MÁRCIA FERREIRA DA SILVA

ESTUDOS *IN VITRO* DE POTENCIAIS ANTIMALÁRICOS NOS ESTÁGIOS
INTRAERITROCÍTICO DE ***Plasmodium falciparum***

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
2012

MÁRCIA FERREIRA DA SILVA

ESTUDOS *IN VITRO* DE POTENCIAIS ANTIMALÁRICOS NOS ESTÁGIOS
INTRAERITROCÍTICO DE ***Plasmodium falciparum***

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia 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 corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertação da USP (BDTD).

São Paulo
2012

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

Silva, Márcia Ferreira da.

Estudos *in vitro* de potenciais antimaláricos nos estágios intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* / Márcia Ferreira da Silva. -- São Paulo, 2012.

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: Potenciais alvos para a quimioterapia da malária.

Versão do título para o inglês: *In vitro* studies of potencial antimalarial intraeritrocítico stages of *Plasmodium falciparum*.

1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Sinergismo 4. Super expressão 5. Esqualestatina 6. Fitoeno sintase 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/SBIB0191/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Márcia Ferreira da Silva.

Título da Dissertação: Estudos *in vitro* de potenciais antimaláricos nos estágios intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*.

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. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 432/10 referente ao projeto intitulado: “*Caracterização das proteínas palmitoiladas e miristoiladas nas formas intraenritrocitárias de Plasmodium falciparum e investigação de potenciais inibidores destas modificações*” sob a responsabilidade de Márcia Ferreira da Silva, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de novembro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico esta Dissertação de Mestrado a minha avó Adalgiza (em memória) por ter sido luz na minha vida e admirar sempre os meus estudos e aos meus pais Maria Luzinete e Celecino por lutarem para que este sonho se torne realidade, aos meus irmãos Márcio, Marcílio e Marcos e a minha afilhada Júlia pessoas que transmitiram fé, amor, alegria, determinação, paciência, e coragem, tornando os meus dias mais felizes.

AGRADECIMENTOS

Deus quer apenas nosso bem e nossa felicidade, e nos dá os meios de sermos felizes.

Assim, primeiramente, agradeço a nosso Deus todo poderoso a oportunidade que ele me proporcionou de atingir este sonho tão almejado.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin, pelo acolhimento em seu laboratório, pela dedicação e competência com que me orientou durante este trabalho, pelo ensinamento a pensar e a amar a ciência, por fazer do aprendizado não um trabalho, mas um contentamento.

Agradeço a Dr^a. Emília Kimura pelos ensinamentos

A Heloisa Gabriel e o Dr. Mauro Azevedo pela confiança em ceder as linhagens transfectadas.

A minha amiga Valnice por estar disposta a me ouvir e me ajudar tanto profissionalmente como pessoalmente.

As minhas amigas Danielle, Raquel, Rose e Miluska, pelo companheirismo e amizade de todos os dias.

Aos meus amigos Rodrigo, Alexandre, André, Fabiana, Renata por estarem sempre dispostos a me ajudar e colaborarem com o meu trabalho.

Às professoras Dr^a. Silvia Uliana, Dr^a. Andreia Fogaça e Dr^a. Anita Strauss, por contribuírem com o meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos pela paciência, disposição e entusiasmo nos ensinamentos.

Aos meus amigos da microbiologia Rogério e Thati, pela força nos momentos difíceis.

Aos meus amigos que hoje são meus irmãos, Érik e Charlote.

A todo o pessoal do departamento que contribuíram de forma direta e indireta para realização desse trabalho.

Em memória a minha avó Adalgiza, que muito desejou que eu concluísse este curso de mestrado, mas chegou o momento em que ela não pode mais estar ao meu lado presente, mas estará sempre em meu coração e em meu pensamento.

Aos meus pais Celecino e Maria Luzinete que se doaram inteiramente e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. Por serem pessoas de muita garra, determinação e compreensão, que

iluminaram os meus caminhos com afeto e dedicação para que eu trilhasse-os sem medo e cheios de esperanças.

Aos meus irmãos Márcio, Marcilio e Marcos pelo incentivo ao estudo e apoio durante toda minha jornada acadêmica e profissional; por seus exemplos de honestidade, ética e vontade que guiaram meu caminho até aqui.

As minhas lindas sobrinhas Júlia e Lorena, são elas, o sentido da vida, e o motivo de todas nossas alegrias.

Aos meus padrinhos, Horácio e Salete, pelo amor e carinho de sempre.

Aos meus tios Otacílio e Eliete pela preocupação de todos os dias.

As minhas tias Graciete e Zélia e minha amiga Silvanir pela torcida de sempre e por todo o carinho.

Aos meus primos Joelbson e Júnior pelo carinho e por sempre acreditarem em mim.

Aos jovens Everton, Suellen, Emilli, Wellington, Letícia, Izabelly, pelo carinho e compreensão nas horas de estudo, assim como Danúbia e Tatiara pela força e amizade.

As minhas amigas Cris, Alexandra, Valéria, Élida, pela amizade valiosa.

Ao meu amor, Willyan, ofereço um agradecimento especial, por ter vivenciado comigo passo a passo todos os detalhes deste trabalho, ter me ajudado, por todo carinho dado nos momentos difíceis, pelo amor, respeito, por ter me aturado nos momentos de estresse, e por tornar minha vida cada dia mais feliz.

A vocês, não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que nos acontece agora, quando procuramos arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

**A Força Divina que rege os universos está dentro de nós (C. Torres Pastorino).
Assim, nunca devemos desanimar, mas sim perseverar sempre, pois desta
forma chegaremos ao sucesso. Com isso, colheremos, infalivelmente,
aquilo que houvermos semeado (Willyan Sérgio B. Mourão)**

RESUMO

Silva MF. Estudos *in vitro* de potenciais antimaláricos nos estágios intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Nesta dissertação, identificou-se que as drogas esqualestatina, fosmidomicina, risedronato, e nerolidol apresentam atividades sinérgicas e aditivas quando avaliadas como potenciais antimaláricos em cultura de *Plasmodium falciparum*. Este trabalho é o primeiro a demonstrar interações de potenciação ou adição entre potenciais antimaláricos que sabidamente atuam na via 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato/isoprenóides. Identificou-se que a esqualestatina inibe a biossíntese de fitoeno nas formas intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum*. Realizou-se testes de inibição para determinar o valor da IC₅₀ na linhagem pRM2-Fito-HA, na qual a enzima fitoeno sintase apresenta indícios de estar super expressa e encontrou-se um valor IC₅₀ de 5 µM para o isolado 3D7 enquanto que para a linhagem pRM2-Fito-HA foi de 30 µM, sugerindo que a enzima fitoeno sintase poderia ser o alvo da esqualestatina em *P. falciparum*, e provavelmente este composto pode ser um potencial antimalárico.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Sinergismo. drogas antimaláricas. Esqualestatina. Fitoeno sintase.

ABSTRACT

Silva MF. *In vitro* studies of potential antimalarial intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

In this thesis, we found that the drug squalastatin, fosmidomycin, risedronate, and nerolidol have synergistic and additive activity when evaluated as potential antimalarials in cultured *Plasmodium falciparum*. This work is the first to demonstrate additive or synergistic interactions between potential antimalarials where the target is the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate/isoprenoid pathway. It was found that squalastatin inhibits the biosynthesis of phytoene in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. Inhibition tests to determine the IC₅₀ value of the strain in pRM2-phyto-HA, in which the enzyme phytoene synthase could have been highly expressed, showed an IC₅₀ value of 5 µM to isolate 3D7, whereas for strain phyto-HA-pRM2 it was 30 µM, suggesting that the enzyme phytoene synthase could be the target of squalastatin at *P. falciparum*, and presumably this compound could be a potential

Keywords: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Synergism. antimalarial drugs. Squalastatin. Phytoene synthase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDP-ME	4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol
CDP-MEP	4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato
CMK	4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase
CTP	Citidina trifosfato
CDR	Determinação do tamanho da cadeia
DMAPP	Dimetilalil difosfato ou difosfato de dimetilalila
DOX	1-deoxi-D-xilulose
DOXP	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato
DTT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DXR	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutase
DXS	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase
FPP	Pirofosfato de farnesil
FPPS	Pirofosfato de farnesil sintase
GAP	Gliceraldeído 3-fosfato
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranil
GGPPS	Pirofosfato de geranilgeranil sintase
GPP	Pirofosfato de geranil
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico
HMBPP	1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-metil-glutaril-CoA
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória de crescimento de 50%
IPP	Isopentenil difosfato ou difosfato de isopentenila
MCS	2C-metil-D-eritritol-2, 4-ciclodifosfato sintase
MCT	2C-metil-D-eritritol, 4-fosfato citidina transferase
MecPP	2C-metil-D-eritritol 2, 4-ciclodifosfato
MEP	2C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MVA	Mevalonato
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
WHO	<i>World Health Organizatio</i>
μCi	MicroCurie

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i>	23
Figura 2- Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP.....	26
Figura 3- Via do mevalonato.....	28
Figura 4- Via MEP.....	30
Figura 5- Via MEP/Isoprenóides.....	33
Figura 6- Valor da IC ₅₀ isoladamente.....	54
Figura 7- Isoblograma da interação entre as drogas nerolidol e esqualostatina.....	57
Figura 8- Isoblograma das interações entre as drogas nerolidol e risedronato.....	58
Figura 9- Isoblograma das interações entre as drogas nerolidol e fosmidomicina..	59
Figura 10 - Isoblograma das interações entre as drogas risedronato e esqualostatina.....	60
Figura 11 - Isoblograma das interações entre as drogas fosmidomicina e risedronato.....	60
Figura 12 - Isoblograma das interações entre as drogas fosmidomicina e esqualostatina.....	61
Figura 13- Esquema do vetor pRM2-0202700-HA utilizado para super expressão em <i>P. falciparum</i>	62
Figura 14- Curva de crescimento entre as linhagens isolado 3D7, pRM2-Fito-HA e Fito-HA-cloneF.....	63
Figura 15A- Determinação do valor da (IC ₅₀) da droga esqualostatina em cultura sincrônica isolado 3D7 e das linhagens pRM2-Fito-HA e Fito-HA-cloneF, de <i>P. falciparum</i>	65
Figura 15B- Determinação do valor da (IC ₅₀) da droga nerolidol em cultura sincrônica do isolado 3D7 e da linhagem pRM2-Fito-HA de <i>P. falciparum</i>	65
Figura 16A- Esfregaço do isolado 3D7 de <i>P. falciparum</i>	66
Figura 16B - Alterações morfológicas do isolado 3D7 de <i>P. falciparum</i> sob ação inibitória da droga esqualostatina.....	66
Figura 17 - Efeito da esqualostatina sob a biossíntese de fitoeno nos estágios intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>	67
Figura 18 - Perfil de incorporação radioativa [³ H]GGPP do estágio esquizonte de <i>P. falciparum</i> , na linhagem pRM2-Fito-HA e isolado 3D7.....	69
Figura 19 - Perfil de incorporação radioativa [³ H]FPP do estágio esquizonte de <i>P. falciparum</i> , na linhagem pRM2-Fito-HA e isolado 3D7.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentrações das drogas utilizadas para o teste de inibição <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i>	48
Tabela 2- Concentrações testadas de cada droga.....	49
Tabela 3- Concentrações efetivas das (IC ₅₀) para esqualostatina, fosmidomicina, nerolidol e risedronato, administrados sozinhos e em combinações.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Histórico	17
1.2 Malária	19
1.3 Ciclo de vida dos plasmódios humanos	20
1.3.1 Ciclo no hospedeiro vertebrado	20
1.3.2 Ciclo no hospedeiro invertebrado	21
1.4 Tratamento	23
1.5 Isoprenóides	25
1.6 Biossíntese de isoprenóides	27
1.6.1 Via do Mevalonato (MVA)	28
1.7 Via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)	28
1.8 Biossíntese secundária de isoprenóides	30
1.9 Biossíntese de isoprenóides em <i>Plasmodium falciparum</i>	31
1.10 Prováveis inibidores da biossíntese de compostos isoprênicos	34
1.10.1 Ácido zaragózico (<i>Esqualestatina</i>)	34
1.10.2 Fosmidomicina	35
1.10.3 Risedronato	35
1.10.4 Terpeno nerolidol	36
1.11 Sinergismo	37
1.12 Enzima octaprenil pirofosfato sintase-fitoeno sintase como um possível alvo terapêutico	39
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	41
2.1 Justificativa	42
2.2 Objetivos	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	45
3.2 Sincronização dos parasitas por Plasmagel®	45
3.3 Sincronização dos parasitas por D-sorbitol	46
3.4 Separação dos estágios intraeritrocíticos	46
3.5 Teste de inibição - Microteste	47
3.6 Determinação <i>in vitro</i> do sinergismo entre as drogas nerolidol versus esqualestatina; fosmidomicina versus risedronato; risedronato versus esqualestatina; nerolidol versus fosmidomicina e nerolidol versus risedronato	48
3.7 Construção do isoblograma	49
3.8 Curva de crescimento entre o isolado 3D7 e a linhagem pRM2-Fito-HA	50

3.9 Marcação metabólica	50
3.10 Marcações metabólicas de culturas tratadas com esqualostatina	51
3.11 Extração de carotenóides	51
3.12 Extração do geranilgeranil pirofosfato – GGPP	51
3.13 Análise e purificação por <i>RP-HPLC</i> (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) de fitoeno e geranilgeranil pirofosfato (GGPP) nas formas esquizontes de <i>P. falciparum</i>	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Interações das drogas que atuam na via de compostos isoprênicos	54
4.2 Determinação <i>in vitro</i> de sinergismo entre as drogas que atuam na via de biossíntese de isoprenóide	57
4.3 Construção da linhagem pRM2-Fito-HA	61
4.4 Parâmetros de crescimento entre as linhagens 3D7, pRM2-Fito-HA e Fito-HA-cloneF	62
4.5 Ensaios de inibição <i>in vitro</i> nas linhagens 3D7, Fito-HA-cloneF e pRM2-Fito-HA com as drogas esqualostatina e nerolidol.....	64
4.6 Cromatografia líquida de alto desempenho (<i>RP-HPLC</i>) para analisar a biossíntese de fitoeno em parasitas tratados com esqualostatina	67
4.7 Análise comparativa dos produtos fitoeno e GGPP biossintetizados pelos parasitas dos isolados 3D7 e pRM2-Fito-HA.....	68
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79

1.1 Histórico¹

Desde a Antigüidade, a malária foi um dos grandes problemas da humanidade. “Príncipe dos demônios” era como os primeiros judeus que habitavam a região do Mediterrâneo, há aproximadamente 4.000 anos, se referiam à esta doença. Atribuídas a espíritos malignos e magia negra de feiticeiros. Agora, chamada de malária, paludismo, impaludismo, maleita, febre terçã ou quartã [1].

O grego Hipócrates no século V a.C., descreveu as diferenças da febre intermitente e da contínua, diferenciando esta doença das demais febris, além de relatar pela primeira vez a febre terçã e quartã, ele atribuindo os sintomas à ingestão de águas estagnadas e relacionou a doença com a estação do ano de maior umidade e os locais onde as pessoas afetadas viviam [1].

Durante séculos, pouco foi acrescentado sobre este mal e seu tratamento. A partir do século XVII, surgiu a preocupação com a doença, devido ao aumento dos números de casos [1].

Em 6 de novembro de 1880, o médico do exército francês Charles Louis Alphonse Laveran, trabalhando em Constantino, observou formas ovaladas e com pigmento no sangue de 148 dos 192 pacientes infectados e considerou que havia encontrado o parasita causador dessa doença. Ele o chamou de *Oscillaria malarie*.

Em 1881 o major do exército americano, George Sternberg, demonstrou com experimentos em animais que o *Bacillus malarie* não era o causador desta doença.

Três anos mais tarde, o nome *Plasmodium* apareceu pela primeira vez, descrito por Marchiafava e Celli, que observaram formas ovóides no interior das hemácias e descreveram como formas diferentes daquelas observadas por Laveran, o qual convenceu Louis Pasteur, no ano de 1884 [1].

Em 1897, o médico britânico Ronald Ross elucidou o modo de transmissão da doença, ao encontrar formas do parasita no interior de um mosquito que havia se alimentado com sangue de um portador da doença. O ciclo completo de desenvolvimento do parasita no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* foi obtido posteriormente pelos pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi em estudos realizados entre 1898 e 1899 [1].

¹ Camargo EP. Malária, maleita, paludismo. Ciência e Cultura. 2003;55(1). [2012 Sep 20]. Available from: <<http://who.int/www.portal.saude.gov.br>>

Na primeira metade do século XX, muitas pesquisas eram dedicadas ao controle da malária, especialmente no sentido de reduzir ou eliminar a presença de criadouros do vetor da doença, o que se mostrou bastante eficiente em algumas situações. Concomitantemente, pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas que combatessem o parasita também começaram a ser desenvolvidas [1].

Ainda visando a combater o vetor, em 1939, Paul Müller, na Suíça, descobriu as propriedades inseticidas do DDT, que havia sido sintetizado pelo estudante alemão Othmer Zeidler em 1894[1].

Com base nos conhecimentos adquiridos sobre o transmissor, nas características de inseticida residual do DDT e na existência de drogas efetivas para o tratamento muitos foram levados a crer na possibilidade da erradicação da doença no mundo. Impulsionou-se a elaboração da campanha para extirpá-la na Itália (1946-1950) e, depois, para o grande movimento de eliminá-la em escala mundial, coordenada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no período de 1957-1969 [2, 3]. A proposta da campanha era baseada em quatro fases: 1) preparatória: com reconhecimento das áreas afetadas e do problema epidemiológico, e treinamento de pessoal; 2) ataque: com controle do vetor por meio de aplicação de inseticidas nas casas e tratamento das pessoas; 3) de consolidação: com suspensão das medidas de controle e vigilância para possíveis surtos; 4) de manutenção e vigilância [2, 3].

Nos Estados Unidos e na maior parte da Europa, essa campanha, juntamente com novas práticas de agricultura e construção de casas, resultou no fim da doença. Na Índia, onde o programa foi considerado um exemplo, houve uma redução de 75 milhões de casos em 1958 para 50 mil em 1964 [2, 3].

Após 15 anos de campanhas de erradicação, a população mundial em risco foi reduzida de 70% para 41%. [2, 3]. Entretanto, após a década de 1970, o sucesso do programa não foi mantido devido ao alto custo, sendo desativado. A partir de 1970, começaram a ocorrer mais de 300 milhões de casos anualmente da doença e mais de 1 milhão de mortes eram atribuídas diretamente à malária, naquela época [2, 3].

Atualmente, são relatados 216 milhões de casos, com 655 mil casos de morte por ano, em regiões endêmicas. Dessas mortes, 90% estão concentradas na África, ocasionadas por *Plasmodium falciparum*, afetando principalmente crianças menores de cinco anos e gestantes [2].

1.2 Malária

A malária é uma doença comum e potencialmente fatal em muitas áreas tropicais e subtropicais. Uma grande parte da população mundial vive em área de risco, compreendendo a América Central, a América do Sul (Amazônia), a América do Norte (México), a África subsaariana, Índia, Sudeste da Ásia, Oriente Médio e ainda a Oceania [2].

Os agentes transmissores desta infecção são fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*. Os principais sintomas são: febre, mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura, além de outros sintomas.

O agente causador da doença é um parasita do filo Apicomplexa, família *Plasmodiidae* e do gênero *Plasmodium*. Existem mais de cem espécies deste gênero, mas somente cinco são causadoras da malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, dentre as quais somente as três primeiras estão presentes no Brasil, com a predominância do *P. vivax*, responsável por quase 85% dos casos notificados na Amazônia Legal, aproximadamente 20% dos casos são por *P. falciparum* e poucos casos por *P. malariae* foram notificados até o momento [3].

O *P. falciparum* é responsável por uma forma muito grave da doença, conhecida por *terça maligna*, devido ao fato do parasita, nas suas formas maduras, aderir aos vasos endoteliais e causar a obstrução destes, em especial no cérebro, ocasionando a malária cerebral [3].

O *P. vivax* causa uma doença mais branda, a *terça benigna*, responsável por causar *recrudescência* da doença após ter sido aparentemente curada devido ao parasita permanecer de forma latente em células hepáticas por grandes períodos [3].

O *P. malariae* é o agente causador da *febre quartã*, que causa acessos febris no organismo do hospedeiro humano em intervalos de 72 horas, tendo recaídas a longo prazo, podendo ressurgir no organismo depois de 30 ou 40 anos da primeira infecção [3].

Já o *P. ovale* é o responsável por outra forma de febre (a *febre terça benigna*), mas está restrito ao continente africano. Assim como ocorre com *P. vivax*, no *P. ovale*, os esporozoítas após invadirem o hepatócito podem permanecer em um estágio de dormência (os hipnozoítas). Esses podem iniciar sua replicação após meses, dando origem a esquizontes hepáticos que liberarão merozoítas na circulação capazes de

desenvolver novo ciclo intraeritrocítico, acarretando novas manifestações clínicas denominadas recaídas [4].

Por fim, o *P. knowlesi* é o agente causador da malária em macacos, porém também pode infectar os seres humanos [3]. Este parasita tem um ciclo de vida de 24 horas e pode dar origem a picos de febre diária que ocorrem de 9 a 12 dias após a infecção. Os sintomas podem ser atípicos, podendo ocorrer falência de órgãos [5].

1.3 Ciclo de vida dos plasmódios humanos

O ciclo de vida das diferentes espécies de *Plasmodium* é bastante complexo. O *P. falciparum* possui duas fases distintas (Figura 1). Uma das fases na qual acontece reprodução sexuada (esporogonia) no hospedeiro definitivo invertebrado; A outra fase é desenvolvida no hospedeiro vertebrado, em que ocorrem alguns ciclos de reprodução assexuada (esquizogonia) [6].

1.3.1 Ciclo no hospedeiro vertebrado

Nesta fase do ciclo de vida do parasita ocorre a sua reprodução assexuada (esquizogonia) e esse ciclo pode ser dividido em fase hepática e ciclo eritrocítico [4].

Ao picar o homem, os mosquitos infectados injetam uma pequena quantidade de saliva, que serve basicamente como anticoagulante e anestésico, na qual se encontram os esporozoítos. A fim de tentar localizar um capilar sangüíneo, o mosquito realiza um movimento chamado de probe, em que ele faz incursões com seu aparelho bucal por toda a região da picada, sempre injetando pequenas quantidades de saliva. Desta maneira, os esporozoítos podem ser lançados diretamente nos vasos sangüíneos ou tecidos adjacentes a estes. Os esporozoítos que foram lançados nos arredores dos capilares sangüíneos começam a realizar movimentos circulares chamados de *gliding* [9], que possibilita que eles adentrem aos capilares sangüíneos e, possivelmente, aos capilares do sistema linfático.

Após 15-45 min, os esporozoítos que atingiram a corrente sangüínea alcançam o fígado e acabam por invadir as células hepáticas.

Uma vez dentro do hepatócito, os esporozoítos transformam-se em células arredondadas chamadas criptozoítas, dando origem à fase hepática da doença, sendo difícil a detecção do parasita nessa fase. No hepatócito, os merozoítas

passam por uma divisão assexuada chamada esquizogonia tecidual, sendo chamados então de esquizontes hepáticos. A esquizogonia hepática dura seis dias no caso de *P. falciparum* [3].

Os esquizontes hepáticos quando maduros, acabam por se romper dentro do hepatócito, causando o rompimento destes e conseqüente liberação dos merozoítas diretamente nos capilares sangüíneos do fígado. Muitos dos merozoítas liberados são fagocitados e destruídos pelas células de *Kupffer*, mas os que sobrevivem invadem os glóbulos vermelhos do sangue, dando início ao ciclo intraeritrocítico [3].

Os merozoítas que invadiram as hemácias começam um desenvolvimento em seu interior, passando por formas chamadas de trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte. Na forma esquizonte, ocorre mais um evento de esquizogonia, dando origem a um determinado número de merozoítas por cada esquizonte, característico de cada espécie de plasmódio. Nas infecções causadas por *P. falciparum*, somente nos casos de infecções graves são observadas as formas maduras (trofozoíta e esquizonte) no sangue periférico, devido à citoaderência dessas formas nas paredes dos capilares profundos, fato este que causa a severidade desse tipo de malária [5].

Com a ruptura do esquizonte e da célula hepática, os merozoítas são liberados na corrente sangüínea e invadem novas hemácias, dando continuidade ao ciclo intraeritrocítico. Como há uma sincronia no desenvolvimento dos parasitas, o rompimento das hemácias infectadas com a liberação dos merozoítas na corrente sangüínea ocorre ao mesmo tempo, fato que culmina com os acessos de febre. Esses ciclos são extremamente regulares e característicos de cada espécie de plasmódio [4].

Depois de algum tempo e, por fatores ainda desconhecidos, a forma trofozoíta jovem se diferencia em gametócitos (masculino ou feminino). Os gametócitos não sofrem mais nenhuma divisão, sendo encontrados no sangue periférico. Sua vida média pode ser de 60 dias [4].

1.3.2 Ciclo no hospedeiro invertebrado

Enquanto os anofelinos machos se alimentam de néctar e seiva vegetal, as fêmeas necessitam de sangue em sua alimentação para o amadurecimento de seus ovos e para possibilitar a ovoposição [4].

Desta maneira, após uma fêmea do mosquito *Anopheles* ingerir sangue de uma pessoa infectada contendo as formas sexuadas do parasita (gametócitos feminino e masculino), inicia-se o processo dentro de seu trato digestivo. Os gametas femininos e masculinos se diferenciam em macrogameta e microgameta, respectivamente e, após a fecundação do macrogameta pelo microgameta, ocorre a formação do zigoto ou oocineto, poucos minutos após a ingestão do sangue. O zigoto é a única fase diplóide no ciclo de vida do parasita. Posteriormente, o zigoto migra pela camada única de células da parede do trato digestório do mosquito, alojando-se entre essas células e a membrana basal do epitélio. O oocineto se transforma em oocisto ao desenvolver uma grossa cápsula, a qual permite a passagem de nutrientes para a geração dos esporozoítas. Ele se rompe e libera os esporozoítas que alcançam a hemolinfa do inseto e migram para as glândulas salivares. No momento da picada, os esporozoítas poderão ser inoculados no hospedeiro vertebrado e, assim, dar seguimento ao ciclo do parasita [4].

A existência de reprodução sexuada pelos plasmódios possibilita o surgimento de novas cepas resistentes às drogas usadas para o controle da doença [6]. A (Figura 1) ilustra um esquema representativo do ciclo de vida do *P. falciparum*.

Figura 1- Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*.

Durante a alimentação, a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítas no hospedeiro humano (1). Os esporozoítas (2) podem então infectar as células hepáticas. Ao invadirem os hepatócitos (3), os esporozoítas transformam-se em criptozoítas (4) e após sofrer uma esquizogonia eles se transformam em esquizontes hepáticos (5). Com a ruptura dos esquizontes hepáticos (6), os merozoítas são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos (7). Após a invasão, os merozoítas começam a se desenvolver nos estágio anel (8), trofozoíta maduro (9) e esquizonte (10), culminando com a ruptura da hemácia e liberação de novos merozoítas, que darão continuidade ao ciclo eritrocítico. Alguns parasitas na forma anel se diferenciam em gametas (12), formando os gametócitos masculino e feminino (13). Ao serem ingurgitados pela fêmea do mosquito (14) durante a alimentação, os gametócitos masculino e feminino se diferenciam no estômago do inseto em microgameta e macrogameta, respectivamente (15). O macrogameta é fecundado pelo microgameta, gerando o zigoto ou oocineto (16) o qual migra para a membrana basal do epitélio estomacal do inseto. O oocineto então se transforma em oocisto (17). O oocisto sofre uma multiplicação esporogônica, gerando milhares de esporozoítas, que, após a ruptura do oocisto (18), irão se dirigir às glândulas salivares do inseto [12] [8].

1.3 Tratamento

Compostos contra a malária são conhecidos na China há 3.000 anos. Os incas, no século XVI, e depois o mundo todo, já usavam o extrato da casca da quina para o tratamento da malária. No século XVII, jesuítas encontraram o mesmo princípio ativo utilizado pelos indígenas do Brasil. O quinino é o princípio ativo da quina de uso contemporâneo [11].

Todavia, foi apenas em 1820 que os químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou identificaram o alcalóide quinina como o ingrediente ativo da casca da cinchona. Logo após sua descoberta, a demanda e uso da substância espalharam-se rapidamente pela Europa, América do Norte e Ásia. Até

meados do século passado, ela era o principal quimioterápico utilizado no combate à malária, seu uso só foi reduzido em função da sua alta toxicidade [11].

O quinina faz parte da família das quinolinas que incluem as 4-aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos. Estes compostos são ativos contra formas eritrocíticas de *P. falciparum* e *P. vivax*. O mais eficaz dentre esses fármacos foi a cloroquina, uma das substâncias antimaláricas mais utilizadas para a supressão e profilaxia da malária em muitas regiões endêmicas, foi o fármaco preferido até o surgimento da resistência do parasita. Atua como um agente esquizonticida e raramente produz sérios efeitos colaterais no tratamento profilático da doença. Outros esquizonticidas sanguíneos são a mefloquina e os derivados da artemisinina, atuando sobre os estágios assexuados sanguíneos do parasita [3].

As sulfadoxinas também atuam como excelentes esquizonticidas sanguíneos por meio da inibição da síntese de DNA. Entretanto, os parasitas da malária têm desenvolvido resistência a esses fármacos [3].

Muitos dos antifolatos são tóxicos ao homem e apresentam pouca tolerância oral. Esses fármacos são divididos em dois grupos de acordo com seus mecanismos de ação. O primeiro grupo, antifolatos do tipo I inclui compostos que são competidores do ácido *para*-aminobenzóico (PABA), interrompendo a formação do ácido di-hidrofólico, necessário para a síntese de ácidos nucleicos, através da inibição da di-hidropteroato sintase. Dois exemplos desta classe são as sulfonas e as sulfonamidas. A dapsona é a mais conhecida entre as sulfonas antimaláricas todavia, sua toxicidade tem desencorajado sua utilização. As sulfonamidas antimaláricas incluem a sulfadoxina, a sulfadiazina e o sulfaleno. Compostos desta família apresentam fácil absorção, mas difícil excreção pelo organismo. O segundo grupo de antagonistas do folato, antifolatos do tipo II, liga-se preferencialmente e seletivamente à enzima di-hidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) do parasita. Esta inibição interfere na habilidade do *Plasmodium* em converter o ácido di-hidrofólico em tetra-hidrofolato, cofator importante no processo de síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos [12].

Os inibidores da DHFR são potentes agentes esquizonticidas que atuam sobre formas assexuadas do parasita. Membros dessa classe de antifolatos incluem a pirimetamina e a trimetoprima. A pirimetamina atua contra o *P. falciparum* de forma lenta, não sendo indicada para o tratamento da fase aguda da malária. A combinação da pirimetamina com a sulfadoxina, chamada de Fansidar[®], mostrou-se

útil. Além disso, a pirimetamina foi combinada com outros fármacos, como a dapsona, o sulfaleno e a cloroquina. A trimetoprima tem um modo de ação similar à pirimetamina e, por ser também um fármaco de ação lenta, tem sido administrada em combinação com fármacos de ação mais rápida, como o sulfaleno [12].

Além desses medicamentos, alguns antibióticos que atuam na síntese de proteínas tais como tetraciclina, doxiclina e clindamicina são utilizados no combate à doença [3].

Ainda hoje, apesar de diversos esforços por parte de pesquisadores e agentes de saúde, não existem ações eficazes no controle da morbidade e mortalidade da doença. Tal fato refere-se a diversos fatores, dentre os quais, deve-se destacar a própria resistência dos parasitas aos quimioterápicos, como citado acima. Além disso, podem-se mencionar outros fatores, tais como, uso inadequado dos antimaláricos existentes, sistema imunológico debilitado do hospedeiro, serviços de saúde não adequados, falta de recursos sociais e financeiros apropriados, necessidade de uma política mais efetiva e consciente no combate efetivo da malária, entre outros fatores [3].

Nos últimos anos, a caracterização de produtos da biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* resultantes da via alternativa 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), vem ocupando um lugar em destaque como potencial alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o combate dessa doença. Isso se deve ao fato de que a maioria dos compostos produzidos por essa via são de suma importância para a sobrevivência de muitos organismos e ao fato de que a via de biossíntese presente no parasita é diferente da via de biossíntese de isoprenóides presente em humanos [10].

1.5 Isoprenóides

Os prenóis, também chamados de isoprenóides compreendem um vasto círculo de compostos, consistindo-se de um dos maiores grupos de produtos naturais, presentes em todos os organismos eucariontes e procariontes. São descritos aproximadamente 30.000 compostos isoprênicos na natureza, com um grande número de representantes de importância fisiológica e /ou farmacológica [16].

Dentre eles incluem-se compostos como ubiquinona, dolicois, compostos isoprênicos ligados às proteínas e RNA, hormônios em animais e plantas, carotenóides, vitaminas e óleos essenciais.

Os carotenóides e vitaminas são necessários para organismos fotossintéticos e possuem atividades antioxidantes. Ubiquinona, menaquinona e plastoquinonas estão envolvidos no transporte de elétrons. Dolicois, além de estarem envolvidos na glicosilação de proteínas, podem servir para ancoragem de proteínas às membranas.

Em plantas, hormônios de baixo peso molecular como giberilinas, ácido abscísico e brasinolides são fundamentais para o desenvolvimento desses organismos. O mesmo ocorre com hormônios sexuais esteróides e corticosteróides em animais, todos derivados de isoprenóides. Muitos antibióticos, fitoalexinas, repelentes e até drogas alucinógenas (LSD), possuem estruturas derivadas de compostos isoprênicos.

O conjunto dos compostos isoprênicos é biossinteticamente formado a partir de dois precursores, os quais são as unidades básicas dos isoprenóides: o pirofosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) [19, 20]. Assim, todo composto isoprênico possui um esqueleto carbônico básico com fórmula $(C_5H_8)_n$. Dependendo da classe de composto isoprênico, essa fórmula pode apresentar variações pela adição de hidroxilas, ciclização da molécula ou outras modificações.

Figura 2 - Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP.

1.6 Biossíntese de isoprenóides

1.6.1 Via do Mevalonato (MVA)

A via do Mevalonato (MVA), também conhecida como “via clássica”, desde sua descoberta, acreditou-se que era a responsável pela produção de poliisoprenóides em todos os organismos vivos.

Essa via começa com a conversão de duas moléculas de acetil-CoA a 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA. Esta molécula sofre então, em sequência, redução, fosforilação e descarboxilação, gerando IPP, que é transformado em seu isômero DMAPP pela enzima IPP isomerase (Figura 3). Após a descoberta que a enzima 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA-redutase (HMG-R), catalisa a reação de 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonato, sendo o ponto principal de regulação dessa via [20] e que o mevalonato é o primeiro composto único dessa via, ela começou a ser chamada de “via do mevalonato”. Vários inibidores para a HMG-R foram encontrados e são chamados de estatinas, usadas para a redução dos níveis de colesterol em humanos. As estatinas são moléculas que apresentam uma semelhança estrutural com HMG e atuam como inibidores competitivos da enzima HMG-R [21].

Figura 3 - Via do mevalonato.

Nos retângulos encontram-se os nomes de cada intermediário e em amarelo estão representados os nomes das enzimas da via. Em vermelho está indicado o local onde atuam as estatinas (HMG-R). Intermediários: HMG, 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA; MVA, mevalonato; MVA-P, mevalonato monofosfato; MVA-PP, mevalonato pirofosfato; IPP, pirofosfato de isopentenila; DMAPP, pirofosfato de dimetilalila. Enzimas: **AA-CoA tiolase**, acetoacetyl tiolase; **HMG-S**, hidroxi-metil-glutaril-CoA sintase; **HMG-R**, hidroxi-metil-glutaril-CoA redutase; **MVAK**, mevalonato quinase; **PMVAK**, mevalonato monofosfato quinase; **DPMVA descarboxilase**, mevalonato pirofosfato descarboxilase; **IPP isomerase**, pirofosfato de isopentenila isomerase; **DMAPP isomerase**, pirofosfato de dimetilalila isomerase.

1.7 Via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)

Outra via independente do mevalonato, também conhecida como 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP) ou 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) é responsável pela biossíntese de IPP e DMPP e está presente em plantas superiores, algas e alguns eucariontes, incluindo *P. falciparum* [44].

A via MEP começa com a condensação do piruvato com gliceraldeído-3-fosfato (GAP) produzindo 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP), o metabólito chave da via, por meio da 1-deoxi-D-xilulose (DOX) sintetase (DXS), posteriormente a enzima DOXP reductoisomerase (DXR) catalisa o rearranjo intramolecular e a redução na transformação da DOXP em MEP. Em seguida MEP é ligado à molécula de CTP para produzir 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) pirofosfato em uma reação catalisada pela MEP citidil-transferase (MCT). A enzima 4- (citidina-5'-difosfato)-2C-metil-eritritol quinase (CMK), dependente de ATP que fosforila o CDP-ME produzindo 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP). No quinto passo, o CDP-ME é convertido em 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodisfosfato (MEcPP) e CMP pela cMEPP sintase, onde este produto é reduzido a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) por uma redutase codificada pelo gene GcpE, posteriormente a enzima codificada pelo gene lytB converte HMBPP em IPP e DMAPP. Está presente em *P. falciparum* [44].

As enzimas da via MEP são apontadas como prováveis alvos para a ação de drogas, pois são encontradas em vários organismos patogênicos e por estarem ausentes em humanos [24,10]. A (Figura 4) ilustra os passos de biossíntese de isoprenóides pela via MEP.

Figura 4 - Via MEP.

Nos retângulos estão representados os nomes de cada intermediário da via e, em verde, o nome de cada enzima. Em vermelho está representado o local de atuação da fosmidomicina (DXR). TPP, tiamina pirofosfato. Intermediários: GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DOXP, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato; MEP, 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato; CDP-ME, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol; CDP-MEP, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato; MEcPP, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclopriofosfato; HMBPP, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-pirofosfato; IPP, pirofosfato de isopentenila; DMAPP, pirofosfato de dimetilalila. Enzimas: DXS, 1-deoxi-D-xilulose 5- fosfato sintase; DXR, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase; MCT, 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidina-transferase; CMK, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase; MCS, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclopriofosfato sintase; GcpE, hidrometilbutenil pirofosfato sintase; Lyt B, hidrometilbutenil pirofosfato redutase; IPP isomerase, pirofosfato de isopentenila isomerase e DMAPP isomerase pirofosfato de dimetilalila isomerase.

1.8 Biossíntese secundária de isoprenóides

Após a síntese do pirofosfato de isopentenila (IPP) e do pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), esses intermediários passam para o metabolismo secundário de isoprenóides, que consiste basicamente na elongação da cadeia isoprênica, passando posteriormente por diferentes modificações para a formação dos diferentes produtos derivados da biossíntese de isoprenóides.

Inicialmente, uma molécula de IPP é ligada com uma molécula de DMAPP, por meio de enzimas chamadas preniltransferases, dando origem ao pirofosfato de geranila (GPP, 10 carbonos). O GPP é ligado a um IPP, originando o pirofosfato de farnesila (FPP, 15 carbonos), que, por sua vez, é ligado a mais uma molécula de IPP, dando origem ao pirofosfato de geranilgeranila (GGPP, 20 carbonos). A partir desse ponto, a cadeia isoprênica pode continuar a ser alongada pela adição de moléculas de IPP, formando diversos produtos isoprênicos que desempenham relevante importância em processos fisiológicos, como as ubiquinonas e vitaminas e carotenóides.

A maioria das eubactérias utiliza somente para a biossíntese dos precursores isoprênicos uma das duas vias (MVA ou MEP) [22]. O *Streptomyces* é à exceção do reino fungi, pois utiliza as duas vias em diferentes fases do ciclo de vida; diferindo dos demais organismos representantes dos reinos arqueobactéria, fungi e metazoa, os quais utilizam exclusivamente a via MVA [22].

As plantas utilizam ambas as vias, localizadas em diferentes compartimentos/organelas. A via MEP sintetiza IPP e DMAPP nos plastídios, e a via do MVA produz IPP no citoplasma [26].

1.9 Biossíntese de isoprenóides em *Plasmodium falciparum*

Jomaa et al. [44] caracterizaram dois genes da via MEP em *P. falciparum*, que codificam as DOXP sintase e DOXP redutoisomerase, inibida esta pela droga fosmidomicina. A via MEP biossintetiza as unidades IPP e DMPP responsáveis pela biossíntese de compostos isoprenicos [27]

Os produtos isoprênicos estão sendo caracterizados em *P. falciparum* por meio de marcações metabólicas com os precursores radioativos $[1-^3\text{H}]$ FPP e $[1-^3\text{H}]$ GGPP[10].

No entanto ainda não está claro quais desses produtos finais do metabolismo de isoprenóides são essenciais para a sobrevivência do parasita [10] e Yeh E et al.[28], demonstraram que a única função importante do apicoplasto, no ciclo intraeritrocítico, é a biossíntese de isoprenóides.

O IPP e o DMAPP são precursores para a síntese de isoprenoídes lineares (GPP, FPP e GGPP), que são intermediários para biossíntese de diferentes produtos tais como: dolícolis de 11/12 unidades isoprênicas e seus derivados

fosforilados, cadeias isoprênicas ligadas ao anel benzoquinona coenzima Q de 8 e 9 unidades, menaquinona, proteínas isopreniladas e carotenóides [10]. Foi demonstrado que nos estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum* o nerolidol inibe a biossíntese de dolicol, ubiquinona e proteínas isopreniladas, estas últimas também são inibidas por risedronato [10].

Em 2005, Tonhosolo et al. [31] clonaram e expressaram a enzima octaprenil pirofosfato sintase (OPPS) de *P. falciparum* cuja função é o alongamento da cadeia isoprênica que se liga ao anel benzoquinona. Em 2009, este mesmo grupo de pesquisa identificou uma via ativa de biossíntese de carotenóides nas fases intraeritrocíticas de *P. falciparum* e identificou a primeira enzima da via a fitoeno sintase. Esta enzima é bifuncional, pois possui atividade também para OPPS [31].

Todos os carotenóides são derivados da biossíntese da via de isoprenóides e possuem uma estrutura poliisoprênica, uma cadeia longa com duplas ligações e uma simetria bilateral em torno da ligação dupla central. Sua biossíntese começa com a condensação de duas moléculas de GGPP (C₂₀), para formar o fitoeno (C₄₀) [32].

Diferentes carotenóides são derivados essencialmente por modificações na sua estrutura, tais como ciclização do grupo entre outras resultando em suas cores características e propriedades antioxidantes [34].

A biossíntese de carotenóides é um alvo atrativo para o estudo, uma vez que é essencial em algas, plantas superiores, bactérias e fungos, mas está ausente em mamíferos, e os seus produtos estão envolvidos em muitas funções metabólicas importantes [33].

O norflurazon, um herbicida que inibe a biossíntese de carotenóides em plantas superiores e microalgas, foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *P. falciparum* [32] e a esqualostatina inibe a fitoeno sintase em plantas, como descrita mais detalhadamente no item 1.10.1.

A presença da via ativa para a biossíntese de carotenóides em *P. falciparum* nos remete a dar atenção ao apicoplasto. Por ser uma organela muito similar aos plastídios de plantas, acredita-se que possa apresentar o mesmo perfil metabólico [15,16], em que a via MEP é utilizada para a biossíntese de carotenóides e vitaminas A, E e K, entre outros produtos, até então considerados de biossíntese exclusiva em organismos fotossintéticos e essenciais da dieta humana.

Contudo, o *P. falciparum* pode sintetizar certas vitaminas como menaquinona [17] e em 2011, Sussmann et al.[35] identificou a biossíntese de α -tocoferol (vitamina

E) nos três estágios intraeritrocítico do parasita e o ácido úsnico como inibidor desta biossíntese.

Pelo fato da via de biossíntese desses compostos e também a via de carotenóides serem ausentes em humanos, elas podem ser exploradas como um novo alvo para desenvolvimento de drogas antimaláricas. A Figura 5 representa os compostos isoprênicos descritos em *P. falciparum* e os locais de atuação das drogas fosmidomicina, risedronato, nerolidol e esqualostatina, sendo esta última descrita somente em plantas [36].

Figura 5 - Via MEP/ Isoprenóides.

Em azul estão os nomes de cada enzima. Nos retângulos estão representados os nomes dos compostos isoprênicos que já foram caracterizados em *P. falciparum*. Em vermelho está representado os nomes das drogas, fosmidomicina, risedronato, nerolidol e esqualestatina e o local de atuação. A esqualestatina está descrita em plantas, e os demais compostos estão descritos em *P. falciparum*.

1.10 Prováveis inibidores da biossíntese de compostos isoprênicos

1.10.1 Ácido zaragózico (*Esqualestatina*)

O ácido zaragózico A pertence à família de compostos naturais, provinda de metabólicos fúngicos, e é um ácido carboxílico. Sua estrutura molecular é o $C_{35}H_{43}O_{14}Na_3$ (2,8-dioxobiciclo [3.2.1] - octano-3 núcleo do ácido, 4,5-tricarboxílico) [36].

Estudos têm demonstrado que este composto, conhecido também como esqualestatina apresenta atividade contra a enzima fitoeno sintase em plantas [36] e como consequência inibe a biossíntese de carotenos.

Em outros organismos este composto é um potente inibidor competitivo da enzima esqualeno sintase, responsável pela biossíntese de esterol em humanos e/ou animais na via do mevalonato [37].

Os inibidores da biossíntese de colesterol são de grande importância, pois podem ser utilizados no tratamento de hipercolesterolemia e também são eficazes como agentes antifúngicos [38].

Esqualeno sintase é a primeira enzima comprometida na síntese de esteróis, que catalisa a condensação de dois pirofosfato de farnesila (FPP) para formar um intermediário estável, o pirofosfato de pré-esqualeno que, posteriormente, é reduzido para formar esqualeno [37, 39]. A estrutura geral do ácido zaragózico é um análogo da estrutura do pirofosfato pre-esqualeno, sendo um potente inibidor da enzima esqualeno sintase em mamíferos, *T. gondii* [40] e fungos [37].

Os inibidores de esqualeno sintase são inibidores seletivos da biossíntese do esterol, sendo que para a sua utilização nos seres humanos, a síntese de outros isoprenóides essenciais não deve ser afetada [38].

Bergstrom et al. [37] Hasumi et al. [39] e S. Lindsey et al. [41] relataram que a inibição da esqualeno sintase pelo ácido zaragózico, caracteriza este composto como um inibidor competitivo pelo fato de mimetizar o substrato FPP. Eles demonstraram que este composto é capaz de inibir também as etapas seguintes da reação de síntese de esqualeno devido competir com o sítio ativo da enzima. Outros inibidores desta enzima estão sendo descritos na literatura, como análogos do precursor FPP [41].

1.10.2 Fosmidomicina

A fosmidomicina é um antibiótico, originalmente isolado de *Streptomyces lavendulae*, um agente antibacteriano, derivado do ácido fosfônico com potente atividade contra organismos gram-negativa, amplamente utilizada no tratamento de infecções do trato urinário [42, 43].

Estudos realizados por Jomaa H et al. [44] demonstraram que a fosmidomicina e um análogo a este antibiótico o FR900098, inibem a enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR) que catalisa a redução da DOXP em MEP.

Nos estudos em camundongos, houve uma queda na parasitemia chegando a <1% e depois de 8 dias estavam curados, porém, quando o tratamento foi feito em 4 dias observou-se recrudescência [44], indicando que a monoterapia com fosmidomicina ou seu análogo pode não ser suficiente para os casos clínicos de malária [45, 46].

Estudos de triagem clínica utilizando a fosmidomicina em combinação com a clindamicina foram promissores no tratamento da malária [47]. No entanto, em outro estudo com voluntários humanos, utilizando a fosmidomicina em interação com outros antimaláricos de uso clínico utilizados, observou-se uma recrudescência em nove dos 28 indivíduos que foram acompanhados por um período de quinze dias de tratamento [48], indicando que a monoterapia com fosmidomicina poder não ser suficiente nos casos clínicos de malária.

1.10.3 Risedronato

Risedronato (1-hidroxi-2-3-piridinil etilideno bisfosfônico) é uma droga utilizada para reabsorção óssea, comercialmente disponível [49]. Diminui o risco de fraturas vertebrais em mulheres pós menopausa com osteoporose [50], utilizado também em casos da doença de Paget, hipercalcemia causada por doença maligna, e metástase de tumor no osso [51] e no controle de osteoartrite [52].

Os efeitos na reabsorção óssea dos bisfosfonatos contendo nitrogênio (alendronato, risedronato, ibandronato, e zoledronato) sobre as células osteoclastos, parecem resultar da sua atividade inibitória da enzima pirofosfato de farnesila sintase (FPPs) [49, 53].

Em outros organismos, o risedronato apresentou atividade antibacteriana, anticancerígena [60] e antiparasitária [54].

Os efeitos antiparasitários de bisfosfonatos contra *Leishmania* ssp [55], *Giardia lamblia* [56], *Entamoeba histolytica* [57], *Trypanosoma brucei* [58], *T. gondii* [59], *Trypanosoma cruzi* [55], foram determinados tanto *in vitro* como *in vivo*. Singh et al., em 2010 demonstraram a atividade inibitória do risedronato em *P. berghei* na fase hepática [63]. Recentemente, Jordão et al. [64] demonstraram a atividade antiplasmódica desta droga em *P. falciparum* *in vitro* como também *in vivo* em *P. berghei*, e confirmaram a inibição da isoprenilação de proteínas. O possível mecanismo de ação desta droga é a inibição da biossíntese de FPP e GGPP além de inibir a transferência de FPP às proteínas [64].

1.10.4 Terpeno nerolidol

Diferentes pontos da via de biossíntese de isoprenóides podem ser utilizados como alvos quimioterápicos para o tratamento da malária.

Dentre alguns terpenos estudados como inibidores dos compostos isoprênicos destaca-se o nerolidol, que é um isômero de farnesol (versão alcoólica – sem o grupo pirofosfato do substrato farnesil pirofosfato de vários compostos isoprênicos), derivado de uma família de compostos naturais de plantas, sendo formado a partir de cinco unidades isoprênicas.

Os terpenos são conhecidos como: monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos) e sesterpenos (25 carbonos), ou seja, são conhecidos de acordo com o número de unidades isoprênicas [65].

Estudos realizados em 2002 demonstraram que o nerolidol inibe a biossíntese da cadeia isoprênica ligada à coenzima Q em *P. falciparum*. Esta molécula está envolvida no transporte de elétrons, sendo assim a cadeia respiratória provavelmente estará sendo afetada [29]. Nerolidol também é capaz de inibir a enzima octaprenil pirofosfato sintase em *P. falciparum*, envolvida no alongamento de cadeias isoprênicas ligadas a coenzima Q [31].

Diversos trabalhos identificaram a atividade antibacteriana, antitumoral e antiparasitária apresentada por terpenos [30, 66]. Como esses compostos apresentam estruturas do tipo poliisoprenóides semelhantes aos intermediários da biossíntese de isoprenóides, infere-se que a inibição do parasita ocorra por meio da

competição com o substrato enzimático, seja no alongamento da cadeia isoprênica, formando um composto diferente, ou por bloqueio do sítio ativo da enzima que aumenta as unidades isoprênicas [31].

Outros terpenos como limoneno, linalol, farnesol, ácido farnesiltiosalicílico (FTS), foram utilizados em culturas de *P. falciparum* e apresentaram uma atividade inibitória [30].

O limoneno possui atividade inibitória *in vitro* frente às enzimas farnesil e geranylgeranyl transferase tanto de células de mamíferos quanto de leveduras. Em *P. falciparum* o limoneno inibiu a isoprenilação de proteínas nas fases intraeritrocíticas [23]. O Linalol tem demonstrado efeitos antifúngicos e antibacterianos [68] e atividade leishmanicida [69].

Correl et al. [70], demonstraram que o farnesol acelera a degradação da enzima HMG-R em células Met-18b-2, indicando que este sesquiterpeno pode interferir na regulação da enzima [70].

O ácido farnesiltiosalicílico (FTS) é uma droga modificada a partir do farnesil pirofosfato [71] e exerce uma ação competitiva pelo sítio de ancoragem de proteínas *Ras* à membrana [22, 71, 72].

Além disso, tem se caracterizado proteínas farnesiladas e geranylgeraniladas em *P. falciparum* e sua inibição por terpenos e FTS [30].

Sabe-se que os terpenos também interferem em outros mecanismos celulares, como a inibição e /ou indução de atividade enzimática, ação antioxidante, sequestro de reativos metabólicos e indução de apoptose [71, 73,76].

1.11 Sinergismo

A resistência a múltiplas drogas antimaláricas está se tornando um problema cada dia maior no controle da doença [86].

Os composto, quando administrado concomitantemente com outro, podem apresentar diferentes efeitos do que se este fosse empregado isoladamente, tais como, diminuir a toxicidade, atraso ou prevenção no desenvolvimento da resistência de drogas e os efeitos benéficos das interações medicamentosas [87].

A interação potencial de drogas é a expressão que se refere às possibilidades de que uma possa alterar os efeitos farmacológicos de outra administrada concomitantemente. O resultado final pode ser a intensificação, inclusive com o

aparecimento de efeitos tóxicos, a diminuição dos efeitos de uma ou de duas drogas, até o aparecimento de novo efeito que não é observado com nenhum dos dois fármacos usados isoladamente [87].

Podemos obter três tipos básicos de interações entre medicamentos, tais como: sinergismo de adição, onde o efeito final é igual à soma dos efeitos das duas drogas isoladas; sinergismo de potenciação, onde o efeito final é maior que a soma dos efeitos individuais; antagonismo, onde uma droga antagoniza o efeito da outra [87].

Na busca de combinações eficazes, alguns medicamentos antimaláricos, tais como, malarone (a combinação de atovaquone e proguanil) [88], lapdap (a combinação de cloroproguanil e dapsona), e coartem (a combinação de artemisinina e lumefantrina), tornaram-se disponíveis ou estão em desenvolvimento. Outras terapias de combinações envolvendo derivados de artemisinina como artesunato-mefloquina possuem muitos benefícios, acreditando ser muito eficaz contra a resistência às drogas [48].

Espera-se que a quimioterapia de combinação retardará o aparecimento da resistência aos novos agentes e reduzirá os efeitos da resistência aos agentes existentes [86, 89].

As interações *in vitro* entre antiplasmodiais são representadas por um isoblograma, do qual proporcionam um fundo essencial para estudos clínicos. No entanto, eles não necessariamente determinam a eficácia de uma combinação no hospedeiro, uma vez que isto também depende das características farmacocinéticas dos compostos.

O proguanil é um pró-fármaco que é metabolicamente ciclizado a cicloguanil. Este composto é pouco tóxico e é útil como agente profilático, destruindo parasitas durante a passagem para a corrente sangüínea antes que invadam as hemácias [12]. No entanto quando associado com atovaquona (ATV) é capaz de potencializar o efeito sobre o transporte de elétrons ou potencial de membrana mitocondrial, apresentado por ATV, resultando em um efeito sinérgico, sendo comercializado como malarone [48].

Em 2002, Wiesner, J et al.[48] demonstraram evidências de antimalárico com atividade sinérgica entre a fosmidomicina e os antibióticos lincosamida e lincomicina com clindamicina *in vitro* e *in vivo* [48].

A lincomicina é um precursor natural da clindamicina que inibe a síntese protéica nos ribossomos tanto dos procariotos como também no apicoplasto. O fato da

fosmidomicina inibir a enzima DOXR, uma enzima que é localizada no apicoplasto, pode ser uma explicação para o efeito sinérgico observado com as lincosamidas. Possivelmente, a clindamicina, facilita o transporte de fosmidomicina dentro parasita ou no apicoplasto por um mecanismo ainda desconhecido [48].

1.12 Enzima octaprenil pirofosfato sintase-fitoeno sintase como possível alvo terapêutico

A super expressão do gene pode ser uma estratégia alternativa para confirmar a função de proteínas como também a identificação de inibidores.

Uma vez que a bifuncionalidade da enzima octaprenil pirofosfato sintase-fitoeno sintase foi identificada [32], Mauro Azevedo e Heloisa Gabriel, em estudos utilizando essa enzima, empregaram ferramentas moleculares para a super expressão do gene que codifica esta enzima, visando estudos funcionais e fisiológicos, bem como a identificação de inibidores.

Há pouco mais de uma década, conseguiu-se transfectar os primeiros parasitas, abrindo uma nova era para o estudo da biologia molecular e bioquímica de proteína [77, 78].

Com o objetivo de investigar aspectos da biologia do parasita relacionados à resistência a drogas, vários estudos foram publicados utilizando a transfecção de genes, noucates, bem como a super expressão de genes modificados [79, 80].

O desenvolvimento de ferramentas para a manipulação genética dos parasitos contribui substancialmente na compreensão da biologia do parasita, principalmente por super expressão de genes. A regulação dos níveis de expressão gênica de parasitas transfectados permite investigar os fenótipos, ao ter diferentes quantidades de proteína expressa [81].

A enzima octaprenil pirofosfato sintase como citado acima é responsável por biossintetizar produtos de C₄₀, sendo o composto nerolidol seu inibidor [31].

Como mencionado anteriormente também é capaz de formar o fitoeno, o primeiro carotenóide, dos quais são necessários para os organismos fotossintéticos e atuam como antioxidantes e são encontrados em bactérias não-fotossintéticas [82]. Em plantas são biossintetizados dentro do plastídio utilizando a via MEP [83], em *P. falciparum*, a via MEP ocorre no apicoplasto, o qual se acredita que possa ter derivado do ancestral fotossintético, cianobactéria, devido às evidências bioquímicas,

morfológicas e filogenéticas [84, 85]. Porém os carotenóides podem ser apenas um resquício evolutivo, sem função para o parasita. Contudo, faz-se necessário o estudo da importância destes produtos isoprênicos, no ciclo intraeritrocítico do parasita. Além de analisar os efeitos da droga esqualestatina que supostamente atua na enzima fitoeno sintase, esses estudos podem abrir novas possibilidades no desenvolvimento de drogas antimaláricas, uma vez que essa via não está presente em humanos.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

A malária atualmente é uma das principais parasitoses humanas e um dos principais problemas de saúde mundial, especialmente nos países africanos [2].

A resistência aos antimaláricos é um dos principais obstáculos para o combate da doença [3]. Diante desse fato, o estudo de alternativas terapêuticas que sejam eficazes e acessíveis para a população, adquire vital importância.

O conhecimento sobre a bioquímica, biologia e fisiologia dos parasitas abre novas alternativas no estudo da doença.

Na última década, a biossíntese de isoprenóides tem sido apontada como um importante alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos contra os parasitas causadores da malária humana por ser diferente da existente em seu hospedeiro vertebrado (via do mevalonato).

Nosso grupo, nos últimos anos, vem identificando e caracterizando os compostos isoprênicos, que são biossintetizados pela via MEP em *P. falciparum*.

Compostos que atuam na inibição do metabolismo primário de isoprenóides pela inibição direta das enzimas presentes na via MEP como a fosmidomicina que atua na enzima DOXP, tem se mostrado uma área promissora, com testes clínicos já realizados em humanos.

Outro composto que visa à inibição do metabolismo secundário de isoprenóides, é a droga esqualostatina que supostamente atua na enzima fitoeno sintase em plantas [36].

Além disso, o composto nerolidol é capaz de inibir a elongação da cadeia de compostos isoprênicos, atuando na enzima octaprenil pirofosfato sintase e o composto risedronato, foi mostrado recentemente que inibe a enzima bifuncional FPPS de *P. falciparum* e consequentemente a isoprenilação de proteínas.

Portanto, especula-se que as drogas possam agir em diferentes alvos, podendo levar a um melhor efeito sistêmico quando atuam em conjunto, conduzindo a uma desorganização na fisiologia do parasita, impedindo o seu desenvolvimento.

O presente trabalho visa analisar os efeitos das drogas associadas que atuam em diferentes pontos da via MEP em formas intraeritrocíticas de *P. falciparum* e analisar os efeitos das drogas esqualostatina e nerolidol sob a enzima octaprenil pirofosfato sintase – fitoeno sintase em linhagem geneticamente modificada.

2.2 Objetivos

- a) Testar combinações das drogas e determinar se há potencialização da ação observando a ocorrência de sinergismo ou antagonismo entre as drogas esqualestatina e nerolidol, risedronato e fosmidomicina;
- b) investigar os efeitos das drogas esqualestatina e nerolidol sob a enzima octaprenil pirofosfato sintase – fitoeno sintase *in vitro* utilizando linhagens de parasitas geneticamente modificadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Os experimentos foram realizados utilizando o isolado NF54 de *P. falciparum*, clone 3D7, e a linhagem pRM2-Fito-HA geneticamente modificada por Mauro Azevedo e Heloisa Gabriel em 2011. Os parasitas foram cultivados segundo metodologia descrita por Trager e Jensen. [90] e modificada por Kimura et al. [14].

Os mesmos foram mantidos em eritrócitos (A e/ou O⁺) e meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 25 mM de Hepes, 21 mM de bicarbonato de sódio, 370 µM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 µg/ml de gentamicina (Sigma) e 0,5% de Albumax[®] (Gibco-BRL Life Technologies). As culturas foram mantidas em garrafas plásticas de 75 cm², contendo 20 ml de meio de cultura e hemácias suficientes de modo a obter um hematócrito de 3% a 37 °C, e sob uma mistura gasosa de 5,05% de CO₂, 4,93% de O₂ e 90,02% de N₂, onde o meio de cultura foi trocado diariamente.

O desenvolvimento e a multiplicação dos parasitas foram monitorados diariamente por observação microscópica por meio de esfregaços corados com Panótico[®] (LB Laborclin).

Para o cultivo da linhagem pRM2-Fito-HA foi adicionado ao meio RPMI 2,5 nM da droga WR99210 (inibidor da dihidrofolato redutase - hDHFR) [91].

3.2 Sincronização dos parasitas por Plasmagel[®]

Para sincronizar a cultura no estágio maduro esquizonte, os eritrócitos foram centrifugados por 1.800 xg por 10 minutos, seguidos da proporção de 1 ml de parasita para 1,4 ml de RPMI 1640 contendo 0,5% de Albumax[®] e 2,4 ml da solução de Plasmagel[®] 6% (p/v) (Laboratoire Roger Bellon, Neuilly sur Seine, France) em solução salina. A solução foi incubada a 37 °C por 20 minutos. Após o tratamento, os eritrócitos foram transferidos ao meio de cultura para obtenção de um hematócrito final de 3% (v/v) [92].

Para obtenção de uma cultura sincrônica foi realizado primeiramente Plasmagel e no próximo ciclo foi realizada uma sincronização por D-sorbitol (descrita no item 3.3).

3.3 Sincronização dos parasitas por D-sorbitol

Para sincronizar a cultura no estágio trofozoíta jovem (1-10 horas após a invasão), culturas de parasitas possuindo mais de 10% da parasitemia no estágio trofozoíta jovem foram centrifugadas a 2.000 xg, e o precipitado resultante foi adicionado a uma solução de D-sorbitol 5% (5 g de D-sorbitol / 100 ml de água destilada) pré-aquecida a 37 °C, na proporção de 200 µl de precipitado para 5 ml de D-sorbitol 5% (p/v) como descrito por Lambros et al. [93]. Os parasitas foram então incubados a 37 °C por 5 minutos e centrifugados a 1.800 xg por 10 minutos. Decorridos esses passos, foram imediatamente reintroduzidos ao cultivo normal. O desenvolvimento e a multiplicação deles foram analisados por esfregaços corados pelo Panótico.

3.4 Separação dos estágios intraeritrocíticos

Cada estágio parasitário de *P. falciparum*, trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte foi purificado por um gradiente descontínuo de Percoll® (Pharmacia Chemicals, Uppsala, Sweden) 40/70/80% como descrito por Braun-Breton. [94]. O qual separa esquizontes (30 - 45 horas) na fase de 40%, trofozoíta (20 – 30 horas) na interfase de 70/80%, em camada de trofozoíta jovem (1 – 20 horas) e eritrócitos não infectados, no fundo do tubo.

Dois mililitros de cultura foram adicionados em tubos de vidro Corex (Du Pont™, USA) de 18 ml contendo 2, 4 e 3 ml das soluções de Percoll® de 80, 70 e 40%, respectivamente, e centrifugados a 10000 xg por 30 minutos a 25 °C. Nessas condições, as formas esquizontes ficam na fração 40%, trofozoítas entre 70 e 80% trofozoítas jovens e hemácias não infectadas na fração de 80%. Os parasitas foram então coletados e lavados 3 vezes com PBS (*Phosphate buffer saline* - 6 mM de KH_2PO_4 , 30 mM de Na_2HPO_4 , pH 7,4, 120 mM de NaCl e 11 mM de glicose).

Os volumes dos *pellets* após marcação metabólica descrita no item 3.9, de cada estágio foram quantificados igualmente entre as duas linhagens (3D7 e pRM2-Fito-HA) e congelados em nitrogênio líquido para posterior extração dos produtos e futura análise.

3.5 Teste de inibição – Microteste

Com o intuito de avaliar a ação das drogas no crescimento e desenvolvimento dos parasitas, primeiramente, realizaram-se metodologias como descrito acima, para obter uma cultura sincrônica. O microteste seguiu metodologia descrita por Desjardins et al. [95].

A parasitemia inicial utilizada foi de 0,5% de *P. falciparum* no estágio trofozoíta jovem com um hematócrito de 3%.

O microteste foi realizado em uma placa Corning incorporated Costar® para cultura de células com 96 poços. O volume final no poço foi de 200 µl para cultura de parasitas e droga adicionada.

As substâncias foram preparadas com seus respectivos solventes, tais como, nerolidol solubilizada em etanol, esqualostatina, fosmidomicina e risedronato solubilizadas em água Mili Q. Todas elas foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,22 µm de poro (2,5 cm de diâmetro, Sigma-Aldrich).

Esses solventes foram testados em meio de cultura em maiores concentrações para descartar algum efeito prejudicial no desenvolvimento e crescimento dos parasitas.

As concentrações das drogas foram determinadas partindo-se de uma baixa concentração, onde os parasitas permaneceram em perfeitas condições de desenvolvimento e crescimento bem como uma elevada concentração onde ocorreu a inibição total da parasitemia. A partir desses valores, calcula-se o valor ideal da concentração da droga suficiente para inibir 50% dos parasitas em cultura.

A (Tabela 1) descreve todas as concentrações das drogas utilizadas neste experimento.

Os parasitas foram tratados separadamente e diariamente por 48 horas. As análises foram feitas através de esfregaços corados com Panótico onde diferenciou-se as formas dos parasitas (trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte) calculando-se assim a porcentagem da multiplicação e desenvolvimento dos parasitas de cada alíquota. Após obtenção desses valores, calculou-se o valor de IC₅₀ através do programa OriginPro versão 8.5. Todos os testes foram feitos em triplicata.

Tabela 1 - Concentrações das drogas utilizadas para o teste de inibição *in vitro* de *P. falciparum*

Esqualestatina (μM)	Fosmidomicina (μM)	Nerolidol (μM)	Risedronato (μM)
0	0	0	0
2,5	0,5	0,150	10
5	1	0,375	20
10	2	0,750	30
15	-	0,900	-
20	-	1,5	-
40	-	3,0	-
80	-	-	-

Diferentes concentrações das drogas esqualestatina, fosmidomicina, nerolidol e risedronato, testada por 48 horas em culturas sincrônicas de *P. falciparum*.

3.6 Determinação *in vitro* do sinergismo entre as drogas nerolidol versus esqualestatina; fosmidomicina versus risedronato; risedronato versus esqualestatina; nerolidol versus fosmidomicina e nerolidol versus risedronato.

Com a intenção de estudar a hipótese da ação de drogas que, sabidamente atuam em pontos distintos na via de isoprenóides em *P. falciparum*, realizaram-se diversos ensaios de avaliação de sinergismo *in vitro* entre as drogas nerolidol versus esqualestatina; fosmidomicina versus risedronato; risedronato versus esqualestatina; nerolidol versus fosmidomicina e nerolidol versus risedronato.

Para analisar sinergismo de adição, sinergismo de potenciação ou antagonismo, primeiramente, determina-se o valor da IC₅₀ de cada droga isoladamente (utilizada como controle). Após esses valores determinados, realiza-se um novo microteste combinando as duas concentrações inibitórias (IC₅₀), seguindo de diluições seriadas [96], conforme a (Tabela 2) e posteriormente os dados são analisados pelo isoblograma.

As análises foram feitas através de esfregaços corados com Panótico onde diferenciaram-se as formas dos parasitas (trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte) calculando-se assim a porcentagem da multiplicação e desenvolvimento de cada alíquota. Após obtenção desses valores, calculou-se um novo valor de IC₅₀ da mistura das drogas através de curvas dose-resposta, utilizando o programa OriginPro versão 8.5. Todos os testes foram feitos em triplicata.

Tabela 2 - Concentrações testadas de cada droga.

Esqualestatina (μM)	Fosmidomicina (μM)	Nerolidol (μM)	Risedronato (μM)
5	0,8	0,75	20
2,5	0,4	0,375	10
1,25	0,2	0,187	5
0,625	0,1	0,093	2,5
0,312	0,05	0,046	1,25
0,156	0,025	0,023	0,625
0,078	0,0125	0,011	0,312

Diferentes concentrações das drogas esqualestatina, fosmidomicina, nerolidol e risedronato, testada por 48 horas em culturas sincrônicas de *P. falciparum*.

3.7 Construção do isoblograma

Os isobogramas foram construídos plotando os valores da IC₅₀ isoladamente, no eixo x e no eixo y. Uma linha reta é traçada unindo os dois pontos construindo uma linha de aditividade teórica ou isobole, definindo assim um número infinito de combinações de fármacos que poderão produzir uma inibição de 50% [96].

Se os valores obtidos de IC₅₀ experimentalmente de uma combinação cair sobre a linha de aditividade teórica, o efeito da mistura das drogas é um sinergismo de adição; pontos abaixo do intervalo de confiança de 95% sugerem uma interação de sinergismo de potenciação, ao passo que pontos acima da linha do intervalo de confiança de 95%, sugerem que os compostos apresentam um efeito antagônico ou subaditivo [96].

Os intervalos de confiança para cada ponto foram calculados a partir das variações de cada componente sozinho.

As interações foram avaliadas numa análise fracionada, onde cada fração refere-se ao valor real de cada IC₅₀. A análise é feita por meio de um cálculo do efeito de cada componente em combinação com a fração da dose que produz o mesmo efeito quando administrados separadamente. A soma das doses fracionadas, como expresso pela equação citada abaixo, indica o tipo de interação:

$$cA/(IC_{50})_A + cB/(IC_{50})_B$$

onde (IC₅₀)_A e (IC₅₀)_B = IC₅₀ (concentrações das drogas A e B) testados isoladamente, e cA e cB = concentrações de drogas A e B. Quando combinadas são

equípotentes com (IC₅₀)A ou (IC₅₀)B. Valores próximos a 1 indicam interação de adição, valores maiores de 1 implicam um efeito antagônico e valores menores que 1 indicam uma interação sinérgica [96].

Posteriormente, foram feitas análises estatísticas, comparando a média das porcentagens de inibição das amostras tratadas em relação aos controles realizados. Para determinar o possível efeito inibitório dos compostos antes citados, uma estimativa do grau de inibição foi realizada para cada etapa do processo. O teste *t* de *Student* foi utilizado na análise dos dados. A média das inibições foi estimada com uma significância de 95% para cada uma das etapas dos experimentos [96].

3.8 Curva de crescimento entre o isolado 3D7 e a linhagem pRM2-Fito-HA

A fim de verificarmos se há uma diferença no crescimento entre o isolado 3D7 e a linhagem pRM2-Fito-HA, estabeleceu-se uma curva de crescimento. Suspensões de hemácias parasitadas das duas linhagens sincrônicas no estágio anel foram distribuídas em placa de 96 poços e as placas foram incubadas por 48 horas nas mesmas condições do cultivo contínuo. Cada poço recebeu um volume final de 200 µL de suspensão de hemácias com a parasitemia inicial de 0,5% e hematócrito de 3%. Alíquotas foram coletadas em tempos diferentes (0, 6, 12, 18, 24, 36, 42 e 48 horas). Esfregaços foram realizados referentes a cada parte coletada e analisado o desenvolvimento e a multiplicação dos parasitas por microscopia ótica. Os valores da parasitemia foram plotados em gráficos pelo programa OriginPro versão 8.5.

3.9 Marcação metabólica

Culturas de *P. falciparum* (linhagens 3D7 e pRM2-Fito-HA) com pelo menos 15% de parasitemia sincrônica no estágio trofozoíta jovem foram marcadas com geranilgeranil pirofosfato tritiado ([³H]GGPP) (atividade específica: 14 Ci/mmol, 1 mCi/ml; Amersham Buckinghamshire, UK) ou farnesil pirofosfato tritiado [³H]FPP (atividade específica: 16 Ci/mmol, 200 µCi/mL; Amersham) em meio RPMI 1640 durante 16 horas. Após o tempo de incorporação metabólica, as formas intraeritrocíticas foram separadas por gradiente descontínuo de Percoll[®] de 80,70 e 40%, liofilizados e congelados em nitrogênio líquido N₂ (-170 °C) para posterior extração [13].

3.10 Marcações metabólicas de parasitas tratados com esqualostatina

Culturas sincrônicas no estágio trofozoíta maduro, do isolado 3D7 de *P. falciparum* com no mínimo 15% de parasitemia, foram tratadas ou não tratadas com 5 μ M da esqualostatina, valor da IC₅₀ durante 48 horas. Nas últimas 16 horas, as culturas foram marcadas com o precursor radioativo [³H]GGPP, em meio RPMI 1640 conforme descrito no item 3.9. Após o tempo de incorporação as culturas tratadas e não tratadas (controle), foram separadas pelo gradiente de Percoll®. Apenas a fração esquizonte foi quantificada, liofilizada e submetidas à extração dos carotenos conforme descrito por Tonhosolo et al. [32]. O extrato de carotenóides foi analisado pelo sistema de cromatografia líquida de alta performance (*RP-HPLC*), conforme descrita no item 3.13 [32].

3.11 Extração de carotenóides

Os parasitas na fase de esquizontes de 3D7 e pRM2-Fito-HA de *P. falciparum* provenientes das culturas sincrônicas, marcados metabolicamente com [³H]-GGPP e liofilizados foram ressuspensos em 3 ml de acetona, agitado no vortex por 1 minuto e centrifugado a 8000 xg por 7 min, a 4 °C. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo que nas duas últimas vezes foram adicionados 2 ml de acetona.

Os sobrenadantes foram secos em corrente de nitrogênio e ressuspensos com 300 μ l do solvente A (metanol, 0.1% trietilamina (v/v) e 50 μ M do padrão β -caroteno. Todas as amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,22 μ m de poro (Sigma-Aldrich) e analisadas no *RP-HPLC* [32].

3.12 Extração do geranylgeranyl pirofosfato – GGPP

Os parasitas na fase de esquizontes de 3D7 e pRM2-Fito-HA de *P. falciparum* provenientes das culturas sincrônicas, marcados metabolicamente com [³H]-FPP e liofilizados foram ressuspensos em 3 ml de hexano, agitado no vortex por 1 minuto e centrifugado a 8000 xg por 7 min, a 4 °C. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo que nas duas últimas vezes foram adicionados 2 ml de hexano.

Os sobrenadantes foram secos em corrente de nitrogênio e ressuspensos com 300 µl do solvente A (25 mM NH_4HCO_3 (pH 8,0) e 5 µM do padrão GGPP. Todas as amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,22 µm de poro (Sigma-Aldrich) e analisadas no *RP-HPLC* [31].

3.13 Análise e purificação por *RP-HPLC* (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) de fitoeno e geranilgeranil pirofosfato (GGPP) nas formas esquizontes de *P. falciparum*

Para observar se existe diferença na biossíntese de carotenóides entre o isolado 3D7 e a linhagem pRM2-Fito-HA, amostras preparadas conforme o item 3.11 foram analisadas pela técnica de *RP-HPLC* - Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. (Aparelho Gilson HPLC 322 pumps, conectado ao detector variável UV/visível 152 a o coletor de frações FC203B).

Utilizou-se uma coluna C30 (4.6x250mm), em sistema de gradiente com metanol, 0.1% trietilamina (v/v) como solvente A e éter metílico terc butílico (MTBE) como solvente B, seguindo gradientes de 0-30 minutos, 95-70%A; 30-50 minutos, 70-50%A; 50-80 minutos, 50%A. O fluxo foi de 1,0 ml/min. As alíquotas foram coletadas a cada minuto, secas a temperatura ambiente, ressuspensas em 0,5 ml de líquido de cintilação *Betaplate scint* (PerkinElmer) e contada a incorporação radioativa em um cintilador Beckman 5000 β -counter (Beckman, CA, USA) [32].

Outro sistema de *RP-HPLC* foi utilizado, para observar se existia diferenças na biossíntese de GGPP, amostras preparadas conforme o item 3.12 foram analisadas utilizando uma coluna fase reversa C18 (Ultrasphere ODS Beckman column – 4,6 mm x 25 cm), em gradiente 0-100% ACN (acetonitrila) e 25 mM NH_4HCO_3 (pH 8,0), conforme protocolo descritos por Zhang e Poulter [97]. O fluxo foi de 1,0 ml/min. As alíquotas foram coletadas a cada minuto, secas a temperatura ambiente, ressuspensas em 0,5 ml de líquido de cintilação *Betaplate scint* (PerkinElmer) e contada a incorporação radioativa em um cintilador Beckman 5000 β -counter (Beckman, CA, USA). Após a obtenção de todos os resultados, os gráficos foram plotados pelo programa OriginPro versão 8.5 e analisados comparativamente.

4.1 Interações das drogas que atuam na via de compostos isoprênicos

Primeiramente, utilizamos os valores das IC_{50} determinadas anteriormente por nosso grupo. Encontrou-se um valor de $5 \pm 0,7 \mu M$ ($n=3$) para esqualestatina (dados não publicados); $0,8 \pm 0,1 \mu M$ ($n=3$) para fosmidomicina [44]; $0,750 \pm 0,1 \mu M$ ($n=3$) para nerolidol [27] e $20 \pm 0,5 \mu M$ ($n=3$) para risedronato [64], em 48 horas de cultivo (Figura 6).

Figura 6 - Valor da IC_{50} isoladamente

Concentração efeito dose resposta das drogas esqualestatina, fosmidomicina, nerolidol e risedronato para inibição do crescimento e desenvolvimento dos parasitas em cultura *in vitro*.

Investigou-se o comportamento das drogas combinadas citadas acima em cultura *in vitro* de *P. falciparum*. As concentrações que produziram 50% de inibição dos parasitas foram: para esqualestatina $1,37 \mu M$ e $1,54 \mu M$ quando associada com nerolidol e risedronato. O nerolidol apresentou concentrações de $0,20 \mu M$, $0,42 \mu M$ e $0,21 \mu M$, associado com esqualestatina, risedronato e fosmidomicina, respectivamente.

A fosmidomicina apresentou $0,23 \mu M$ e $0,15 \mu M$ quando associada com nerolidol e risedronato, e por fim, o risedronato apresentou $11,32 \mu M$, $6,18 \mu M$ e $4,23 \mu M$ ao associar-se com nerolidol, esqualestatina e fosmidomicina, respectivamente. Esses dados estão descritos na (Tabela 3).

A soma das frações sugerem uma possível interação sinérgica da droga nerolidol quando associada com esqualestatina e fosmidomicina, devido apresentar uma soma das frações menores que 1. No entanto, nerolidol e risedronato apresentaram

um valor de 1,12 apresentando um efeito característico aditivo para essa combinação.

A droga risedronato com fosmidomicina e esqualestatina obtiveram valores de 0,53 e 0,60 demonstrando também interações sinérgicas entre elas (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações efetivas das (IC₅₀) para esqualestatina, fosmidomicina, nerolidol e risedronato, administrados sozinhos e em combinações

Grupo	Esqualestatina		Fosmidomicina		Nerolidol		Risedronato		Soma das frações
	Fração de (IC ₅₀)	Concentração (µM)	Fração de (IC ₅₀)	Concentração (µM)	Fração de (IC ₅₀)	Concentração (µM)	Fração de (IC ₅₀)	Concentração (µM)	
Estudo das drogas individuais									
Esqualestatina	1,00	5,0 (3,27-6,73)	-	-	-	-	-	-	
Fosmidomicina	-	-	1,00	0,8 (0,55-1,01)	-	-	-	-	
Nerolidol	-	-	-	-	1,00	0,75 (0,50-0,99)	-	-	
Risedronato	-	-	-	-	-	-	1,00	20,0 (18,75-21,24)	
Estudo das interações									
Nerolidol + Esqualestatina	0,27	1,37 (0,91-1,83)	-	-	0,28	0,20 (0,14-0,26)	-	-	0,54
Nerolidol + Risedronato	-	-	-	-	0,56	0,42 (0,15-0,69)	0,56	11,32 (4,18-18,46)	1,12
Nerolidol + Fosmidomicina	-	-	0,25	0,23 (0,21-0,25)	0,28	0,21 (0,19-0,23)	-	-	0,53
Risedronato + Esqualestatina	0,30	1,54 (1,51-1,57)	-	-	-	-	0,30	6,18 (6,01-6,35)	0,60
Fosmidomicina + Risedronato	-	-	0,18	0,15 (0,06-0,24)	-	-	0,21	4,23 (2,00-6,46)	0,40
Valores são mencionados com intervalo de confiança de 95% de experimentos realizados em triplicata									

4.2 Determinação *in vitro* de sinergismo entre as drogas que atuam na via de biossíntese de isoprenóide

Analizou-se a atuação da esqualestatina juntamente com o nerolidol na inibição do desenvolvimento e crescimento de *P. falciparum*.

Observou-se efeito sinérgico entre eles, pelo fato do intervalo de confiança da associação ser 1,37 μM (0,91-1,83) e 0,20 μM (0,14-0,26) não atingirem a área de confiabilidade das IC_{50} 's individuais 0,75 μM (0,50-0,99) e 5,0 μM (3,27-6,73) (Figura 7).

Figura 7 - Isoblograma da interação entre as drogas nerolidol e esqualestatina

Nerolidol no eixo x e esqualestatina no eixo y. A linha sólida liga as concentrações das IC_{50} dos compostos isoladamente. A linha pontilhada refere-se intervalo de confiança de 95% do nerolidol de 0,75 μM (0,50-0,99) e ao intervalo de confiança da esqualestatina de 5,0 μM (3,27-6,73). O ponto no centro refere-se ao dado experimental da associação de 0,20 μM (0,14-0,26) e 1,37 μM (0,91-1,83) respectivamente em 48 horas de tratamento com diferentes diluições das drogas. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata.

Analizou-se o efeito das drogas nerolidol associado com risedronato, observando-se um efeito aditivo entre essa junção, devido aos dados experimentais tais como 0,42 μM (0,15-0,69) e 11,32 μM (4,18-18,46), respectivamente, não

ultrapassarem os intervalos de confiança das drogas isoladas 0,75 μM (0,50-0,99) e 20,0 μM (18,75-21,24) (Figura 8).

Figura 8 - Isoblograma da interação entre as drogas nerolidol e risedronato

Nerolidol no eixo x e risedronato no eixo y. A linha sólida liga as concentrações das IC_{50} dos compostos isoladamente. A linha pontilhada refere-se ao intervalo de confiança de 95% do nerolidol de 0,75 μM (0,50-0,99) e ao intervalo de confiança do risedronato de 20,0 μM (18,75-21,24). O ponto no centro refere-se ao dado experimental da associação de 0,42 μM (0,15-0,69) e 11,32 μM (4,18-18,46), respectivamente em 48 horas de tratamento com diferentes diluições das drogas. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata.

Observa-se um efeito de interação sinérgica entre as drogas nerolidol e fosmidomicina, visto que os intervalos de confiança dos dados experimentais são 0,21 μM (0,19-0,23) e 0,23 μM (0,21-0,25), respectivamente, estando abaixo das linhas dos intervalos de confiança das drogas isoladas 0,75 μM (0,50-0,99) e 0,8 μM (0,55-1,01), (Figura 9).

Figura 9 - Isoblograma da interação entre as drogas nerolidol e fosmidomicina.

Nerolidol no eixo x e fosmidomicina no eixo y. A linha sólida liga as concentrações das IC₅₀ dos compostos isoladamente. A linha pontilhada refere-se intervalo de confiança de 95% do nerolidol de 0,75 µM (0,50-0,99) e ao intervalo de confiança da fosmidomicina de 0,8 µM (0,55-1,01). O ponto no centro refere-se ao dado experimental da associação de 0,21 µM (0,19-0,23) e 0,23 µM (0,21-0,25), respectivamente em 48 horas de tratamento com diferentes diluições das drogas. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata.

De acordo com as análises dos isoblogramas, o composto risedronato apresentou resultados de interação sinérgica quando associado com esqualestatina e fosmidomicina (Figuras 10 e 11).

Os dados dos intervalos de confiança das associações risedronato combinado com esqualestatina são 1,54 µM (1,51-1,57) e 6,18 µM (6,01-6,35), e risedronato combinado com fosmidomicina são 4,23 µM (2,00-6,46) e 0,15 µM (0,06-0,24), estando fora do intervalo de confiança das drogas isoladas de 20,0 µM (18,75-21,24) para risedronato e 5,0 µM (3,27-6,73) para esqualestatina e 0,8 µM (0,55-1,018) para a fosmidomicina.

Figura 10 - Isoblograma da interação entre as drogas risedronato e esqualestatina.

Risedronato no eixo x e esqualestatina no eixo y. A linha sólida liga as concentrações das IC₅₀ dos compostos isoladamente. A linha pontilhada refere-se intervalo de confiança de 95% do risedronato 20,0 µM (18,75-21,24) e ao intervalo de confiança da esqualestatina de 5,0 µM (3,27-6,73). O ponto no centro refere-se ao dado experimental da associação de 1,54 µM (1,51-1,57) e 6,18 µM (6,01-6,35), respectivamente em 48 horas de tratamento com diferentes diluições das drogas. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata.

Figura 11 - Isoblograma da interação entre as drogas fosmidomicina e risedronato.

Fosmidomicina no eixo x e risedronato no eixo y. A linha sólida liga as concentrações das IC₅₀ dos compostos isoladamente. A linha pontilhada refere-se intervalo de confiança de 95% da fosmidomicina de 0,8 µM (0,55-1,018) e ao intervalo de confiança do risedronato de 20,0 µM (18,75-21,24). O ponto no centro refere-se ao dado experimental da associação de 0,15 µM (0,06-0,24) e 4,23 µM (2,00-6,46), respectivamente em 48 horas de tratamento com diferentes diluições das drogas. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata.

Figura 12 - Isobolograma da interação entre as drogas fosmidomicina e esqualestatina.

Fosmidomicina no eixo x e esqualestatina no eixo y. A linha sólida liga as concentrações das IC_{50} dos compostos isoladamente. A linha pontilhada refere-se intervalo de confiança de 95% da fosmidomicina de 0,8 μM (0,55-1,018) e ao intervalo de confiança do risedronato de 5,0 μM (3,27-6,73). O ponto no centro refere-se ao dado experimental da associação de 0,10 μM (0,03-0,17) e 0,44 μM (0,44-0,88), respectivamente em 48 horas de tratamento com diferentes diluições das drogas. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata.

4.3 Construção da linhagem pRM2-Fito-HA

Para estudos funcionais e fisiológicos, bem como analisar a atividade de inibidores para cada enzima, Dr. Mauro Azevedo e Heloisa Gabriel, do Instituto de Ciências Biomédicas ICBII/USP, em 2011, obtiveram uma linhagem transgênica (pRM2-Fito-HA) que estaria super expressando a enzima bifuncional com atividade fitoeno sintase e octaprenil pirofosfato sintase.

A super expressão [99] da proteína octaprenil pirofosfato/fitoeno sintase pode ser uma estratégia alternativa para identificação de inibidores. O gene que codifica a proteína de interesse foi clonado em um vetor de expressão pRM2-0202700-HA, juntamente com o gene humano que codifica a enzima dihidrofolato redutase – hDHFR, usado como marcador de resistência e o MSP2-5'UTR – promotor do gene que codifica a MSP2 de *P. falciparum*, CAM 3'UTR, – região terminadora de

transcrição do gene que codifica a calmodulina de *P. falciparum*. A proteína é expressa em fusão com o epítipo HA. Os níveis de expressão mais altos são obtidos uma vez que o plasmídeo transfetado está presente na forma episossomal, em múltiplas cópias [100].

Figura 13 - Esquema do vetor pRM2-0202700-HA utilizado para super expressão em *P. falciparum*.

CDS – região codificante inteira do gene PF3D7_0202700, hDHFR – cassete de seleção compreendendo o promotor CAM, o gene humano que codifica a enzima dihidrofolato redutase e um terminador de *P. falciparum*, Rep20 – região sub-teleométrica repetida 5 vezes, MSP2-5'UTR – promotor do gene que codifica a MSP2 de *P. falciparum*, CAM 3'UTR – região terminadora de transcrição do gene que codifica a calmodulina de *P. falciparum*.

4.4 Parâmetros de crescimento entre as linhagens 3D7, pRM2-Fito-HA e Fito-HA-cloneF

O aumento no número de parasitas ocorre durante o ciclo eritrocítico do *P. falciparum*. Após a invasão da hemácia, os merozoítas começam a se desenvolver nos estágios trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte, culminando com a ruptura da hemácia e liberação de novos merozoítas, que darão continuidade ao ciclo eritrocítico, no período de 48 horas.

Especulamos se as linhagens transgênicas (pRM2-Fito-HA – provável super expressa e Fito-HA-cloneF - integrada) apresentariam alguma alteração no desenvolvimento e crescimento dos parasitas no ciclo eritrocítico.

A linhagem Fito-HA-cloneF foi cedida por Dr. Mauro Azevedo/Heloisa Gabriel, sendo que o plasmídeo usado na transfecção contém, o tag HA (epítipo da

hemaglutinina) de 3 kDa fusionado ao gene de interesse como também o gene marcador de seleção que confere resistência a droga WR (hDHFR).

O experimento consistiu na sincronização dos parasitas, a fim de que todas as culturas estivessem no estágio trofozoíta jovem. O desenvolvimento e a multiplicação dos parasitas foram monitorados por 96 horas. A contagem dos parasitas em condições adequadas de crescimento foi feita por observação microscópica, por meio de esfregaços corados com Panótico.

Essa abordagem nos permitiu observar que a linhagem integrada Fito-HA-cloneF não apresentou diferença no crescimento em relação ao controle 3D7, ou seja, a fusão da proteína com HA, expressão de hDHFR ou de qualquer outro elemento do vetor não afeta o parasita. Como um desenvolvimento mais lento foi observado na linhagem pRM2-Fito-HA, a expressão do gene de interesse parece ser tóxica para o parasita, porém tolerável (Figura 14).

Figura 14 - Curva de crescimento entre as linhagens isolado 3D7, pRM2-Fito-HA e Fito-HA-cloneF.

Alíquotas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (0 a 96h) como mencionado em materiais e métodos. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata, com o desvio padrão.

4.5 Ensaios de inibição *in vitro* nas linhagens 3D7, Fito-HA-cloneF e pRM2-Fito-HA, com as drogas esqualostatina e nerolidol

Utilizamos o método de Desjardins et al. [95] para determinar os valores de IC_{50} da esqualostatina e do nerolidol, na linhagem pRM2-Fito-HA.

A (Figura 15A) representa a atividade inibitória da esqualostatina no desenvolvimento e crescimento dos parasitas transfectados em comparação com o isolado 3D7. Obteve-se uma curva dose-resposta, com os valores de $5 \pm 1,2 \mu M$ ($n=3$) para o isolado 3D7 e $30 \pm 1,5 \mu M$ ($n=3$) para a linhagem pRM2-Fito-HA.

As figuras 15 A e B, representam as análises dos parasitas tratados com esqualostatina, onde os mesmos detiveram precocemente a sua maturação no final do ciclo intraeritrocítico de 48 horas.

Utilizamos a linhagem Fito-HA-cloneF para certificarmos que o valor da IC_{50} encontrado foi somente devido a uma provável “super expressão” da enzima fitoeno sintase e não de qualquer outra alteração. Encontramos o mesmo valor de IC_{50} para ambas as linhagens, $5 \pm 0,9 \mu M$ ($n=3$) para o isolado 3D7 e $5 \pm 0,6 \mu M$ ($n=3$) para linhagem Fito-HA-cloneF (Figura 15A).

Na linhagem Fito-HA-cloneF, o gene de interesse (*PFB0130w*) encontra-se integrado no genoma, pois nesse caso o gene que codifica a proteína de fusão, octaprenil-PP/fitoeno sintase, não tem promotor, o que impossibilita que a proteína seja expressa antes da integração, ou seja, quando a integração no genoma acontece, a proteína de fusão é expressa em níveis similares aos da endógena [98].

Realizamos os mesmos experimentos de inibição com o composto nerolidol. Obtivemos um valor de $IC_{50} 750,0 \pm 0,02 nM$ ($n=3$) para ambas as linhagens, isolado 3D7 e a linhagem pRM2-Fito-HA, (Figura 15B).

Figura 15A - Determinação do valor da (IC_{50}) da droga esqualestatina em cultura sincrônica do isolado 3D7 e das linhagens pRM2-Fito-HA e Fito-HA-cloneF de *P. falciparum*.

Aliquotas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (0 a 96h), com diferentes concentrações crescente da droga (0 a 80 μ M), como mencionado em materiais e métodos. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata, com o desvio padrão. Os valores das IC_{50} s encontradas foram de 5,0 μ M, para o isolado 3D7 e a linhagem Fito-HA-cloneF e 30 μ M para linhagem pRM2-Fito-HA.

Figura 15B - Determinação do valor da (IC_{50}) da droga nerolidol em cultura sincrônica do isolado 3D7 e da linhagem pRM2-Fito-HA de *P. falciparum*.

Aliquotas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (0 a 96h), com diferentes concentrações crescente da droga (0 a 3 μ M), como mencionado em materiais e métodos. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata, com o desvio padrão. O valor da IC_{50} encontrada foi de 750 nM para ambas as linhagens (pRM2-Fito-HA e 3D7).

Figura 16A - Esfregaço do isolado 3D7 de *P. falciparum*.

Controle do isolado 3D7, sem a presença da droga esqualestatina. Alíquotas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (0 a 96 h). O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. Observam-se neste ciclo as fases trofozoíta jovem (A), trofozoíta maduro (B) e esquizonte (C) em perfeitas condições morfológicas.

Figura 16B - Alterações morfológicas do isolado 3D7 de *P. falciparum* sob a ação inibitória da droga esqualestatina.

Alíquotas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (0 a 96 h), com diferentes concentrações crescentes da droga (0 a 80 μ M), como mencionado em materiais e métodos. O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Panótico. As imagens referem-se a observações realizadas durante o experimento. Observa-se neste ciclo as fases trofozoíta jovem (A), trofozoíta maduro (B) e trofozoíta maduro (C), com alterações morfológicas, impedindo a formação de esquizontes.

4.6 Cromatografia líquida de alto desempenho (RP-HPLC) para analisar a biossíntese de fitoeno em parasitas tratados com esqualostatina

Avaliou-se o efeito da droga esqualostatina sob a biossíntese de fitoeno na linhagem sincrônica do isolado 3D7 de *P. falciparum*.

Conseguimos detectar picos radioativos nos tempos de retenção de fitoeno, fitoflueno e β -caroteno (frações 18, 21 e 30), respectivamente. As frações detectadas estão de acordo com os resultados anteriores do nosso grupo em que foi feita a caracterização bioquímica da biossíntese de carotenóides [32].

Na fração correspondente ao tempo de retenção do fitoeno, houve uma redução significativa na biossíntese do mesmo nos parasitas tratados com 5 μ M de esqualostatina em relação aos parasitas não tratados (Figura 17). No entanto, outros carotenóides como fitoflueno e β -caroteno não apresentaram diminuição da biossíntese sob o efeito desta droga.

Figura 17 - Efeito da esqualostatina sob a biossíntese de fitoeno nos estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum*.

Parasitas metabolicamente marcados com [3 H]GGPP foram submetidos à extração com acetona. Os extratos foram purificados por RP-HPLC em coluna C30. As frações foram coletadas em intervalos de 1 mL/min. As frações radioativas coincidem com os padrões de fitoeno, fitoflueno e β -caroteno co-injetados.

4.7 Análise comparativa dos produtos fitoeno e GGPP biossintetizados pelos parasitas dos isolados 3D7 e da linhagem pRM2-Fito-HA

Nosso próximo passo foi avaliar se ocorreria um aumento nos produtos formados pela enzima octaprenil pirofosfato sintase/fitoeno sintase na linhagem pRM2-Fito-HA em comparação com o isolado 3D7.

Extrato de esquizontes foram marcados metabolicamente com precursores radioativos [^3H]GGPP ou [^3H]FPP por 16 horas. Após o tratamento, as formas intraeritrocíticas foram separadas por gradiente descontínuo de Percoll[®]. Posteriormente foram extraídos os produtos (carotenóides e GGPP) segundo as metodologias descritas nos itens 3.11 e 3.12 de materiais e métodos respectivamente. Utilizou-se dois sistemas diferentes de purificação por *RP-HPLC* para carotenóides e GGPP detalhados no item 3.13 em materiais e métodos. Em seguida, as frações foram coletadas e sucessivamente medida a radioatividade.

Na fração correspondente ao tempo de retenção dos padrões de fitoeno, fitoflueno e β -caroteno (frações 18, 21 e 30) houve um aumento significativo na incorporação do precursor radioativo de 57% em fitoeno e 47% em fitoflueno, β -caroteno não apresentou diferença significativa (Figura 18). No tempo de retenção (fração 27) equivalente ao produto GGPP, detectamos um aumento na incorporação do precursor radioativo de 46% (Figura 19).

Com essas análises, vimos um aumento dos produtos biossintetizados pelas enzimas fitoeno sintase/octaprenil pirofosfato sintase na linhagem pRM2-Fito-HA em comparação com a selvagem 3D7.

Figura 18 - Perfil de incorporação radioativa [^3H]GGPP do estágio esquizontes de *P. falciparum*, na linhagem pRM2-Fito-HA e isolado 3D7.

Amostras marcadas metabolicamente com [^3H]GGPP foram submetidas à extração com acetona. Os extratos foram purificados por *RT-HPLC* em coluna C30. As frações foram coletadas em intervalos de 1mL/min. Representação dos picos radioativos coincidentes com os padrões de fitoeno -18 min, fitoflueno-21 min e β-caroteno, co-injetados. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata, com o desvio padrão (One-way ANOVA, p indica os valores do teste).

Figura 19- Perfil de incorporação radioativa [^3H]FPP do estágio esquizontes de *P. falciparum* na linhagem pRM2-Fito-HA e isolado 3D7.

Amostras marcadas metabolicamente com [^3H]FPP foram submetidas à extração com hexano. Os extratos foram purificados por *RT-HPLC* em coluna C18. As frações foram coletadas em intervalos de 1 mL/min. Representação do pico radioativo coincidente com o padrão GGPP-27min, co-injetado. Os pontos referem-se às médias de experimentos em triplicata, com o desvio padrão (One-way ANOVA, p indica os valores do teste).

O método de combinações medicamentosas *in vitro* tem sido amplamente utilizado para avaliar as interações de drogas antimaláricas.

A via de biossíntese de isoprenóides é bastante promissora no que se refere à formulação racional de novos antimaláricos, por ser alternativa na biossíntese dos compostos isoprênicos e não ser compartilhada pelo homem.

O conhecimento dos compostos que atuam nesta via é fundamental para a prática da busca de novas combinações de inibidores que ajam em diferentes pontos de uma mesma via metabólica, podendo atuar como sinérgicos e evitar a aparição de resistência [7].

As combinações de drogas podem seguir inúmeros métodos. Segundo Fivelman et al.[87], pode-se obter sinergismo quando a concentração da droga A é mantida constante, e a concentração da droga B é variada, e vice-versa. No entanto, seguimos a metodologia descrita por Matthias Paul et al.[96], onde utilizou-se um método de proporção fixa a partir da IC_{50} individual (droga A e droga B). Em seguida, essas concentrações foram associadas e foram realizadas diluições seriadas. Optou-se por este método com o intuito de associarmos drogas com frações muito próximas.

As IC_{50} s obtidas neste trabalho coincidem com os valores já determinados por nosso laboratório (Figura 6). Rodrigues Goulart et al [30] definiram o valor de 0,750 μ M para o nerolidol e Tonhosolo definiu o valor de 5 μ M para esqualostatina (dados não publicados). O valor da IC_{50} de 0,8 μ M da fosmidomicina está muito próximo ao encontrado por Jomaa et al.[44] que determinou em IC_{50} - 1,25 μ M. Jordão et al.[64] descreveram o risedronato com atividade antimalárica determinando o valor da IC_{50} de 20 μ M.

Este trabalho é o primeiro a demonstrar interações sinérgicas entre os compostos que sabidamente atuam na via MEP/isoprenóides.

O efeito do nerolidol é interferir no alongamento das cadeias isoprênicas, atuando na enzima octaprenil pirofosfato sintase descrita anteriormente que também possui atividade de fitoeno sintase [31,32]. Neste trabalho foi demonstrado que a esqualostatina inibe a biossíntese de fitoeno [Figura 17].

A associação desses dois compostos apresentou um efeito de interação sinérgica, provavelmente, por estarem inibindo diferentes sítios ativos da mesma enzima [31, 36] (Figura 7).

O risedronato atua nas enzimas FPPs/GGPPs [64] impedindo a formação dos produtos FPP e GGPP. Estes produtos são precursores dos poliisoprenóides utilizados como substratos por a/as enzima/s inibidas por nerolidol, a falta de substrato podem levar a uma diminuição da atividade enzimática, podendo ser uma hipótese para justificar o efeito aditivo encontrado nesta combinação (Figura 9).

Quando o nerolidol foi avaliado com a fosmidomicina houve um efeito sinérgico. Cassera et al.[27] mostraram que fosmidomicina inibe parcialmente a biossíntese de ubiquinona e dolicol (13 e 35 % respectivamente) sugerindo que os precursores destes produtos ainda estão disponíveis para serem utilizados pelas enzima/s inibidas por nerolidol (Figura 9).

Outras interações de potencialização foram demonstradas neste trabalho, com os compostos que atuam em diferentes pontos da via MEP. As associações de risedronato, que atua na inibição das enzimas FPPs/GGPPs, combinado com esqualestatina, que atua na enzima fitoeno sintase, são interações de sinergismo de potenciação da mesma forma que risedronato interage com fosmidomicina, onde a este último composto também apresenta sinergismo de potenciação com esqualestatina. (Figuras 10,11 e 12).

Essas drogas estão associadas com a inibição do crescimento e desenvolvimento do parasita por diferentes mecanismos de ação, pois atuam em diferentes pontos de uma mesma via metabólica ou em alvos distintos, seja de forma direta e/ou indireta.

Na última década, nosso grupo, caracterizou diversos produtos da biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum*, como dolicois, ubiquinonas e carotenóides [10], e identificou-se a bifuncionalidade da enzima octaprenil pirofosfato sintase/fitoeno sintase [32].

A fim de estudar a funcionalidade de enzimas da via de biossíntese dos compostos isoprênicos, bem como buscar inibidores que atuam nesta via, Dr. Mauro Azevedo e Heloisa Gabriel, inicialmente, propuseram a manipulação desta enzima de interesse (octaprenil pirofosfato sintase/fitoeno sintase PF3D7_0202700) no genoma do parasita, utilizando ferramentas moleculares.

Inicialmente gerou-se a linhagem Fito-HA-cloneF, onde a integração do gene de interesse ocorreu em fusão com epítipo da proteína hemaglutinina (HA) de 3 kDa. A vantagem desta integração é que a expressão da proteína é mantida e somente

proteínas funcionais são expressas, sendo assim, esse locus genômico é suscetível a integração e a proteína é funcional em fusão com HA.

Esta enzima é um alvo promissor para futuros inibidores na via de isoprenóides, sendo assim, Dr. Mauro Azevedo/Heloisa Gabriel construíram uma linhagem pRM2-Fito-HA, onde este gene supostamente estaria super expressando esta enzima de interesse. Como dito anteriormente, a super expressão pode ser uma estratégia para confirmar a função da proteína, como também para analisar a atividade de inibidores [99]. A proteína de interesse é expressa em fusão com diferentes tags sem inicialmente integrar no genoma.

Foi utilizado um vetor de expressão pRM2_0202700-HA (Figura 11) com promotor CAM forte e específico em esquizonte, devido as análises anteriores mostrarem que essa proteína é expressa somente nesse estágio. Isso pode ser atribuído ao fato de que no estágio esquizonte o parasita encontra-se completamente desenvolvido [32], sendo assim, o plasmídeo utilizado contém esta informação e a proteína é expressa especificamente nesta fase [105].

De acordo com as nossas análises vimos que, essa transfecção reduz o crescimento e o desenvolvimento do parasita (Figura 12). É comum que uma possível super expressão seja tóxica ao parasita, porém tolerável por um período não muito longo [94]. Já o Fito-HA-cloneF não apresentou diferença no crescimento em relação ao controle 3D7, ou seja, a fusão da proteína com HA, expressão de hDHFR ou de qualquer outro elemento do vetor não afeta o parasita (Figura 12).

Essas duas linhagens (pRM2-Fito-HA/Fito-HA-cloneF) foram cultivadas paralelamente ao isolado 3D7, porém foi adicionado em seu meio de cultura a droga (WR99210), pois o gene que codifica a dihidrofolato redutase humana (hDHFR) foi usado como marcador de seleção, sendo esse resistente a droga, diferentemente do gene de *P. falciparum*, o qual apresenta sensibilidade a este composto [101]. Os níveis de expressão mais altos são obtidos uma vez que o plasmídeo transfectado está presente na forma episomal, em múltiplas cópias [100].

Diante deste fato, podemos inferir que a redução nos níveis de fitoeno devido à ação de um inibidor seria menos sensível na linhagem pRM2-Fito-HA do que nas linhagem Fito-HA-cloneF e isolado 3D7, já que esta pode ser que apresente a enzima que forma esse produto em maiores quantidades.

Sendo assim, ao investigar se a droga esqualostatina apresentaria alguma alteração no crescimento e desenvolvimento do parasita, quando o nível de

expressão da enzima fitoeno sintase está aumentado, detectamos diferentes valores entre as linhagens. O controle 3D7 apresenta um valor de IC_{50} de $5 \pm 1,2 \mu M$ ($n=3$), valor correspondente ao encontrado por nosso grupo (dados não publicados), afetando o desenvolvimento intraeritrocítico do parasita a partir da fase de esquizonte, enquanto que a linhagem pRM2-Fito-HA apresenta um valor de $30 \pm 1,5 \mu M$ ($n=3$) (Figura 13A). Os parasitas dessa linhagem são significativamente mais resistentes a este inibidor.

Resultados semelhantes foram encontrados para ambas linhagens Fito-HA-cloneF e cepa isolado 3D7, valor de IC_{50} de $5 \pm 0,6 \mu M$ ($n=3$). Fato esperado, visto que, o plasmídeo desta linhagem possui o gene que codifica a proteína de fusão, (octaprenil pirofosfato sintase/fitoeno sintase), porém não tem promotor, impedindo assim que a proteína seja expressa antes da integração. Uma vez que integrado no genoma somente a proteína de fusão é expressa em níveis similares aos da endógena [103].

Estes resultados suportam a ideia de que a enzima fitoeno sintase poderia ser o alvo da esqualestatina em *P. falciparum*, o que sugere que este composto pode ser um potencial antimalárico. Este tipo de abordagem experimental ainda abre mais o leque de possibilidades para investigar a atividade de inibidores enzimáticos contra alvos do parasita.

Da mesma forma, buscamos testar a sensibilidade do nerolidol sobre a linhagem pRM2-Fito-HA e obtivemos o mesmo valor de IC_{50} $750,0 \pm 0,02 \text{ nM}$ ($n=3$) (Figura 13B), para ambas linhagens (pRM2-Fito-HA e 3D7). Este valor observado é similar aos valores encontrados na literatura para o isolado 3D7 [31]. O fato de termos obtido o mesmo valor de IC_{50} , para ambas as linhagens, sugere que este inibidor possui mais de um alvo no parasita, como descrito anteriormente por Goulart e colaboradores em 2004 [30]. Devido as suas similaridades estruturais, os terpenos poderiam interferir com a biossíntese de poliisoprenóides do parasita, competindo com os substratos na reação enzimática e / ou interferindo nos mecanismos de alongamento das cadeias isoprênicas [104].

A esqualestatina inibe a biossíntese de carotenóides em outros organismos [36]. Sendo assim propusemos analisar o efeito inibidor da esqualestatina sob a biossíntese de fitoeno no isolado 3D7 de *P. falciparum*. Para tanto, utilizamos uma metodologia já padronizada por nosso grupo [32]. A esqualestatina mostrou um

efeito de inibição no produto fitoeno de 56% com uma concentração de 5 μ M (Figura 15).

Observamos que esse composto exerce inibição dose-dependente sobre os estágios intraeritrocíticos do parasita e, essa inibição na biossíntese do produto fitoeno, pode ter sido devido à inibição da atividade da enzima fitoeno sintase, assim como descrito em plantas, onde esta droga apresentou uma atividade inibitória da enzima fitoeno sintase com concentração de 41 μ M [36].

Fitoeno sintase é a primeira enzima comprometida na biossíntese de carotenóides, a formação de fitoeno, carbono simétrico octa-hidro-caroteno ocorre a partir do substrato GGPP, um precursor comum dos compostos isoprênicos [32]. Em *P. falciparum* a formação de carotenóides utiliza duas moléculas de GGPP [32].

A inibição de fitoeno sintase em *P. falciparum* resulta na interrupção do crescimento do parasita, visto que esta enzima é fundamental na formação de carotenóides.

Tonhosolo et al. [31,32] demonstraram que [3 H]GGPP e [3 H]FPP são precursores para a biossíntese de carotenóides e GGPP nas formas intraeritrocíticas de *P. falciparum*. Quando estes precursores radioativos foram incorporados na linhagem pRM2-Fito-HA, a biossíntese de fitoeno, fitoflueno e GGPP aumentou 57%, 47% e 46% respectivamente, comparado com o isolado 3D7, sugerindo que a enzima fitoeno sintase poderia estar sendo super expressa (Figura 16 e 17)

Dado que a biossíntese de carotenóides é ausente em humanos, mas presentes em *P. falciparum*, esses resultados ressaltam que esta via pode ser explorada como um novo alvo para drogas contra a malária.

6 CONCLUSÃO

As drogas que atuam na inibição da via de biossíntese de isoprenóides com diferentes alvos apresentam interações de sinergismo de potenciação ou adição.

A droga esqualestatina apresenta atividade inibitória na biossíntese de fitoeno no estágio esquizonte de *P. falciparum*.

A linhagem pRM2-Fito-HA, poderia estar super expressando a enzima fitoeno sintase nas formas intraeritrocíticas de *P. falciparum*, sendo assim, experimentos adicionais devem ser feitos para demonstrar este fato.

REFERÊNCIAS

1. Camargo EP. Malária paludismo. *Ciência e Cultura*. 2003;55(1):26-9.
2. World Health Organization. Countries and territories affected by malária [Homepage on the Internet]. 2011. [cited from 2012 Sep 09]. Available from: <http://www.who.int>.
3. Portal da Saúde. Conhecendo mais sobre a Malária. [Página da Internet]. 2012. [acesso em 2012 set. 20]. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>.
4. Rey L. Parasitologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2008. p. 286-328.
5. Cientistas asiáticos descobrem um novo parasita que causa malária [Internet]. 2009. Available from: <http://www.bvsms.saude.gov.br>.
6. Manual de terapia da malária [Internet]. 2011. Available from: <http://www.bvsms.saude.gov.br>.
7. Macreadie I, Ginsburg H, Sirawaraporn W, et al. Antimalarial drug development and new targets. 2000;16(10):38-44.
8. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Disponível: from <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. [15 ago 2012].
9. Menard R. The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes Infect*. 2000;2(6):633-42.
10. Jordao FM, Kimura EA, Katzin AM. Isoprenoid biosynthesis in the erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106 Suppl 1:134-41.
11. Russell PF. World-wide malaria distribution, prevalence, and control. *Am J Trop Med Hyg*. 1956;5(6):937-65.
12. Tanos CC, França MGdSJDF-V. Malaria: historical aspects and chemotherapy. *Quím Nova*. 2008;31(5):1271-1278.
13. D'Alexandri FL, Kimura EA, Peres VJ, et al. Protein dolichylation in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. 2006;580(27):6343-8.
14. Kimura EA, Couto AS, Peres VJ, et al. N-linked glycoproteins are related to schizogony of the intraerythrocytic stage in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 1996;271(24):14452-61.
15. Seeber F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003; 3(2):99-109.

*De acordo com:

Internacional Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

16. Ralph AS, Van Dooren GG, Waller RF, et al. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(3):203-16.
17. Tonhosolo R. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize menaquinone. *FEBS Lett*. 2010;584(23):4761-8.
18. Sacchettini JC, Poulter CD. Creating isoprenoid diversity. *Science*. 1997. 277(5333):1788-9.
19. Flesch G, Rohmer M. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur J Biochem*. 1988;175(2):405-11.
20. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343(6257): 425-30.
21. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001;292(5519):1160-4.
22. Mbaya B, Rigomier D, Edoh GG, et al. Isoprenoid metabolism in *Plasmodium falciparum* during the intraerythrocytic phase of malaria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;173(3):849-54.
23. Moura IC, Wunderlich G, Uhrig ML, et al. Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(9):2553-8.
24. Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S, et al. Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Letters*. 1998;22:7913-6.
25. Kishida H, Wada T, Unzai S, et al. Structure and catalytic mechanism of 2-C-methyl D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) synthase, an enzyme in the non mevalonate pathway of isoprenoid synthesis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2003;59(Pt 1):23-31.
26. Rodriguez-Concepcion, M. and A. Boronat, Elucidation of the methyl erythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol*. 2002;130(3):1079-89.
27. Cassera MB, Gozzo FC, D'Alexandri FL, et al. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* *J Biol Chem*. 2004;279(50):51749-59.
28. Yeh E, DeRisi JL. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *PloS Biol*. 2011.9(8):p.e1001138

29. de Macedo CS, Uhrig ML, Kimura EA, et al. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;207(1):13-20.
30. Rodrigues Goulart H, Kimura EA, Peres VJ, et al. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2502-9.
31. Tonhosolo R, D'Aleixandri FL, Genta FA, et al. Identification, molecular cloning and functional characterization of an octaprenyl pyrophosphate synthase in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 2005;392(Pt 1):117-26.
32. Tonhosolo R, D'Aleixandri FL, de Rosso VV, et al. Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem.* 2009;284(15):9974-85.
33. Mijts BN, Schmidt-Dannert C. Engineering of secondary metabolite pathways. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(6):597-602.
34. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med.* 2003;24(6):345-51.
35. Sussmann RA, Angeli CB, Peres VJ, et al. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin E. *FEBS Lett.* 2011;585(24):3985-91.
36. Neudert U, Martinez-Ferez IM, Fraser PD, et al. Expression of an active phytoene synthase from *Erwinia uredovora* and biochemical properties of the enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1392(1):51-8.
37. Bergstrom JD, Dufresne C, Bills GF, et al. Zaragozic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(1):80-4.
38. Bergstrom JD, Kurtz MM, Rew DJ, et al. Discovery, biosynthesis, and mechanism of action of the zaragozic acids: potent inhibitors of squalene synthase. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49: 607-39.
39. Hasumi K, Tachikawa K, Sakai K, et al. Competitive inhibition of squalene synthetase by squalostatin 1. *J Antibiot (Tokyo).* 1993;46(4):689-91.
40. Nishikawa Y, Ibrahim HM, Kameyama K, et al. Host cholesterol synthesis contributes to growth of intracellular *Toxoplasma gondii* in macrophages. *J Vet Med Sci.* 2011;73(5):633-9.
41. Lindsey S, Harwood Jr HJ. Inhibition of mammalian squalene synthetase activity by zaragozic acid A is a result of competitive inhibition followed by mechanism-based irreversible inactivation. *J Biol Chem.* 1995;270(16):9083-96.
42. Kuemmerle HP, Murakawa T, De Santis F. Pharmacokinetic evaluation of fosmidomycin, a new phosphonic acid antibiotic. *Chimioterapia.* 1987;6(2):113-9.

43. Kuemmerle HP, Murakawa T, Soneoka K, et al. Fosmidomycin: a new phosphonic acid antibiotic. Part I: Phase I tolerance studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1985;23(10):515-20.
44. Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, et al. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science.* 1999;285(5433):1573-6.
45. Wiesner J, Borrmann S, Jomaa H. Fosmidomycin for the treatment of malaria. *Parasitol Res.* 2003;90(Suppl 2):S71-6.
46. Reichenberg A, Wiesner J, Weidemeyer C, et al. Diaryl ester prodrugs of FR900098 with improved in vivo antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001;11(6):833-5.
47. Missinou MA, Borrmann S, Schindler A, et al. Fosmidomycin for malaria. *Lancet.* 2002;360(9349):1941-2.
48. Wiesner J, Henschker D, Hutchinson DB, et al. In vitro and in vivo synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(9):2889-94.
49. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011;49(1):2-19.
50. Harris ST, Watts NB, Genant HK, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA.* 1999;282(14):1344-52.
51. Disch A, Schwender J, Muller C, et al. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem J.* 1998;333(Pt 2):381-8.
52. Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:375-88.
53. Ebetino FH, Hogan AM, Sun S, et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone.* 2011;49(1):20-33.
54. Docampo R, Moreno SN. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2001;1(1):51-61.
55. Buckner FS, Eastman RT, Nepomuceno-Silva JL, Speelman EC, Myler PJ, Van Voorhis WC, et al. Cloning, heterologous expression, and substrate specificities of protein farnesyltransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002 Jul;122(2):181-8.
56. Lujan HD, Mowatt MR, Chen GZ, et al. Isoprenylation of proteins in the protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 Jun;72(1-2):121-7.

- 57.Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T. Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*. 2004 Jan 16;279(3):2316-23.
- 58.Field H, Blench I, Croft S, Field MC. Characterisation of protein isoprenylation in procyclic form *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Nov 12;82(1):67-80.
- 59.Ibrahim M, Azzouz N, Gerold P, Schwarz RT. Identification and characterisation of *Toxoplasma gondii* protein farnesyltransferase. *Int J Parasitol*. 2001 Nov;31(13):1489-97.
- 60.Stresing V, Daubine F, Benzaid I, et al. Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2007;257(1):16-35.
- 61.Ghosh S, Chan JM, Lea CR, et al. Effects of bisphosphonates on the growth of *Entamoeba histolytica* and *Plasmodium* species in vitro and in vivo. *J Med Chem*. 2004;47(1):175-87.
- 62.Yardley V, Khan AA, Martin MB, et al. In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(3):929-31.
- 63.Singh AP, Zhang Y, No JH, et al. Lipophilic bisphosphonates are potent inhibitors of *Plasmodium* liver-stage growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(7):2987-93.
- 64.Jordao F, Saito AY, Miguel DC, et al. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activities of risedronate and its interference with protein prenylation in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(5):2026-31.
- 65.Dewick PM. The biosynthesis of C5-C20 terpenoid compounds. *Nat Prod Rep*. 1995; 12(5):507-34.
- 66.Wattenberg LW. Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene (nerolidol). *Carcinogenesis*. 1991;12(1):151-2.
- 67.Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, et al. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 237(2):325-7
- 68.Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*. 1997;89(358):39-46.
- 69.Do Socorro SRMS, Mendonca-Filho RR, Bizzo HR, et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(6):1895-901.
- 70.Correll CC, Ng L, Edwards PA. Identification of farnesol as the non-sterol derivative of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem*. 1994;269(26):17390-3.

71. Marciano D, Ben-Baruch G, Marom M, et al. Farnesyl derivatives of rigid carboxylic acids-inhibitors of ras-dependent cell growth. *J Med Chem.* 1995;38(8):1267-72.
72. Prevost GP, Pradines A, Brezak MC, et al. Inhibition of human tumor cell growth in vivo by an orally bioavailable inhibitor of human farnesyltransferase, BIM-46228. *Int J Cancer.* 2001;91(5):718-22.
73. Dragsted LO, Strube M, Leth T. Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer *Eur J Cancer Prev.* 1997;6(6):522-8.
74. Miquel K, Pradines A, Terce F, et al. Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J Biol Chem.* 1998; 273(40):26179-86.
75. Santos FA, Silva RM, Campos AR, et al. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(4):579-84.
76. Takahashi Y, Kuzuyama T, Watanabe H, et al. Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(1):195-7.
77. Wu Y, Sifri CD, Lei HH, et al. Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(4):973-7.
78. Crabb BS, Cowman AF. Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(14):7289-94.
79. De Koning-Ward TF, Janse CJ, Waters AP. The development of genetic tools for dissecting the biology of malaria parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54: 157-85.
80. Balu B, Adams JH. Advancements in transfection technologies for *Plasmodium*. *Int J Parasitol.* 2007;37(1):1-10.
81. Aravind L, Iyer LM, Wellems TE, et al. *Plasmodium* biology: genomic gleanings. *Cell.* 2003;115(7):771-85.
82. Barkovich R, Liao JC. Metabolic engineering of isoprenoids. *Metab Eng.* 2001;3(1):27-39.
83. Lichtenthaler HK. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant.* 1997;101(3):643.
84. Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF. Tropical infectious diseases: Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(3):203-16.

85. Van Dooren GG, Osafune T, Schwartzbach SD. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1541(1-2):34-53.
86. White NJ. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resist Updat*. 1998;1(1):3-9.
87. Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(11):4097-102.
88. Srivastava IK, Rottenberg H, Vaidya AB. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem*. 1997; 272(7):3961-6.
89. Peters W. The chemotherapy of rodent malaria. LVII. Drug combinations to impede the selection of drug resistance, Part 1: Which model is appropriate? *Ann Trop Med Parasitol*. 1999;93(6):569-87.
90. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976; 193(4254):673-5.
91. Fidock DA, Wellems TE. Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(20):10931-6.
92. Pasvol G, Wilson RJ, Smalley ME, et al. Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978;72(1):87-8.
93. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979;65(3):418-20.
94. Braun-Breton C, Jendoubi M, Brunet E, et al. In vivo time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1986;20(1):33-43.
95. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, et al. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;16(6):710-8.
96. Paul M, Kindler CH, Fokt RM, et al. Isobolographic analysis of non-depolarising muscle relaxant interactions at their receptor site. *Eur J Pharmacol*. 2002; 438(1-2):35-43.
97. Zhang D, Poulter CD. Analysis and purification of phosphorylated isoprenoids by reversed-phase HPLC. *Anal Biochem*. 1993;213(2):356-61.
98. Bailey AM, Mahapatra S, Brennan PJ, et al. Identification, cloning, purification, and enzymatic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Glycobiology*. 2002;12(12):813-20.

- 99.Gardiner DL,Trenholme KR,Skinner-AdamsTS, et al. Overexpression of leucyl aminopeptidase in *Plasmodium falciparum* parasites. Target for the antimalarial activity of bestatin. *J Biol Chem*. 2006;281(3):1741-5.
- 100.Epp C, Raskolnikov D, Deitsch KW. A regulatable transgene expression system for cultured *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar J*. 2008;7:86.
- 101.De Azevedo MF, Gilson PR, Gabriel HB, et al. Systematic analysis of FKBP inducible degradation domain tagging strategies for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, 2012;7(7):e40981.
- 102.Armstrong CM, Goldberg DE. An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. *Nat Methods*. 2007;4(12):1007-9.
- 103.Alexeeva S, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ. Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol*. 2003;185(1):204-9.
- 104.Wang KC, Ohnuma S. Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1529(1-3):33-48.
- 105.Wickham ME, Thompson JK, Cowman AF. Characterisation of the merozoite surface protein-2 promoter using stable and transient transfection in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;129(2):147-56.