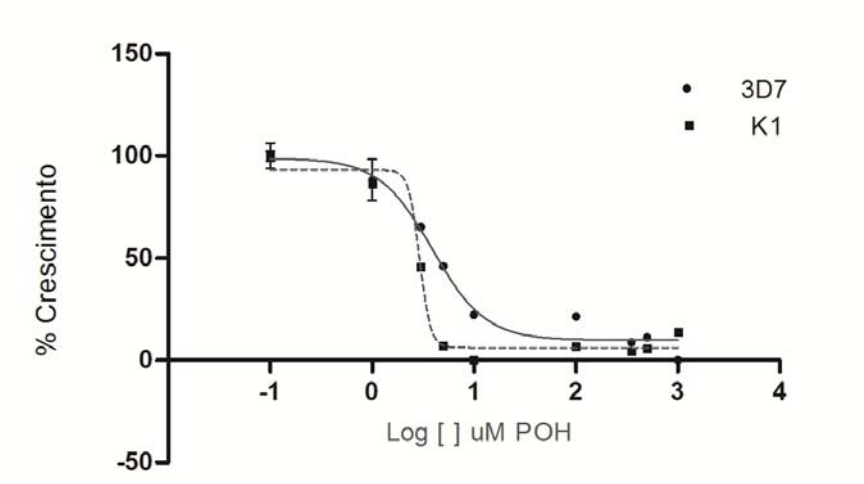

Figura 12. Curva de dose-resposta ao teste de POH determinado pelo ensaio de fluorescência. Cultura sincronizada de *P. falciparum* no estagio jovem (anel) foi usada para determinar a IC_{50} do POH, como descrito no item 4.3. Os valores foram normalizados através da utilização dos platôs da parte superior e inferior da curva de melhor ajuste, como 100 e 0% de resposta, respectivamente, e estão representados como a média ± desvio padrão dos poços em triplicata. Este experimento é representativo de três ensaios diferentes.

Também, foi observada uma relação entre as porcentagens de crescimento e as concentrações do POH. As cepas 3D7 e a cepa K1 apresentaram uma diferença estatisticamente significativa entre o controle (parasitas não tratados com a droga) e os parasitas tratados com POH. Como se observa na figura 13,encontrou-se uma diferença significativa a partir da concentração de 3 μM de POH, tendo uma significância maior com as concentrações mais altas de droga, observando também ausência de parasitas nos poços com a maior concentração de droga (1000 μM).

Além disso, é importante destacar que trabalhos anteriores no nosso laboratório mostraram que o limoneno tem uma concentração inibitória 50% de 1.22 ± 0.13 mM (41) contra outro isolado de *P. falciparum.* Em consequência, nossos dados sugerem uma maior atividade do POH contra o desenvolvimento intraeritrocítico de *P. falciparum* comparado com o limoneno. Os nossos dados corroboram os dados de literatura, onde mostram que os metabólitos do limoneno (POH) apresentam 5 a 10 vezes mais atividade do que o limoneno (53). No entanto, foi feito um microteste rápido usando ácido perílico que é o metabolito mais abundante do POH em plasma de humanos, e encontramos uma IC_{50} de 115 μM (91,75 a 145,3 μM). Este resultado nos confirma que o álcool perílico é o metabolito com maior atividade contra o desenvolvimento de *P. falciparum.*

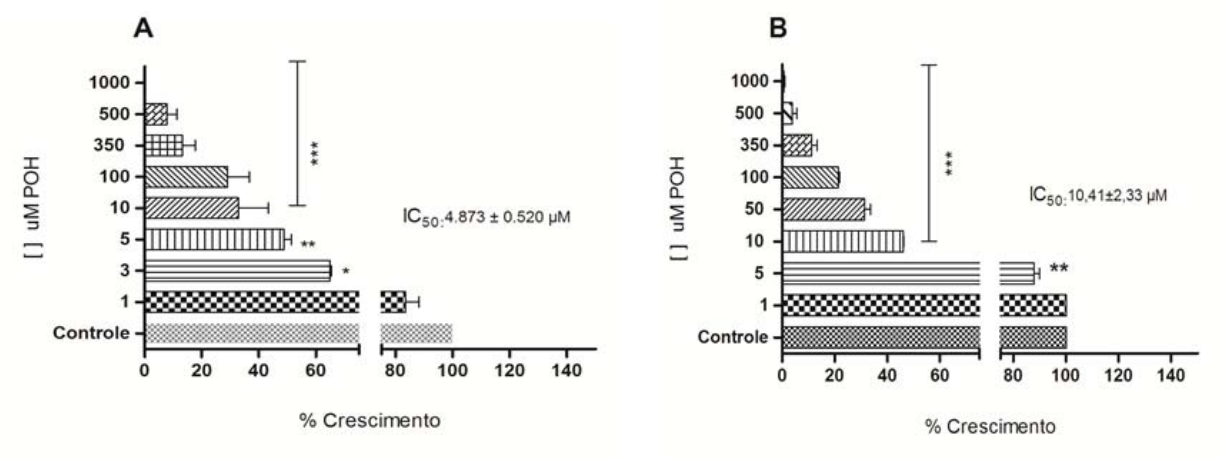

Figura 13. Porcentagens de crescimento de *Plasmodium falciparum*. (A) cepa 3D7 e (B) cepa K1, tratados e não tratados com POH (1-1000 µM).Diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) incluindo post-teste múltiplo de tukey, usando α=5%. Os valores são representados como a média ± erro padrão das médias de três experimentos diferentes. *Significativamente diferente do controle negativo (P≤0,05) ** (P ≤0,01)*** (P<0,0001).

Por outro lado, vários estudos demostraram que os terpenos apresentam um grande efeito antiprotozoário. O limoneno e o nerolidol foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*. (80)(81). Como também, outros autores demostraram que o nerolidol inibe o crescimento *in vitro* de *Babesia microti* (82). Além disso, foi demonstrada a atividade antimalárica de óleos essenciais que contêm nerolidol e álcoól perílico (83) (84).

5.3 Determinação da toxicidade do POH em células MCF7 e Vero

Com o objetivo de saber a especificidade do POH para atingir o parasita e não as células do hospedeiro fizemos um teste de toxicidade usando diferentes linhagens celulares, tais como, MCF7, que são células isoladas de adenocarcinoma mamário humano, e células de rim de macaco verde africano (Vero).

Através do teste do MTT foram determinadas as porcentagens de toxicidade do POH através de uma curva dose resposta, para cada uma das linhagens celulares usadas (figura 13) e encontramos os valores da IC_{50} do POH para cada uma delas (Tabela 2). Para a linhagem celular (VERO) foi determinado um valor da concentração inibitória 50% de 145,3 ± 20,41 µM e para a linhagem celular tumoral (MCF7) foi de 4.667 ± 0.736 µM.

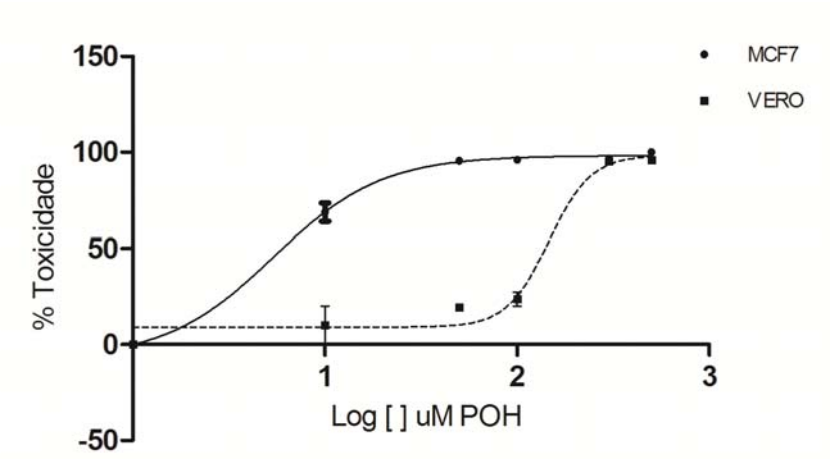

Figura 14. Curva de dose-resposta ao teste de POH determinado pelo ensaio do MTT. Células MCF7 e Vero foram mantidas em cultura e após a confluência de 80% foram retiradas para realizar o microteste e avaliação por MTT, como descrito no item 4.4 e 4.4.1. respectivamente. Os dados estão representados como a média ± desvio padrão dos poços em triplicata. Este experimento é representativo de 3 ensaios independentes.

O POH é uma molécula que exibe atividade citotóxica para as células tumorais, mas não (50) para as células normais, induzindo a ativação do fator transformador de crescimento ou inibição da sinalização da proteína *Ras* p21, levando a apoptose (60). Isto explica a IC_{50} muito maior para as células normais do que para as células tumorais, sugerindo que POH é mais especifico para linhagens de células tumorais. Além disso, o índice de seletividade demonstra que a droga é especifica para o parasita e não é toxica para a célula hospedeira. Neste caso, comprovamos que o POH não é tóxico para células normais isoladas do rim de macaco, tendo um índice de seletividade de 30,27 comparado com a elevada toxicidade para as células de adenocarcinoma mamário, onde o índice foi de 0,97. (Tabela 2).

Tabela 2. IC_{50} e índice de seletividade (IS) do álcool perílico (POH) em cultura de células Vero e MCF7. Os dados da IC_{50} são representados como a média ± erro padrão das médias de três experimentos diferentes.

Teste de droga (µM) Método do MTT	Média IC_{50} ±SEM MCF7	Média IC_{50} ±SEM Vero
Álcool perílico (POH)	**4.667 ± 0.736 µM**	**145,3 ± 20,41 µM**
Índice de seletividade (IS)	**0 ,97**	**30,27**

5.4 Avaliação do efeito do POH na isoprenilação de proteínas em *Plasmodium falciparum*, através da marcação metabólica com precursores radioativos (FPP – GGPP)

Para verificar se o POH inibe a isoprenilação de proteínas em *P. falciparum*, nós marcamos parasitas com precursores isoprenicos radioativos que participam do processo da isoprenilação. O tratamento de parasitas com POH durante a marcação com [^{3}H]FPP mostrou diferenças na incorporação desse precursor nas proteínas no estagio maduro (esquizonte), comparado com os parasitas não tratados com a droga, uma vez que incorporaram normalmente o precursor. Observa-se que a incorporação do FPP nas proteinas de ~40 KDa foi semelhante tanto nos parasitas tratados quanto nos não tratados. No entanto, nas proteínas de~ 37 KDa encontrou-se uma inibição total na incorporação do precursor nos parasitas tratados com POH comparado com os parasitas não tratados, uma vez que estes últimos apresentaram incorporação do FPP, nestas proteínas. Ainda, a intensidade da banda de~ 31 KDa diminuiu com o tratamento de POH, também, houve inibição total na incorporação do FPP para as proteínas ~ 21 KDa devido ao tratamento pelo POH (figura 15A,linha 1 e 2).

Por outro lado, a marcação com o precursor GGPP mostrou uma menor intensidade de incorporação deste nas proteínas, comparado com a incorporação de FPP. Sabe-se que a natureza do resíduo X (CaaX) determina se a proteína será farnesilada ou geranilgeranilada. Resíduos de serina, metionina, alanina ou glutamina, serão farnesilados, enquanto que resíduos de leucina ou isoleucina serão geranilgeranilados (85). Estes dados sugerem que existem mais resíduos específicos para FTPases do que para GTPases em *Plasmodium falciparum*. No entanto, há algumas exceções de proteínas que podem alternativamente sofrer qualquer tipo de modificação. Essa prenilação alternativa pode ocorrer sob condições de disponibilidade limitada de precursores ou pela presença de inibidores de FTPases (86).

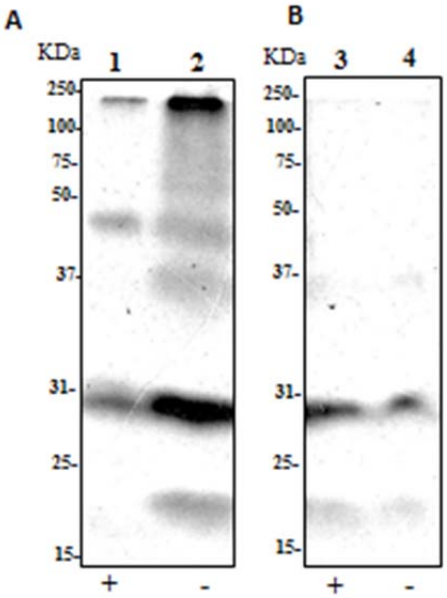

Figura 15. Tratamento de *P. falciparum* em cultura *in vitro* com 3 µM POH e marcação metabólica com [^{3}H] FPP e [^{3}H] GGPP. Parasitas foram tratados durante 48 horas na presença (+) e ausência (-) de 3 µM de POH e marcados durante 18 horas com 16,5 Ci / mmol de [^{3}H] (A) FPP e [^{3}H] GGPP (B) . Formas maduras (esquizontes) foram lisadas e analisadas por SDS-PAGE (15% de acrilamida) e autorradiografia. A Massa molecular é indicada à esquerda.

Na marcação com GGPP há incorporação nas proteínas de~31 KDa onde a intensidade das bandas não mostra diferença entre a incorporação dos parasitas tratados com POH e não tratados, também, observa-se uma pequena incorporação das proteínas de ~ 21 KDa. (Figura 15B, linha 3 e 4). Nossos dados tem correspondência com outros estudos feitos no nosso laboratório, que demostraram que parasitas marcados com FPP e tratados com limoneno, diminuíram a incorporação deste precursor às proteinas. Desta maneira, é importante ressaltar que o POH é o metabolito hidroxilado do limoneno e, por esta razão, observamos uma semelhança do mecanismo de ação desses dois terpenos.

Esses resultados também mostraram que houve redução na incorporação das proteínas de ~ 50, 40 e 20 KDa nos estágios jovem, trofozoito e esquizonte do parasita, porém, o efeito mais proeminente foi encontrado para as proteinas de ~ 20 KDa em extratos de esquizontes e formas jovens. A marcação com GGPP não mostrou tais diferenças entre os padrões de marcação dos parasitas tratados com limoneno e os não tratados (42). Também, foi demonstrado que parasitas no estágio jovem e maduro tratados com outros tipos de terpenos, tais como, farnesol, linalool e nerolidol tiveram uma redução na incorporação de GGPP e FPP nas proteinas de ~ 40, 50 e 20 KDa (41). Além disso, sabe-se que os substratos típicos que são farnesilados por FTase podem incluir muitos membros da superfamília Ras GTPases ((H-

Ras, K-Ras, N-Ras, Ras2, Rap2, RhoB, RhoE, Rheb, TC10, TC21) (87). Por esta razão, Goulart *et al* (2004) e Moura *et al,* (2001), comprovaram através da imunoprecipitação que o limoneno inibiu especificamente p21ras e p21rap de *P. falciparum* em estágios jovens e maduros. Levando em consideração os trabalhos discutidos, nós sugerimos que o POH também inibiu a incorporação das proteinas p21Ras–Rap , uma vez que observamos ausência de bandas em ~21 KDa em parasitas marcados com FPP e tratados com POH. Entretanto, para comprovarmos este fato, seria necessário fazer uma inmunoprecipitação com anticorpos monoclonais anti pRas21 (figura 15A,linha 1 e 2).

Varios autores mostraram que a PFT e PGGT-I são expressas em diferentes estágios do ciclo de vida de *P. falciparum*. A atividade PFT foi menor em estágios de anel e trofozoito comparado com o estádio esquizonte onde a atividade foi maior. A atividade PGGT-I foi maior em estágios de anel com atividades menores em estágios de trofozoitos e esquizonte (50). Nossos resultados comprovam esses dados, uma vez que nós usamos extratos de parasitas marcados e purificados em estádio maduro (esquizonte) e encontramos uma maior incorporação do FPP comparado com GGPP, sugerindo desta maneira que essa diferença de incorporação dos precursores isoprênicos às proteínas é pelo fato da atividade das enzimas responsáveis pela transferência dos mesmos serem dependentes do estágio de desenvolvimento do parasita.

5.5 Determinação da Dose letal 50 (DL_{50}) em camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* ANKA GFP (PbGFP)

O *P. berghei* é uma das espécies de *Plasmodium* a qual é especifica para ocasionar malária murina e é letal em diferentes linhagens de camundongos (88). No entanto, para desenvolver nosso trabalho nós usamos um *Plasmodium* recombinante, chamado *P. berghei* ANKA GFP (*Green fluorescent protein)* que permite realizar uma análise mais rápida, simples e eficaz para avaliação da parasitemia através de citometria de fluxo. Desta maneira, podemos excluir erros de contagem por meio de esfregaço sanguíneo, que seria um viés no experimento, além de permitir analisar um grande número de amostras, em um tempo menor. Todas as formas, do ciclo de vida de PbGFP exceto gametas masculinas, podem ser facilmente visualizados através da microscopia fluorescente, e é importante destacar que PbGFP mostra características de crescimento semelhantes ao tipo selvagem de *P. berghei* ao longo de todo o ciclo de vida e, por conseguinte, é utilizado como uma linha de referência para investigações de interações de células de parasita- hospedeiro (89).

Levando em consideração os dados anteriores, nosso primeiro objetivo foi achar a dose letal do PbGFP que matasse 50% da população de camundongos Balb/c, usando concentrações diferentes de inóculo (1000 eritrócitos parasitados até 150000 eritrócitos parasitados) e avaliando a mortalidade de cada grupo (n=50) durante 18 dias. Nós encontramos uma DL_{50} de 148.716 eritrócitos parasitados/ml ± 0.25 (figura16A).

Também mostra-se a curva de sobrevida dos animais inoculados onde se observa uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (P=0,001) usando o teste de Log-rank, tendo uma correspondência entre as concentrações de inóculo e as porcentagens de sobrevida. Animais inoculados com um número menor de parasitas sobreviveram até o dia 25, ao contrário dos inoculados com a concentração maior de parasitas, que morreram, a maioria, 18 dias após infecção (figura16B).

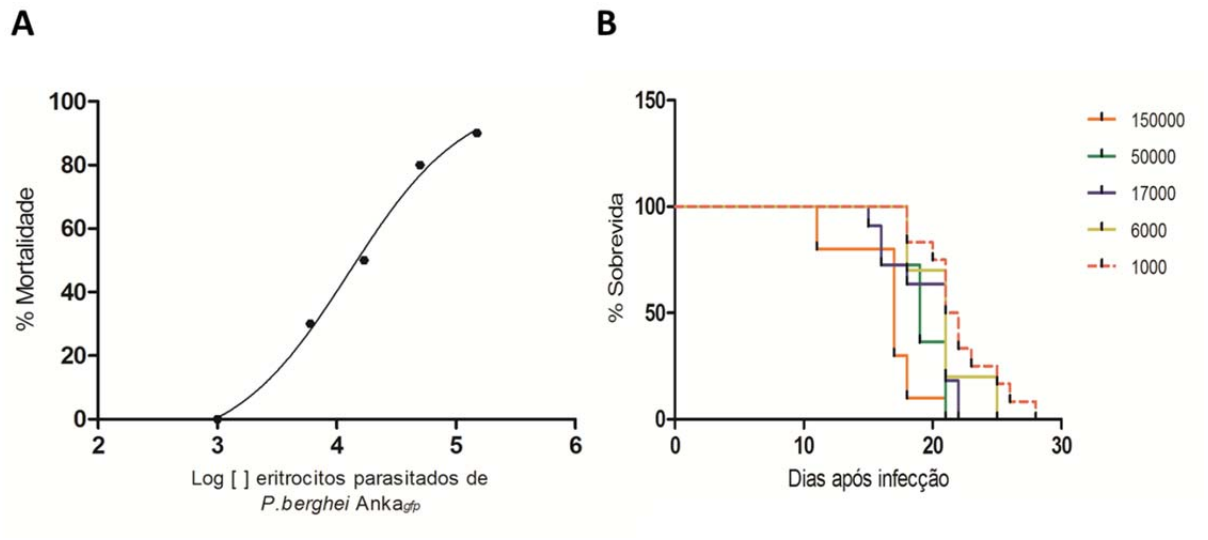

Figura 16. Curva de mortalidade de camundongos Balb/c infectados com diferentes densidades de inóculos de PbGFP após 18 dias da infecção. (A) Porcentagem de sobrevida avaliada em 30 dias após infecção. (B) Camundongos Balb/c foram infectados via intraperitoneal com PbGFP, como descrito no item 4.6. (n= 50). Diferenças de sobrevida entre os grupos foram avaliadas pelo teste do Log-Rank. (α = 5%). Este experimento é representativo de 2 ensaios diferentes.

Nossos dados correspondem com o reportado por outros autores que sugeriram que existe uma correlação entre a densidade de parasitas do inoculo e o tempo de sobrevivência nos camundongos Swiss infectados com *P. berghei* K 173. (90). Embora tenhamos usado outra linhagem de camundongo e outra cepa de *Plasmodium berghei*, nós obtivemos da mesma maneira, uma relação entre o inoculo e o tempo de sobrevida dos camundongos.

5.6 Avaliação da Influência do álcool perilico (POH) sobre a evolução da malária não complicada nos camundongos BALB/c infectados com PbGFP

Após determinada a IC_{50} (aprox. 150000 eritrócitos parasitados/ml) em camundongos Balb/c em aproximadamente 18 dias, avaliamos a eficácia do tratamento com POH em camundongos infectados com PbGFP. Nós tratamos, após duas horas da infecção, um grupo de camundongos com 150mg/kg/dia e 500mg/kg/dia via inalatória durante 15 dias, com intervalos de 12 h. A dosagem, via de administração e tempo de tratamento foi baseado em experimentos anteriores realizados no nosso laboratório com nerolidol (dados não publicados). O grupo controle recebeu por via inalatória apenas o veiculo (n=20).

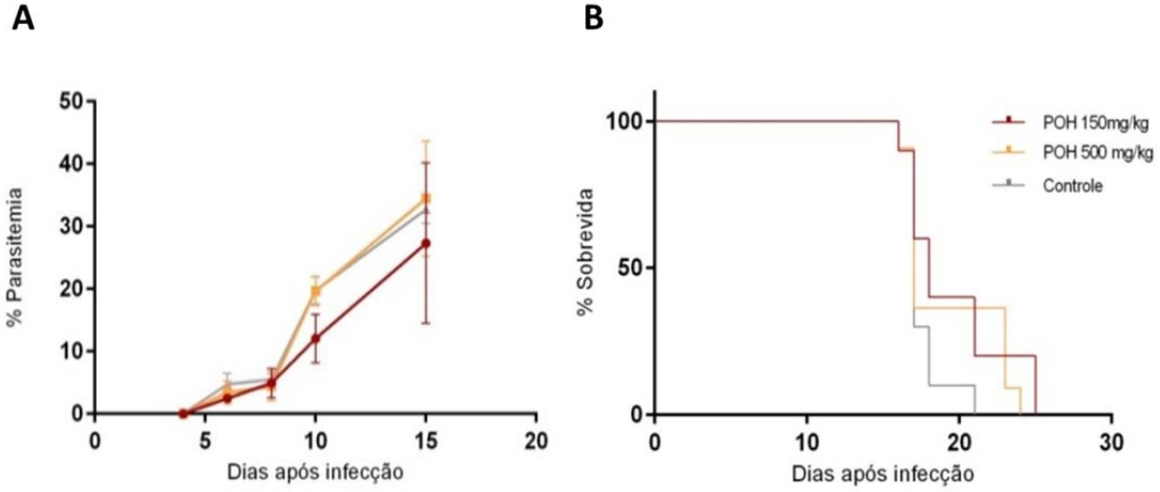

Figura 17. Porcentagens de parasitemia e sobrevida dos animais tratados com POH e o veiculo. (A) Porcentagens de parasitemia e o veiculo e (B) porcentagens de sobrevivência após infecção Camundongos Balb/c foram infectados via intraperitoneal com 150.000 EP/ml e tratados duas horas após infecção com 150 e 500 mg/kg/dia de POH via inalatória durante 15 dias, como descrito no item 4.9. Os dados estão apresentados como a média ± desvio padrão, (n=20). Diferenças entre as curvas de parasitemia e sobrevida foram avaliadas através do teste T-student não pareado e teste de Log-Rank, usando α= 5%. Respectivamente.

Nos dias 4, 6, 8 10 e 15 após a infecção, observa-se um comportamento semelhante entre as porcentagens de parasitemia dos grupos tratados com POH e o controle, não tendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Também, não se observou diferenças entre a eficácia do tratamento com a dosagem de 150 mg/kg/dia comparado com o 500 mg/kg/dia para inibir o crescimento do PbGFP (Figura 17A).

Por outro lado, os animais dos grupos tratados com POH sobreviveram até o dia 25 após a infecção, ao contrario do grupo controle onde sobreviveram até o dia 18 após a infecção. Entretanto, a diferença de sobrevida entre os grupos, não foi estatisticamente

significativa (figura 17B). Da mesma maneira, não houve uma relação entre a dosagem de POH e o tempo de sobrevida dos animais, mostrando que não houve eficácia no tratamento contra a malaria murina não complicada.

Levando em consideração os dados anteriores, nós podemos sugerir que o POH não teve um efeito contra a malária não complicada, talvez pelo fato da quantidade de POH que chega ao sangue via inalatória estar uma concentração que não seja eficaz. Corroborando com os nossos dados, dados de literatura mostram que um dos motivos para o insucesso na eliminação do parasita em modelo experimental pode ser o fato de que apenas uma quantidade insuficiente da droga ou de seu metabólito ativo alcançar o nível plasmático um evento denominado falha terapêutica.

Fatores externos, como a imunidade, as variações na absorção da droga e no metabolismo do animal também contribuem para essa falha (91). O POH é rapidamente metabolizado a ácido perilico (PA) e ácido dihidroperilico (DHPA) em animais, (53) o que nos faz pensar que esses metabolitos não são ativos contra o *P. berghei*, uma vez que comprovamos que o acido perílico não é ativo contra parasitas de *P. falciparum in vitro.*

Por fim, vale a pena ressaltar que nós não fizemos avaliação do POH usando outras vias de tratamento uma vez que ele causa toxicidade através da via oral, ocasionando náuseas, vômitos e toxicidade gastrointestinal intolerável em pacientes (92), por esta razão nosso estudo restringiu somente na estratégia intranasal.

5.7 Avaliação do efeito do POH por via intranasal sobre a taxa de incidência da malária cerebral experimental (MCE) em camundongos C57BL/6 infectados com PbGFP

Depois da avaliação do efeito do POH sobre a malária não complicada, nós começamos a avaliar a eficácia do POH sobre a taxa de incidência na malária cerebral. O modelo envolve a infecção por *P. berghei* ANKA em linhagens de camundongos C57BL/6. Neste modelo, os sintomas clínicos ocorrem a níveis relativamente baixos de parasitemia sanguinea (<20%), e não são direcionados por anemia hemolítica, mas sim, por reações inflamatórias patológicas do hospedeiro. De fato, as células endoteliais do cérebro ativadas por hemácias aprisionadas produzem citocinas e fatores quimiotáticos que recrutam neutrófilos e linfócitos T ativados. A libertação de moléculas citotóxicas por leucócitos inflamatórios conduz à perda de integridade da barreira hematocefalica, micro trombose, hipóxia do parênquima cerebral, o que leva os sintomas neurológicos, incluindo convulsões e coma, e finalmente a morte. (93)

Após 4 dias da infecção até o dia 12 , nós fizemos uma avaliação física para determinar o dia em que o animal começa a apresentar sintomas de CM, como descrito anteriormente no item 4.10.1. A medição da escala quantitativa rápida de comportamento e coma murino (RMCBS) mostra que a patologia da CM começou a se desenvolver a partir do dia 6 após a infecção nos dois grupos, lembrando que a contagem máxima de vinte (20) significa o animal sadio e sem sintomas de CM comparado com a contagem mínima de zero (0) onde o animal mostra patrões de coma ou morte.

Nos dias 6 e 8 após a infecção, no grupo controle, observou-se que mais de 50% dos animais apresentaram sintomas típicos de alterações cerebrais, tais como, ataxia, convulsões, paralisia e hipotermia (≤ 30°C) o que reflete nas pontuações de RMCBS menores de 10, mostrando também, morte súbita de alguns animais a partir do dia 6. Entretanto, o grupo tratado com POH teve uma incidência menor de CM, pela medição dos RMCBS. Somente 10 % dos animais apresentaram sintomas de ataxia e hipotermia (≤ 30 ^{o}C), tendo pontuações maiores de 15. Os dois grupos, tratados e não tratados, apresentaram uma diferença estatisticamente significativa pela avaliação dos RMBCS, nos dias 6 e 8 após a infecção (P= 0,02). (Figura 18).

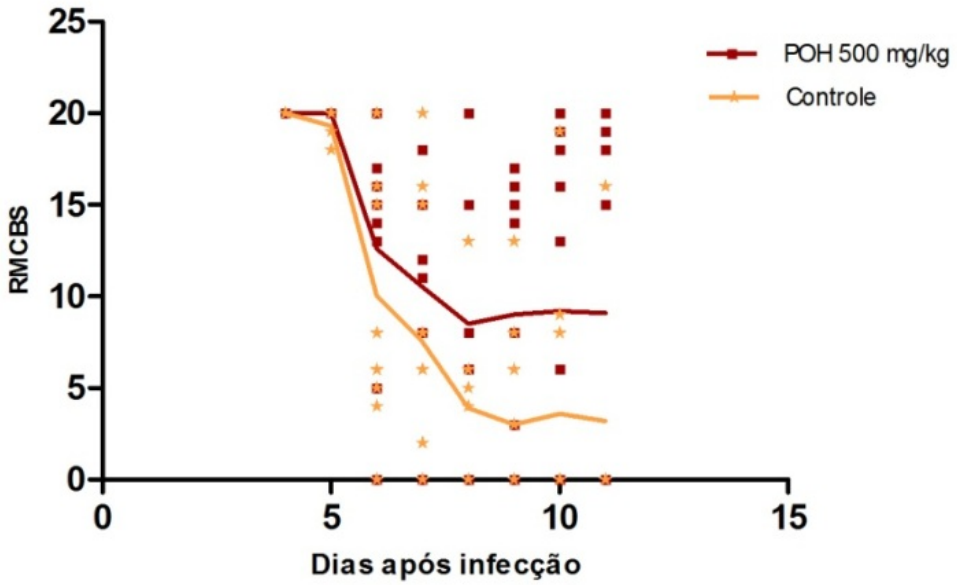

Figura 18. Curvas de RMCBS do grupo POH e controle após 4 dias da infeção. Estes dados representam a trajetória da doença no modelo murino de malária cerebral (MCM). As linhas representam as médias dos dois grupos e os símbolos representam os indivíduos de cada grupo (n=20). As curvas médias de RMCBS foram significativas entre si (P <0,05) e houve diferença dos RMCBS no dia 6 e 8 de infecção entre ambos os grupos (P= 0,02).

Por outro lado, foi observado que as porcentagens de parasitemia de ambos os grupos mostrou um comportamento semelhante nos dias 4, 6, 8 e 10 após a infecção. Os animais alcançaram parasitemias máximas de aproximadamente 10% no dia 10 após infecção e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (figura 19). O anterior é um comportamento padrão neste modelo de malária cerebral murina, uma vez que os animais não alcançam níveis de hiperparasitemia, morrendo com parasitemias baixas (94). Os dados apresentados anteriormente corroboram os nossos dados obtidos em experimentos prévios, onde vemos a ausencia de eficácia do tratamento com POH na parasitemia dos camundongos BALB/c.

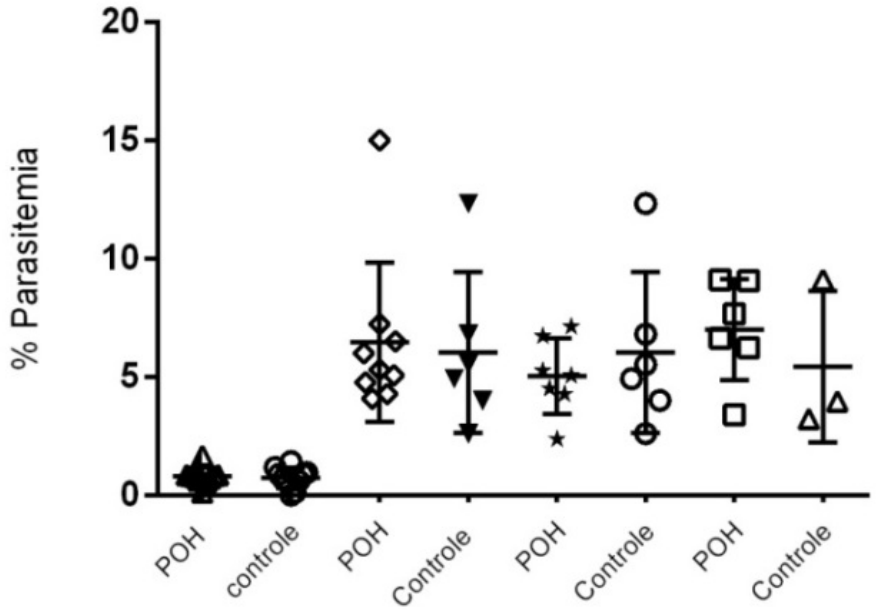

Figura 19. Porcentagem de parasitemia do grupo tratado com POH e o veiculo nos dias 4, 6, 8 e 10 após infecção. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^6 eritrocitos parasitados por PbGFP e tratados por via intranasal com 500mg/kg/dia do POH como descrito no ítem 4.10. O grupo controle recebeu apenas o veiculo, (n=20). Diferenças significativas foram avaliadas através do analise de variancia (ANOVA) incluindo post-teste múltiplo de tukey, usando α= 5%. Os dados estão representados pela media ± desvio padrão.

A partir do dia zero (0) até o dia 15 após a infecção, observou-se o desfecho da doença através da mortalidade dos animais. O grupo tratado com POH apresentou uma sobrevida do 70% comparado com o grupo controle, onde a sobrevida foi de apenas de 30%. (Figura 20), e a diferença foi estatisticamente significativa (P=0,02).

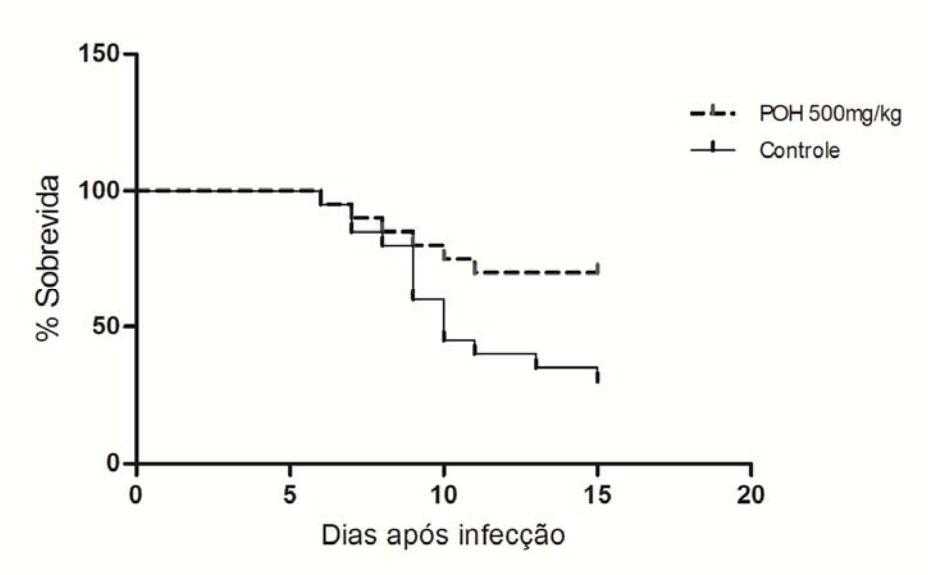

Figura 20. Sobrevida dos animais tratados com POH e o veiculo. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^6 eritrocitos parasitados por PbGFP e tratados via intranasal com 500mg/kg/día do POH como descrito no ítem 4.10. O grupo controle recebeu apenas o veiculo, (n=20). Diferenças estatísticas foram avaliadas através do teste Log-Rank, usando α= 5%.

Em vista dos resultados da eficácia obtida na primeira fase do estudo, tal como, a manifestação dos sinais clínicos clássicos de ECM e desfecho da doença nos animais tratados com POH comparados com os não tratados, nós decidimos avaliar as características histológicas do cérebro dos animais tratados e não tratados. Sabe-se que a MCE está associada com aderência e acumulação de leucócitos nos vasos cerebrais e microhemorragias (95). Levando em consideração estes dados, nós encontramos uma diminuição estatisticamente significativa entre a proporção de vasos com adesão de leucócitos dos animais tratados comparadas com os não tratados (fig 21A) (P=0.001). Interessantemente, a diferença entre vasos com adesão dos animais não infectados e os animais tratados com POH não foi estatisticamente significativa.

Além dos animais do grupo tratado com POH terem apresentado uma proporção muito menor de vasos com leucócitos, a intensidade de adesão dos leucócitos em tais vasos (ou seja, a quantidade de leucócitos por vaso) também foi menor em relação aos animais do grupo tratado com veículo ($p< 0.05$) (fig 21B). Por fim, o número de hemorragias também diminuiu significativamente com o tratamento com o POH ($P< 0.0001$) (fig 21C).

Imagens representativas da acumulação de leucócitos nos vasos cerebrais e hemorragias, em diferentes grupos são mostradas na figura 22.

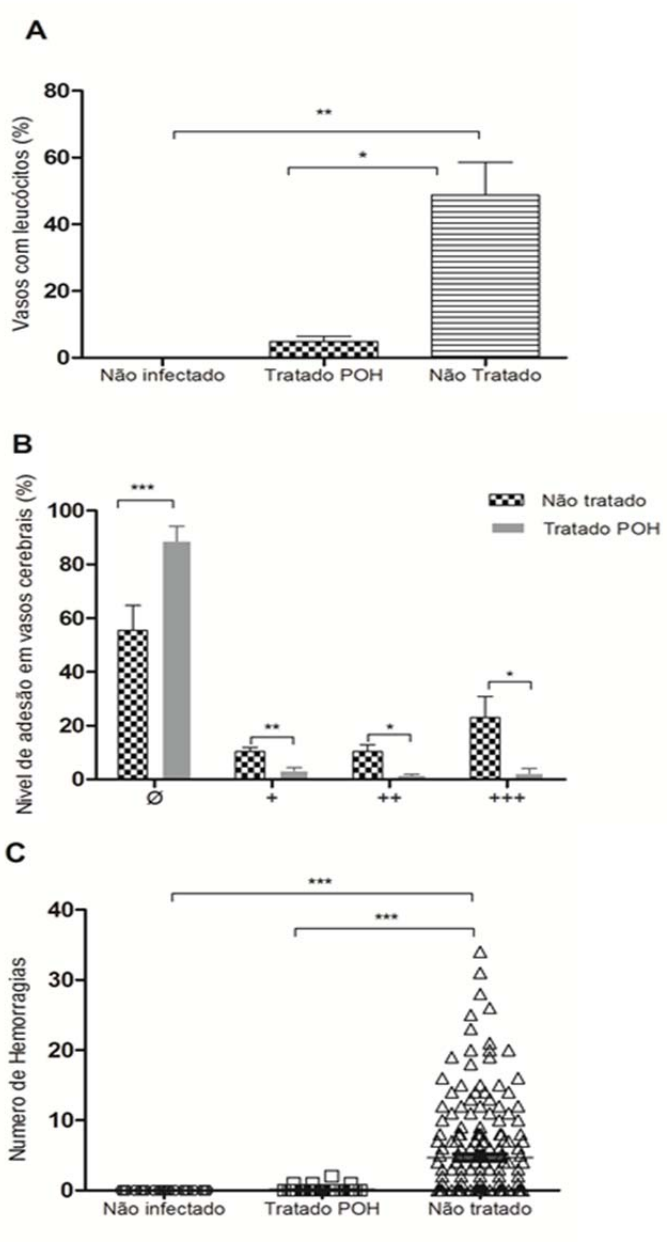

Figura 21. Inibição da inflamação no cérebro dos camundongos com MCE infectados com PbGFP 8 dias após o tratamento com 500mg/kg/dia de POH. (A) A proporção de vasos com leucócitos diminuiu significativamente nos camundongos tratados com POH. (B) Os maiores níveis de adesão foram encontrados nos camundongos não tratados, como consequência, o numero de vasos sem adesão foi significativamente menor nos animais tratados com POH. Ø zero adesão, + ; ++ ; +++, pouca, intermedia e grande adesão, respectivamente. (C) O numero de hemorragias foram reduzidas significativamente pelo tratamento com POH. Os resultados são apresentados com a media ± SEM. Teste de kruskal wallis, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P< 0.0001$.

Os resultados anteriores demonstram que o POH é um monoterpeno efetivo para prevenir o desenvolvimento da MCE, como foi demonstrado pelo tratamento que diminui a inflamação cerebral em camundongos com CME. Sua eficácia pode estar relacionada com um efeito local que o POH exerce no cérebro dos camundongos tratados, uma vez que o tratamento intranasal permite que substâncias tenham acesso direto ao cérebro, subsequentemente, essa via permite a liberação mais rápida e eficiente de drogas antimaláricas na malária cerebral. Porém, muitas moléculas também podem passar para circulação sistêmica já que a cavidade nasal é altamente vascularizada (96).

Por outro lado, sabe-se que o artesunato, que é um derivado semissintético da artemisinina, é atualmente a terapia da primeira escolha para tratar CM, uma vez que sua

eficácia sobre o quinino foi demonstrada em grandes estudos(97)(98). O tratamento de CM, que geralmente é por injeção intravenosa, requer internação hospitalar, isso representa um problema adicional, uma vez que os hospitais não são facilmente acessíveis em todas as áreas afetadas. (99). Baseados nestes fatos, alguns autores testaram o artesunato e a dihidroartemisinina usando a via intranasal na MCE. Os resultados mostraram que a administração intranasal dos derivados da artemisinina foram altamente eficazes no tratamento da MCE pela infecção por *Plasmodium berghei* em camundongos infectados (100)(96). Levando em consideração nossos resultados obtidos e os fatos anteriores podemos afirmar que a via intranasal é uma via promissora para tratar quadros severos de malaria, neste caso, a CME. No entanto, é importante destacar que o POH não teve nenhum efeito contra parasitemia, ao contrario dos animais tratados com os derivados de artemisinina, os quais mostraram uma redução significativa do crescimento do parasita. Nossos dados sugerem que a eficácia do POH no tratamento da MCE pode ser devida a um efeito imunomodulador sistêmico ou local, dado que uma resposta imune adequada é importante no controle da infecção por *Plasmodium*, em outras palavras, uma resposta pró-inflamatória mínima é benéfica para controlar a parasitemia, porém, uma resposta do hospedeiro exacerbada, invariavelmente, conduz a dano de tecidos. Em particular , varias citocinas, entre elas, o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1) estão envolvidas na patogênese de MC humana (2). No caso da MCE tem sido diretamente correlacionada, também, com a forte resposta imune pro-inflamatória e alguns mediadores inflamatórios (5). Além disso, resultados anteriores no nosso estudo demonstraram que o POH inibe a proliferação de células de adenocarcinoma mamário (MCF7), ou seja, células que se dividem e se multiplicam intensamente. Assim, é possível também que o POH possa estar inibindo a intensa multiplicação de células do sistema imune que é observada na malária, por exemplo, como foi demonstrado por varios autores, nesse mesmo modelo experimental, acharam esplenomegalia com intensa proliferação de linfócitos T e B. Essa intensa ativação e proliferação celular, principalmente de células do compartimento B, na malária já foi inclusive comparada a uma proliferação tumoral, dada a sua intensidade. Essa intensa ativação, por sua vez, pode ser responsável pelo intenso processo inflamatório na MCE (101).

Por outro lado, outros trabalhos tem sido focados no resgate de camundongos com MCE em etapa tardia, usando artemeter e artesunato como tratamento. Os resultados mostraram que os derivados da artemisinina foram igualmente eficazes no resgate da ECM (46 e 43% de sobrevivência, respectivamente), e na redução da parasitemia nas primeiras 24 horas de tratamento com artemeter, enquanto que o quinino teve uma baixa eficácia (12.5%

de sobrevivência) (102). Desta maneira, é importante destacar que uma terapia alternativa diferente o quinino, como terapia curativa em estágios avançados da CM é importante, e levando em consideração nossos resultados, onde mostramos a eficácia do POH como terapia preventiva da MCE seria de grande importância investigar o possível potencial do POH como terapia curativa da MCE em estágios avançados da doença, assim como também, seu possível efeito adjuvante com derivados da artemisinina, tais como, artemeter ou artesunato.

Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa abrem novas alternativas no estudo do mecanismo de ação do POH como um terpeno com grande potencial para tratar MC, desta maneira o descobrimento de novas drogas para serem usadas no tratamento da MC e novas vias de administração, são de vital importância para futuros tratamentos menos invasivos e mais eficazes contra quadros severos da malária.

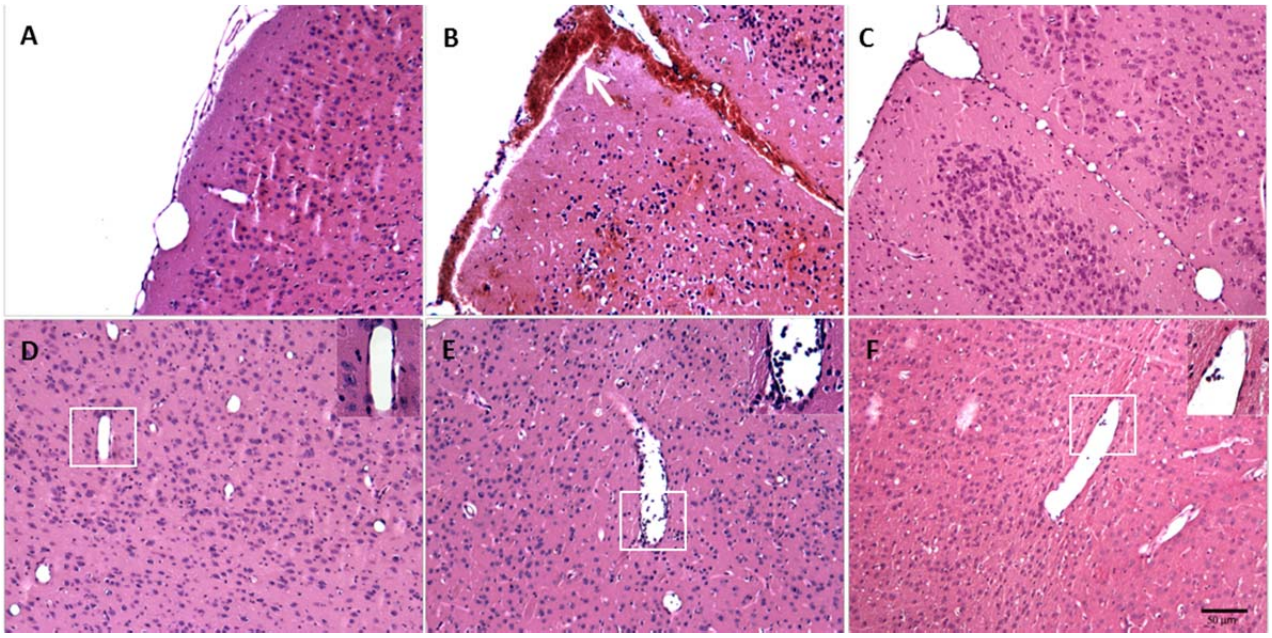

Figura 22. Inibição da inflamação no cérebro dos camundongos com MCE infectados com PbGFP 8 dias após o tratamento com 500mg/kg/dia de POH. (A e D) vasos piais (A) e parenquimatosos (D) do camundongo controle não infectado, mostrando não acumulação ou adesão de leucócitos (inserto superior), e com ausência de hemorragias; (B e E) vasos piais (B) e parenquimatosos (E) do camundongo infectado não tratado, mostrando grande adesão leucocitária (inserto superior) e uma extensiva hemorragia subaracnóidea (seta branca); (C e F) vasos piais (C) e parenquimatosos (F) do camundongo infectado e tratado com POH, mostrando, vasos preservados, sem presença de microhemorragias e pouca adesão de leucócitos (inserto superior). A magnitude da acumulação de leucócitos e/ou aderência, e microhemorragias foi estatisticamente diferente entre os camundongos não tratados e tratados com POH. Todos os cortes foram corados com H & E.

6 CONCLUSÕES

- Através da padronização do ensaio de fluorescência usando Sybrgreen I para nossas condições de laboratorio mostramos que é um método rápido, objetivo e sensível para quantificação de parasitas cultivados "*in vitro*".

- O POH inibiu a crescimento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, com uma concentração inibitória de 4.8 μM (IC_{50}).

- Demonstramos que o POH não teve efeito toxico para linhagem celular Vero, o qual mostra uma grande especificidade do POH contra o *P. falciparum*, tendo um índice de seletividade de 30, 97.

- Comprovamos que o POH inibe a farnesilação de proteinas entre 20 e 37 KDa de *P. falciparum*, sugerindo um efeito inibitório da FTase como possível mecanismo de ação *in vitro.*

- A utilização da cepa *P. berghei* ANKAGFP nos permitiu avaliar de forma eficaz, simples e rápida por citometria do fluxo, o crescimento do *P. berghei* em camundongos infectados, gerando uma ferramenta útil estabelecida no nosso laboratorio.

- O POH via intranasal não teve efeito contra o crescimento do *P. berghei* em camundongos infectados.

- O POH via intranasal teve um efeito preventivo na MCE, uma vez que a taxa de incidência de malaria cerebral nos camundongos tratados foi significativamente menor comparada com os animais não tratados.

REFERÊNCIAS*

1. Lacerda-Queiroz N. Imunopatogênese da malária cerebral Immunopathogenesis of cerebral malaria. Bras Neurol. 2008;44(1):13–9.

2. Brian de Souza J, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. Microbes Infect. 2002 Mar;4(3):291–300.

3. Newton CRJC, Hien TT, White N. Cerebral malaria. Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000;433–41.

4. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. 2002;415(February):673–9.

5. De Souza JB, Hafalla JCR, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. Parasitology. 2010 Apr;137(5):755–72.

6. De Kossodo S, Grau GE. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. J Immunol. 1993 Nov 1;151(9):4811–20.

7. Neill AL, Hunt NH. Pathology of fatal and resolving Plasmodium berghei cerebral malaria in mice. Parasitology. 1992 Oct;105 (Pt 2):165–75.

8. Kondrachine A V, Trigg PI. Global overview of malaria. Indian J Med Res [Internet]. 1997 Aug [cited 2015 May 26];106:39–52.

9. World Health Organization. World malaria report 2014 [Internet]. Switzerland; 2014 Feb. Available from: www.who.int

10. World Health Organization. World malaria report 2013. France; 2013.

11. Pina-Costa A De, Brasil P, Santi SM Di, Araujo MP De, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFES, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Aug;109(5):618–33.

12. Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Feb 13;110(February):23–47.

13. Trigg PI, Kondrachine AV. Commentary : Malaria control in the 1990s. Bulletin OMS.1998;76(May 1955):11–6.

14. Garcia LS. Malaria. Clin Lab Med. 2010 Mar;30(1):93–129.

*De acordo com:
International Commitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 July 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

15. Nardin E. The past decade in malaria synthetic peptide vaccine clinical trials. Hum Vaccin. 2014 Oct 27;6(1):27–38

16. Mueller I, Genton B, Betuela I, Alpers MP. Vaccines against malaria: Perspectives from Papua, New Guinea. Hum Vaccin. 2014 Oct 27;6(1):17–20.

17. Casares S, Richie TL. Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. Curr Opin Immunol. 2009 Jun;21(3):321–30.

18. Bruce-Chwatt LJ. Cinchona and its alkaloids: 350 years. N Y State J Med [Internet]. 1988 Jun [cited 2015 May 27];88(6):318–22.

19. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Reviews Epidemiology of drug-resistant malaria. Lancet. 2002;2:209–18.

20. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Simon I. Europe PMC Funders Group The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. Nature. 2011;434(7030):214–7.

21. Rønn AM, Msangeni HA, Mhina J, Wernsdorfer WH, Bygbjerg IC. High level of resistance of Plasmodium falciparum to sulfadoxine-pyrimethamine in children in Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2015;90(2):179–81.

22. Checchi F, Durand R, Balkan S, Vonhm BT, Kollie JZ, Biberson P, et al. High Plasmodium falciparum resistance to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Harper, Liberia: results in vivo and analysis of point mutations. Trans R Soc Trop Med Hyg.2015;96(6):664–9.

23. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin O a, Akinboye DO, Yusuf BO, Ebong OO, et al. Polymorphisms in Plasmodium falciparum dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. Acta Trop. 2005 Sep;95(3):183–93.

24. World Health Organization. the use of antimalarial drugs report of an informal consultation. Switzerland; 2001.

25. Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 3;95(5):2100–4.

26. Jordão FM, Saito AY, Miguel DC, de Jesus Peres V, Kimura EA, Katzin AM. In vitro and in vivo antiplasmodial activities of risedronate and its interference with protein prenylation in Plasmodium falciparum. Antimicrob Agents Chemother. 2011 May;55(5):2026–31.

27. Beytía ED, Porter JW. Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. Annu Rev Biochem. 1976 Jan;45:113–42.

28. Joseph L. Goldstein & Michael. Regulation of mevalonate pathway. Nature. 1990;343.

29. Mep DD, Wanke M, Skorupinska-tudek K, Swiezewska E. Isoprenoid biosynthesis. Quaterly. 2001;48(3):663–72.

30. Jordão FM, Kimura EA, Katzin AM. Isoprenoid biosynthesis in the erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Aug;106:134–41.

31. Rohmer M, Knani TM, Simonin P, Sutter B, Sahmt H, Nationale E, et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria : a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. Biochem.1993;524:517–24.

32. Cvejic JH, Rosa S, Y AE, Hattori R, Y TH, Y MR. Bacterial triterpenoids of the hopane series as biomarkers for the chemotaxonomy of Burkholderia , Pseudomonas and Ralstonia spp .FEMS Microbiology Letters. 2000;183:295–9.

33. Lois M, Campos N, Putra S, Danielsen K, Rohmer M and Boronat A. Cloning and characterization of a gene from Escherichia coli encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D -1-deoxyxylulose 5-phosphate , a common precursor for isoprenoid , thiamin , and pyridoxol biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci.1998;95(March):2105–10.

34. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. Nature. 1997 Nov 27;390(6658):407–9.

35. Roos DS, Crawford MJ, Donald RGK, Fraunholz M, Harb OS, He CY, et al. Mining the Plasmodium genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2002 Jan 29;357(1417):35–46.

36. Wilson RJMI. Progress with parasite plastids. J Mol Biol. 2002 May 31;319(2):257–74.

37. Couto AS, Kimura EA, Peres VJ, Uhrig ML, Katzin AM. Plasmodium falciparum : presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units.Biochem.1999;637:629–37.

38. D'Alexandri FL, Kimura EA, Peres VJ, Katzin AM. Protein dolichylation in Plasmodium falciparum. FEBS Lett. 2006 Nov 27;580(27):6343–8.

39. Sussmann R a C, Angeli CB, Peres VJ, Kimura E a, Katzin AM. Intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum biosynthesize vitamin E. FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies; 2011 Dec 15;585(24):3985–91.

40. Tonhosolo R, D'Alexandri FL, de Rosso V V., Gazarini ML, Matsumura MY, Peres VJ, et al. Carotenoid Biosynthesis in Intraerythrocytic Stages of Plasmodium falciparum. J Biol Chem. 2009 Feb 9;284(15):9974–85.

41. Goulart HR, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Duarte FAA, Katzin AM. Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in Plasmodium falciparum.Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004;48(7):2502–9.

42. Moura IC, Wunderlich G, Uhrig ML, Couto AS, Kimura LIAA, Peres VJ, et al. Limonene Arrests Parasite Development and Inhibits Isoprenylation of Proteins in

Plasmodium falciparum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001;45(9):2553–8.

43. Otto A, White JD, Simoneit BRT. Natural product terpenoids in Eocene and Miocene conifer fossils. Science. 2002 Aug 30;297(5586):1543–5.

44. Sybilska D, Asztemborska M. Chiral recognition of terpenoids in some pharmaceuticals derived from natural sources. J Biochem Biophys Methods. 2002 Dec 31;54(1-3):187–95.

45. Lopes NP, Kato MJ, Maia GS, Yoshida M, Planchart AR, Katzin AM. Antimalarial use of volatile oil from leaves of Virola surinamensis (Rol .) Warb . by Waia ˜ pi Amazon Indians. Etnhopharmacology.1999;67:313–9.

46. Crowell PL, Ren Z, Lin S, Vedejs E, Gould MN. Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. Biochem Pharmacol. 1994 Apr 20;47(8):1405–15.

47. Kamiya Y, Sakurai A, Tamura S, Takahashi N. Structure of rhodotorucine A, a novel lipopeptide, inducing mating tube formation in Rhodosporidium toruloides. Biochem Biophys Res Commun. 1978 Aug 14;83(3):1077–83.

48. Wolda S, Glomset JA. Evidence for Modification of Lamin B by a Product of. Biological Chemistry.1988;5–8.

49. Farnsworth CC, Wolda SL, Gelbs MH, Glomsetg JA. Human Lamin B Contains a Farnesylated Cysteine Residue *. Biological Chemistry. 1989;264(34):20422–9.

50. Chakrabarti D, Da Silva T, Barger J, Paquette S, Patel H, Patterson S, et al. Protein farnesyltransferase and protein prenylation in Plasmodium falciparum. J Biol Chem. 2002 Nov 1;277(44):42066–73.

51. Palsuledesai CC, Distefano MD. Protein prenylation: enzymes, therapeutics, and biotechnology applications. ACS Chem Biol. 2015 Jan 16;10(1):51–62.

52. Da Fonseca CO, Linden R, Futuro D, Gattass CR, Quirico-Santos T. Ras pathway activation in gliomas: a strategic target for intranasal administration of perillyl alcohol. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2008;56(4):267–76.

53. Gelb MH, Tamanoi F, Yokoyama K, Ghomashchi F, Esson K, Gould MN. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. Cancer Lett. 1995 May 8;91(2):169–75.

54. Yeruva L, Pierre KJ, Elegbede A, Wang RC, Carper SW. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. Cancer Lett. 2007 Nov 18;257(2):216–26.

55. Belanger JT. Perillyl Alcohol : Applications in Oncology Perillyl Alcohol.Alternative Medicine. 1998;3(6):448–57.

56. Afshordel S, Kern B, Clasohm J, König H, Priester M, Weissenberger J, et al. Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation--impact of Ras-/Rho-prenylation. Pharmacol Res. Elsevier Ltd; 2015 Jan;91:69–77.

57. Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell Cycle Arrest by the Isoprenoids Perillyl Alcohol , Geraniol , and Farnesol Is Mediated by p21 Cip1 and p27 Kip1 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells.Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2007;320(3):1163–70.

58. Elsonj CE, Gould MN. Inhibition of Type I and Type II Geranylgeranyl- Protein Transferases by the Monoterpene Perillyl Alcohol in NIH3T3 Cells.Biochemical Pharmacology. 1997;54:113–20.

59. Vivo I, He L, Mo H, Hadisusilo S, Qureshi AA, Elson CE. Biochemical and Molecular Roles of Nutrients Isoprenoids Suppress the Growth of Murine B16 Melanomas In Vitro.The Journal of Nutrition. 1997;(September 1996):668–74.

60. D'Alincourt Salazar M, da Silva RF, Da Fonseca CO, Lagrota-Candido J, Quirico-Santos T. Intranasal administration of perillyl alcohol activates peripheral and bronchus-associated immune system in vivo. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2014 Feb;62(1):59–66.

61. Bailey HH, Levy D, Harris LS, Schink JC, Foss F, Beatty P, et al. A Phase II Trial of Daily Perillyl Alcohol in Patients with Advanced Ovarian Cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2E96. Gynecol Oncol. 2002 Jun;85(3):464–8.

62. Bailey HH, Attia S, Love RR, Fass T, Chappell R, Tutsch K, et al. Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2008 Jun;62(1):149–57.

63. Serwer LP, James CD. Challenges in drug delivery to tumors of the central nervous system: an overview of pharmacological and surgical considerations. Adv Drug Deliv Rev. Elsevier B.V.; 2012 May 15;64(7):590–7.

64. Da Fonseca CO, Schwartsmann G, Fischer J, Nagel J, Futuro D, Quirico-Santos T, et al. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. Surg Neurol. 2008 Sep;70(3):259–66; discussion 266–7.

65. Da Fonseca CO, Simão M, Lins IR, Caetano RO, Futuro D, Quirico-Santos T. Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2011 Feb;137(2):287–93.

66. Trager W; JJ. Human Malaria parasites in continuous culture. Science (80-). 1976;193(August):673–5.

67. Kimura EA, Couto AS, Peres VJ, Casal OL, Katzin AM. N -Linked Glycoproteins Are Related to Schizogony of the Intraerythrocytic Stage in Plasmodium falciparum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1996;271(24):14452–61.

68. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J Parasitol. 1979 Jun;65(3):418–20.

69. Goodyer ID, Johnson J, Eisenthal R, Hayes DJ. Purification of mature-stage Plasmodium falciparum by gelatine flotation. Ann Trop Med Parasitol. 1994 Apr;88(2):209–11.

70. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. Antimicrob Agents Chemother. 2004 May;48(5):1803–6.

71. Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomedicine. 2003 Jan;10(6-7):499–503.

72. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.

73. Carroll RW, Wainwright MS, Kim K-Y, Kidambi T, Gómez ND, Taylor T, et al. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. PLoS One. 2010 Jan;5(10):1–12.

74. Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. Neuropathol Appl Neurobiol. 2006 Apr;32(2):177–88.

75. Trager W, Jenson JB. Cultivation of malarial parasites. Nature [Internet]. 1978 Jun 22 [cited 2014 Aug 28];273(5664):621–2.

76. Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. Plasmodium falciparum: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. Exp Parasitol. Elsevier Inc.; 2009 Feb;121(2):144–50.

77. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, et al. Novel Rapid , and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.2004;48(5):1807–10.

78. Johnson JD, Dennull R a, Gerena L, Lopez-Sanchez M, Roncal NE, Waters NC. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jun;51(6):1926–33.

79. Olagnier D, Costes P, Berry A, Linas M-D, Urrutigoity M, Dechy-Cabaret O, et al. Modifications of the chemical structure of terpenes in antiplasmodial and antifungal drug research. Bioorg Med Chem Lett. 2007 Nov 15;17(22):6075–8.

80. Arruda DC, D'Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SRB. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. Antimicrob Agents Chemother. 2005 May;49(5):1679–87.

81. Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katzin AM, Uliana SRB. Inhibitory activity of limonene against Leishmania parasites in vitro and in vivo. Biomed Pharmacother. Elsevier Masson SAS; 2009 Nov;63(9):643–9.

82. AbouLaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of Babesia parasites. Parasitol Int. Elsevier Ireland Ltd; 2010 Jun;59(2):278–82.

83. Campbell WE, Gammon DW, Smith P, Abrahams M, Purves TD. Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of Tetradenia riparia. Planta Med. 1997 Jun;63(3):270–2.

84. Duker-Eshun G, Jaroszewski JW, Asomaning WA, Oppong-Boachie F, Olsen CE, Christensen SB. Antiplasmodial activity of labdanes from Aframomum latifolium and Aframomum sceptrum. Planta Med. 2002 Jul;68(7):642–4.

85. Xu N, Shen N, Wang X, Jiang S, Xue B, Li C. Protein prenylation and human diseases: a balance of protein farnesylation and geranylgeranylation. Sci China Life Sci. 2015 Apr;58(4):328–35.

86. Perez-sala D. Department of Protein Science, Centro de Investigaciones Biologicas, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain. 2007;4456–72.

87. Eastman RT, Buckner FS, Yokoyama K, Gelb MH, Van Voorhis WC. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation. J Lipid Res. 2006 Feb;47(2):233–40.

88. Weiss L. Plasmodium berghei : A Mouse Model for the “ Sudden and ‘ Malarial Lung ’ Syndromes Death ” The rodent malaria parasite Plasmodium berghei is lethal in all mice whereas in hamsters infected with P . berghei did not since the mice did not become cyanotic.Experimental Parasitology. 1983;151:143–51.

89. Pedroni HC, Bettoni CC, Spalding SM, Dalla Costa T. Plasmodium berghei: development of an irreversible experimental malaria model in Wistar rats. Exp Parasitol. 2006 Jul;113(3):193–6.

90. Relationship II. Murine Malaria. 1971;102:98–102.

91. Nogueira F, Rosário VE Do. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the Plasmodium life cycle. Rev Pan-Amazônica Saúde. 2010 Sep;1(3):109–24.

92. Morgan-Meadows S, Dubey S, Gould M, Tutsch K, Marnocha R, Arzoomanin R, et al. Phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily continuously. Cancer Chemother Pharmacol. 2003 Nov;52(5):361–6.

93. Rénia L, Grüner AC, Snounou G. Cerebral malaria: in praise of epistemes. Trends Parasitol. 2010 Jun;26(6):275–7.

94. Hunt NH, Grau GE, Engwerda C, Barnum SR, van der Heyde H, Hansen DS, et al. Murine cerebral malaria: the whole story. Trends Parasitol. 2010 Jun;26(6):272–4.

95. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin J-C, van Rooijen N, Viguier M, et al. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. J Immunol. 2002;169(11):6369–75.

96. Marijon A, Bonnot G, Fourier A, Bringer C, Lavoignat A, Gagnieu M, et al. Efficacy of intranasal administration of artesunate in experimental cerebral malaria. Malaria Journal. 2014;1–10.

97. Islam F, Complete M. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial.Lancet. San Fr. 2005;717–25.

98. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): An open-label, randomised trial. Lancet [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;376(9753):1647–57.

99. Mturi N, Musumba CO, Wamola BM, Ogutu BR, Newton CRJC. Cerebral malaria: Optimising management. CNS Drugs. 2003. p. 153–65.

100. Touitou E, Waknine JH, Godin B, Golenser J. Treatment of malaria in a mouse model by intranasal drug administration. Int J Parasitol. 2006 Dec;36(14):1493–8.

101. Carvalho LJM, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Pelajo-Machado M, Lenzi HL. Germinal center architecture disturbance during Plasmodium berghei ANKA infection in CBA mice. Malar J. 2007;6:59.

102. Clemmer L, Martins YC, Zanini GM, Frangos J a, Carvalho LJM. Artemether and artesunate show the highest efficacies in rescuing mice with late-stage cerebral malaria and rapidly decrease leukocyte accumulation in the brain. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Apr;55(4):1383–90.