

ADRIANA ALEJANDRA MARIN RODRIGUEZ

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

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

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

No mundo a malária mata mais de um milhão de pessoas por ano, sendo uma das doenças infecciosas mais relevantes e um grande problema de saúde pública. Além disso, o surgimento de cepas resistentes aos quimioterápicos utilizados faz necessário o estudo de novos alvos para tratamentos contra esta doença. No nosso laboratório foi demonstrada a biossíntese de produtos derivados de isoprenóides, em *Plasmodium falciparum*, pela via 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Sabe-se que substâncias inibidoras da biossíntese de isoprenóides, dentre essas os terpenos, apresentam atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*. Levando em consideração o anterior, nós avaliamos o potencial antimalárico do álcool perílico (POH) em *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*. Nossos resultados demonstraram que o POH teve efeito inibitório contra o crescimento do *P. falciparum in vitro*, nas cepas 3D7 e K1 com uma IC₅₀ de 4,8 ± 0,5 µM, e 10,41±2,33 µM, respectivamente. Além disso, o POH não teve efeito tóxico na linhagem celular Vero. Ainda, Comprovamos que o POH inibiu a farnesilação de proteínas entre 20 e 37 KDa de *P. falciparum*. Por outro lado, os experimentos *in vivo* não mostraram eficácia do tratamento do POH contra PbGFP em camundongos Balb/c. Em contraste, foi demonstrada a eficácia do POH na de malária cerebral experimental (MCE), em camundongos C57BL6 infectados com PbGFP, indicando uma redução na taxa de incidência da MCE no grupo tratado com POH, tendo 70% de taxa de sobrevivência no grupo tratado com POH comparado com o 30% de sobrevivência os animais não tratados (P<0,05). Além disso, o POH reduziu a inflamação no cérebro dos animais tratados, uma vez que teve uma redução significativa na adesão de leucócitos aos vasos cerebrais (P<0.001), como também, o número de hemorragias foi menor comparados com os animais não tratados. (P<0.0001). Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa abrem novas alternativas no estudo do mecanismo de ação do POH como um terpeno com grande potencial para tratar MC.

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

ABSTRACT

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

Malaria kills over one million people a year worldwide, and is one of the most important infectious diseases and a major public health problem. Furthermore, the emergence of resistant strains to chemotherapeutic agents used, make it necessary to study new targets for treatments against this disease. In our laboratory we have demonstrated the biosynthesis of isoprenoid-derived products in *Plasmodium falciparum*, by the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway. It is known that the substances that inhibit isoprenoid biosynthesis, among these terpenes, have antimalarial activity in vitro and in vivo. Considering this, we evaluate the antimalarial potential of PA (POH) in *P. falciparum* and *P. berghei*. Our results showed that the POH had inhibitory effect against the growth of strains 3D7 and K1 of *P. falciparum* in vitro, with an IC₅₀ of 4.8 μM ± 0.5, and 10.41 ± 2.33 μM, respectively. Furthermore, the POH had no toxic effect on cell line Vero. Moreover, the POH proved that inhibited proteins farnesylation from 20 to 37 kDa of *P.falciparum*. By the other hand, in vivo experiments did not show efficacy on treatment against POH PbGFP in BALB/c mice. In contrast, the effectiveness of POH in the experimental cerebral malaria (MCE) was demonstrated in C57BL6 mice infected with PbGFP, indicating a reduction in the incidence rate of MCE in the group treated with POH, with 70% survival rate in the group treated POH compared with the 30% survival of untreated animals (P <0.05). In addition, the POH reduced inflammation in the brain of treated animals, since it had a significant reduction in leukocyte adhesion to cerebral vessels (P <0.001), as also the number of bleeding was lower compared to untreated animals (P<0.0001). Therefore, the results obtained in this work provide new alternatives to study the POH's mechanism of action as a terpene with great potential to treat MC.

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: Aspectos gerais

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

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

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

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

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

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

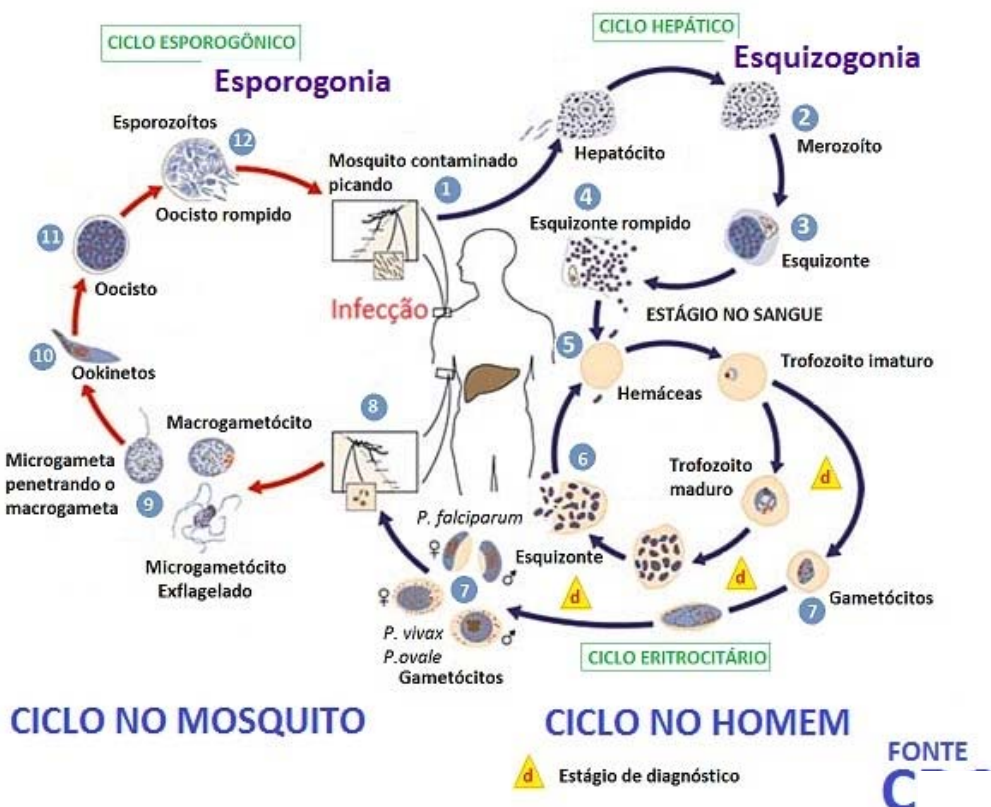


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium*. O ciclo de vida tem duas fases, uma assexuada no hospedeiro humano (setas azuis) e uma sexuada que ocorre no vetor *Anopheles* spp. (setas vermelhas). Durante a alimentação sanguínea, a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítos no hospedeiro humano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

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

1.2 Epidemiologia da malária

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

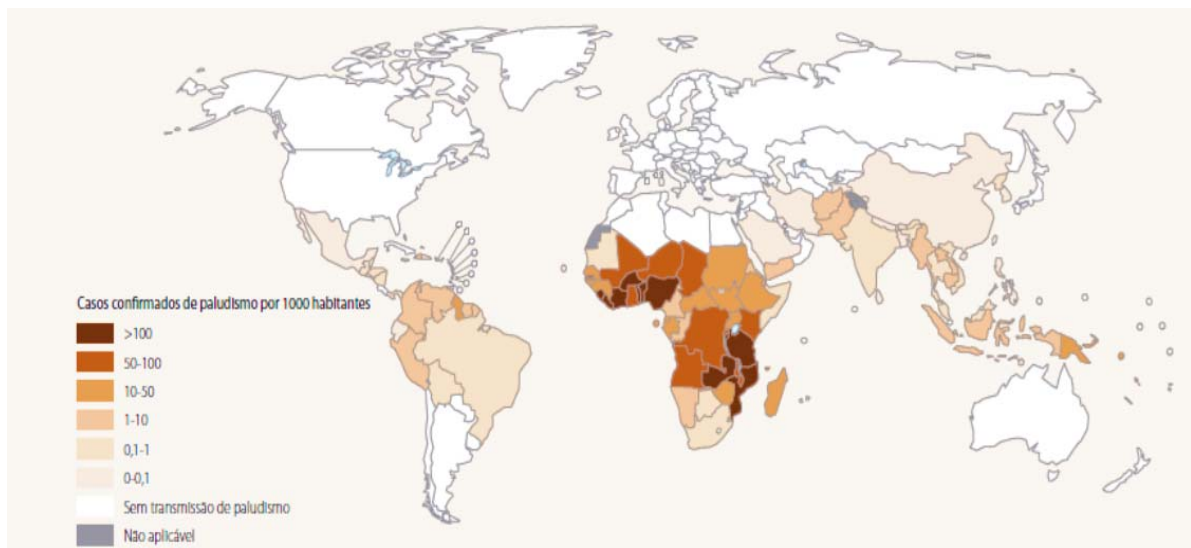


Figura 2. Países com transmissão de malária. A partir do ano 2000, o financiamento e a cobertura dos programas de luta contra a malária aumentaram consideravelmente. O resultado foi uma redução em larga escala da incidência da doença e das respectivas taxas de mortalidade. Dos 106 países com transmissão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

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

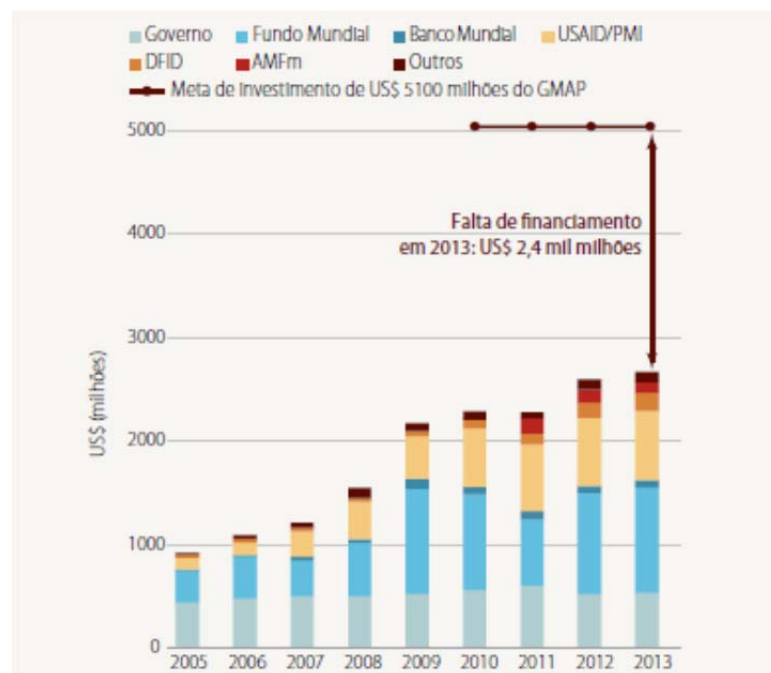


Figura 3. Tendência do financiamento total para o controle e eliminação da malária, 2005-2013, e falta de financiamento estimada em 2013. Fonte: World Health Organization. 2013.

1.1.1 Epidemiologia da malária no Brasil

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

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

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

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

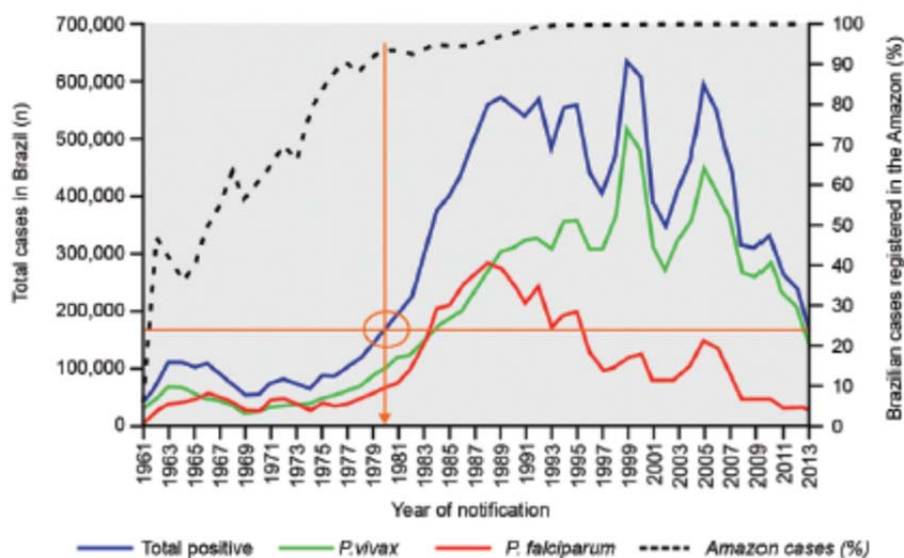


Figura 4. Número de casos de malária registrados anualmente (1961-2013) no Brasil de acordo as espécies de *Plasmodium*. O número de casos aumentaram de forma constante como resultado da rápida colonização da Amazônia, chegando a mais de 573 mil casos em 1989. Dois picos foram registrados em 1999 e 2005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

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

1.3 Medidas de prevenção e controle da malária

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

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

1.4 Vacinas

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

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

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

1.5 Quimioterapia e resistência aos antimaláricos em *Plasmodium falciparum*

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

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

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

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

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

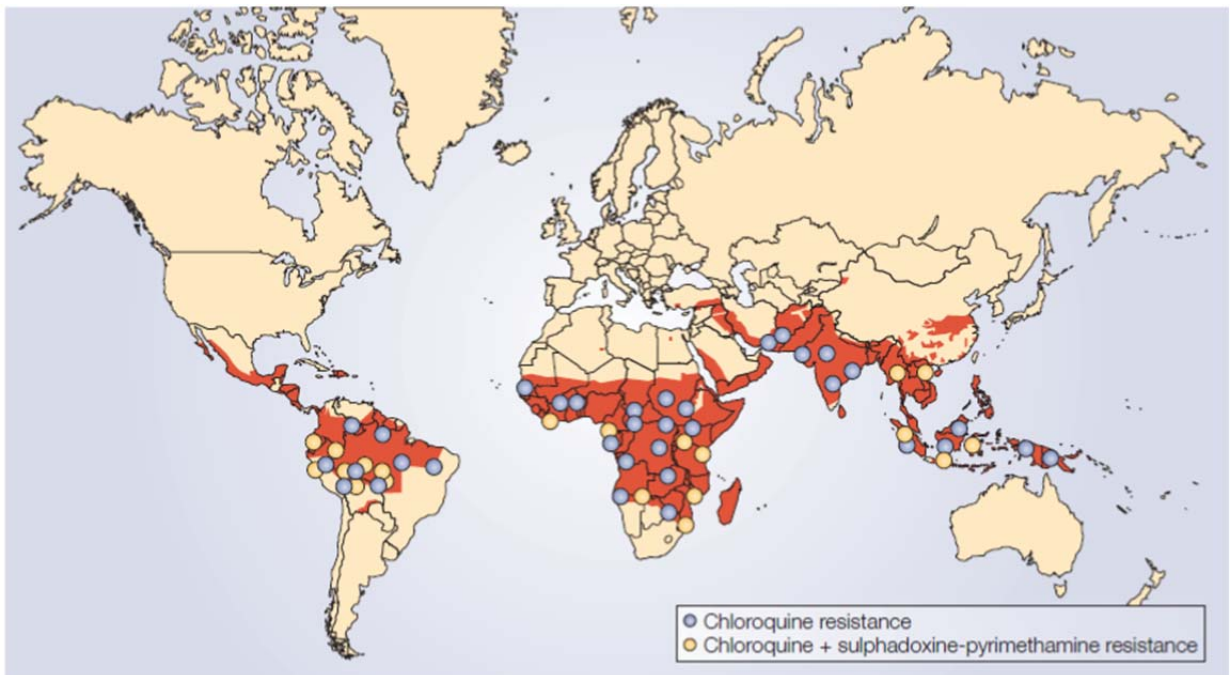


Figura 5. Distribuição global da malária, mostrando áreas onde o *P. falciparum* é resistente às drogas antimaláricas comumente usadas, cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina. A resistência é amplamente disseminada através das zonas endêmicas para malária (áreas vermelhas). Fonte: Fidock A. et al (20).

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

1.6 Isoprenóides

1.6.1 Generalidades

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

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

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

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

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

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

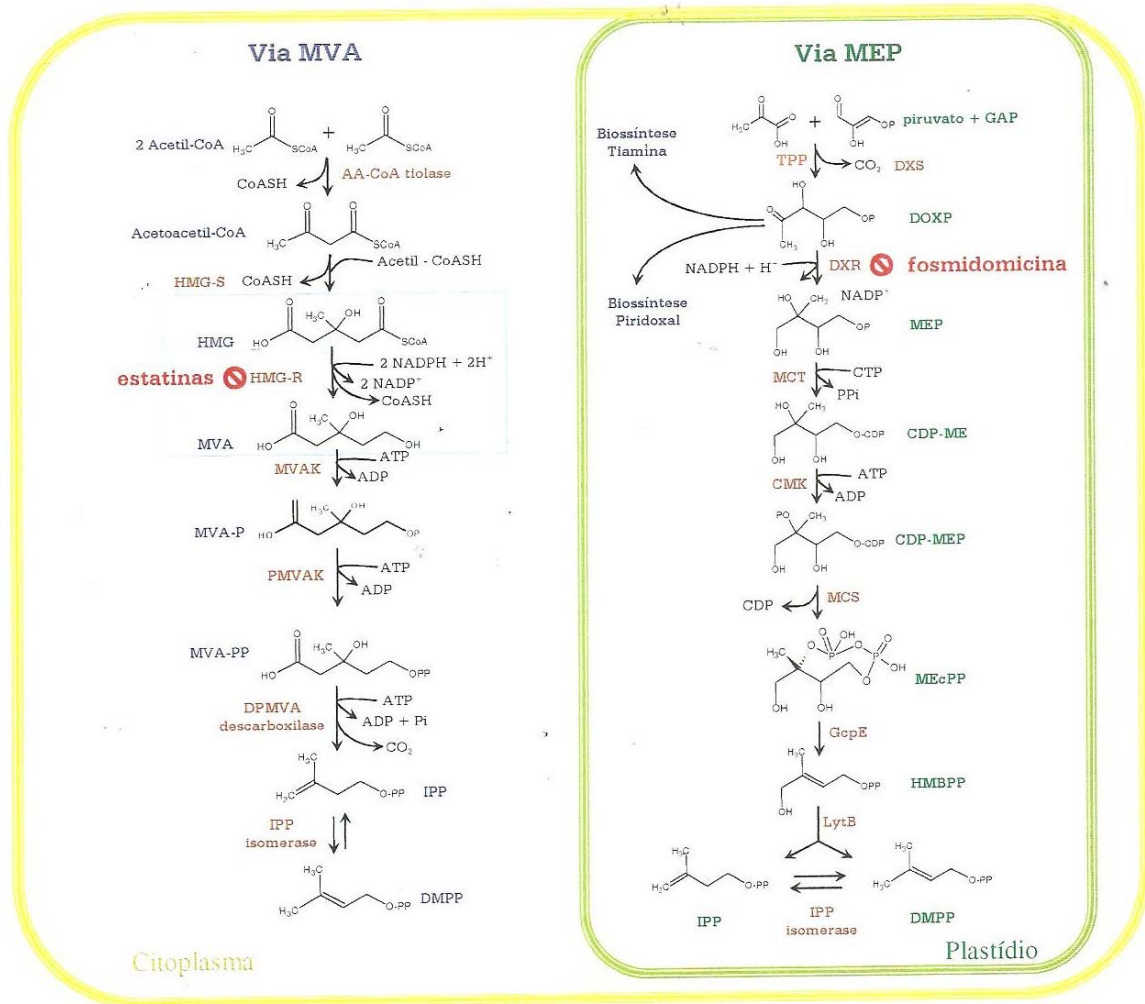


Figura 6. Vias do MVA e MEP para a biossíntese de IPP e DMPP. Em azul encontram-se os nomes de cada intermediário da via do mevalonato (MVA). Em verde encontram-se os intermediários da via MEP. Ø inibição. Fonte: Goulart H. et al (41).

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

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

condensação de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. O gene que codifica esta enzima foi o primeiro a ser clonado a partir de *Escherichia coli* (33). Esta enzima chave da via requer difosfato de tiamina e íons divalentes, tais como Mg²⁺ ou Mn²⁺ para a sua atividade. A enzima reductoisomerase DOXP catalisa o rearranjo e subsequente redução de DOXP. A atividade desta enzima é inibida por fosmidomicina.

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

1.6.2 Biossíntese de isoprenóides em P. falciparum

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

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

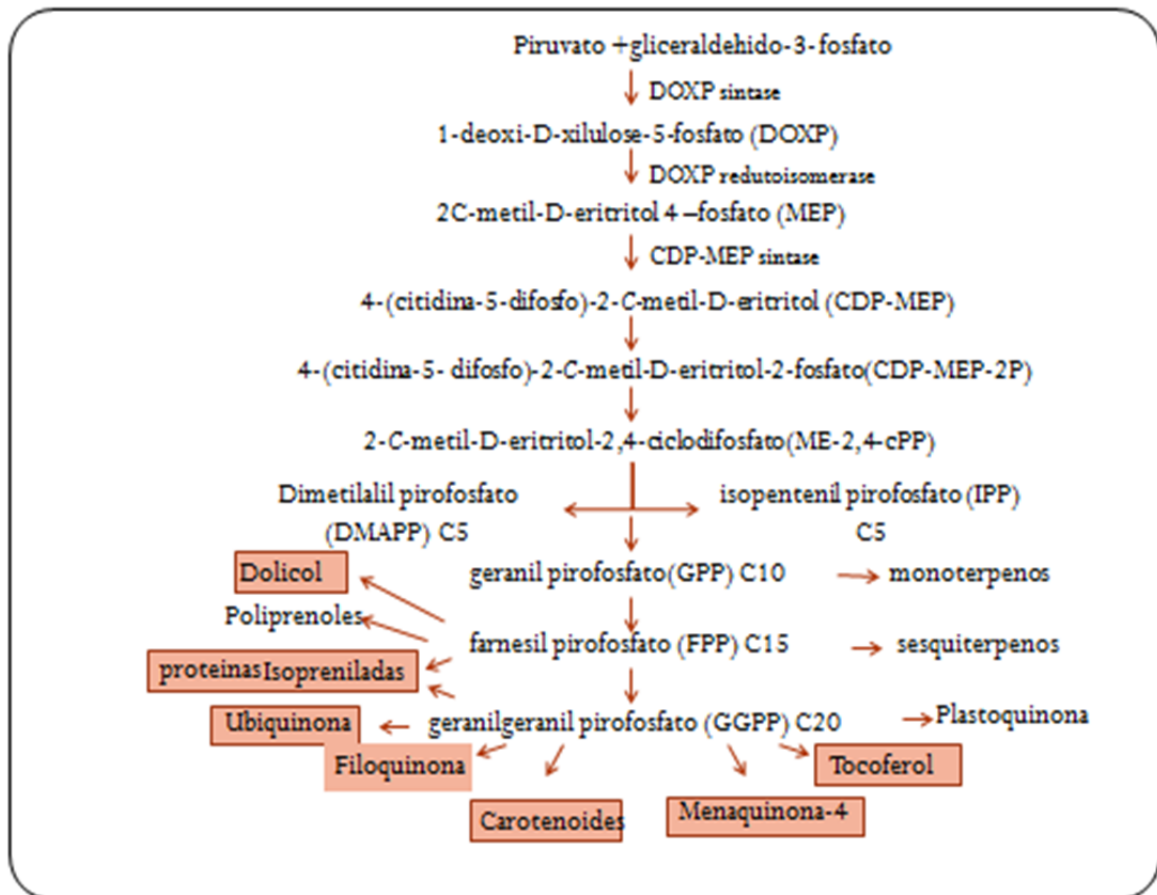


Figura 7. Diagrama da via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) de biossíntese dos isoprenoides em *P. falciparum*. Os isoprenoides são sintetizados por dois precursores, isopentenil pirofosfato e seu isômero, dimetilalil pirofosfato (DMPP). As caixas sombreadas indicam os produtos finais identificados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

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

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

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

falciparum. Os valores de IC₅₀ *in vitro*, foram de 64 µM, 760 nM, 1,22 mM, 1mM, respectivamente.

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

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

Também, outros estudos feitos no nosso laboratório demonstraram que o limoneno tem um efeito inibitório na isoprenilação de proteínas da família RAS (*p21*) de *P. falciparum* as quais estão envolvidas na transdução de sinais e a regulação do crescimento e proliferação celular. (42). O limoneno, um monoterpeneo amplamente distribuído em plantas, é um dos poucos compostos conhecidos que inibe a isoprenilação de proteínas e tem atividade antitumoral *in vivo* (46).

1.7 Isoprenilação de proteínas

1.7.1 Generalidades

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

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

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

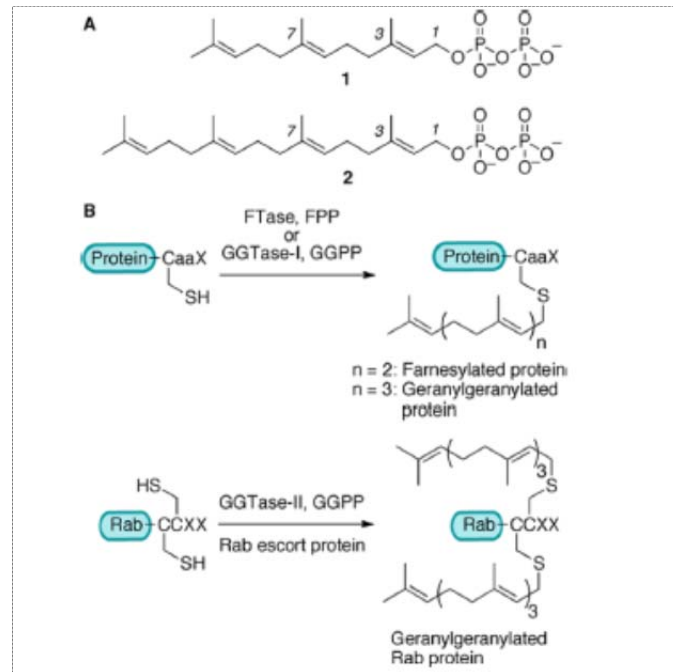


Figura 8. Isoprenilação de proteínas. (A) Estruturas de 1 (farnesil difosfato, FPP) e 2 (geranylgeranyl difosfato, GGPP); (B). Reações catalisadas por enzimas preniltransferases. Fonte: Palsuledesai CC. et al (51).

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

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

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

1.7.1.1 Álcool perílico: generalidades

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

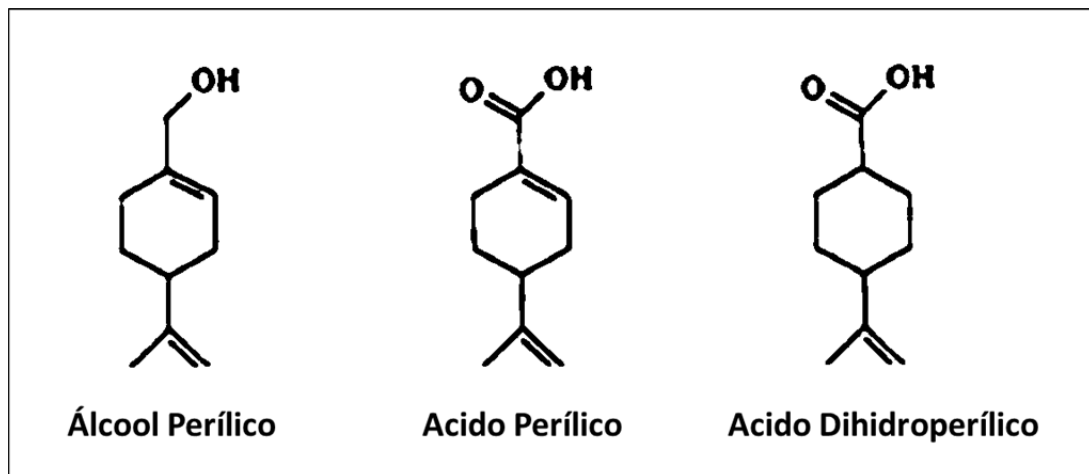


Figura 9. Estrutura do Álcool Perílico (POH) e seus metabólitos. Ácido Perílico (PA) Ácido dihidroperílico (DHPA). Fonte: Yeruva L et al. (54).

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

Muitos estudos têm mostrado que o álcool perílico é um potente agente quimioterapêutico contra vários tipos de câncer, incluindo pâncreas, mama, ovário e fígado. Vários pesquisadores mediram os efeitos de diferentes concentrações de álcool perílico em linhagens celulares de tumores pancreáticos humanos e de hamster. O tratamento das células tumorais pancreáticas durante dois dias resultou num decréscimo dependente da dose na proliferação celular, com valores de IC₅₀ de 290 e 480 μM para as linhas de células de hamster e humanas, respectivamente. (55)

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

Outras pesquisas tiveram a finalidade de investigar qual das três proteínas transferases são inibidas por POH observando a prenilação das proteínas Ras, RhoA e Rab6 a partir de [¹⁴C] mevalonolactona marcada em células NIH3T3 sendo que as proteínas Ras, RhoA e Rab6 são preniladas por FPTase, GTPase tipo I, e GGPTase II, respectivamente. Os resultados mostraram que a isoprenilação de RhoA e Rab6 foram inibidas por POH com valores de 1,0 e 0,5 mM, respectivamente (58).

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

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

1.7.1.3 Estudos clínicos

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

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

1.7.1.4 Liberação intranasal

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

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

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

6 CONCLUSÕES

- Através da padronização do ensaio de fluorescência usando Sybrgreen I para nossas condições de laboratório mostramos que é um método rápido, objetivo e sensível para quantificação de parasitas cultivados “*in vitro*”.
- O POH inibiu a crescimento *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, com uma concentração inibitória de 4.8 μ M (IC₅₀).
- Demonstramos que o POH não teve efeito tóxico para linhagem celular Vero, o qual mostra uma grande especificidade do POH contra o *P. falciparum*, tendo um índice de seletividade de 30, 97.
- Comprovamos que o POH inibe a farnesilação de proteínas entre 20 e 37 KDa de *P. falciparum*, sugerindo um efeito inibitório da FTase como possível mecanismo de ação *in vitro*.
- A utilização da cepa *P. berghei* ANKAGFP nos permitiu avaliar de forma eficaz, simples e rápida por citometria do fluxo, o crescimento do *P. berghei* em camundongos infectados, gerando uma ferramenta útil estabelecida no nosso laboratório.
- O POH via intranasal não teve efeito contra o crescimento do *P. berghei* em camundongos infectados.
- O POH via intranasal teve um efeito preventivo na MCE, uma vez que a taxa de incidência de malária cerebral nos camundongos tratados foi significativamente menor comparada com os animais não tratados.

REFERÊNCIAS*

1. Lacerda-Queiroz N. Imunopatogênese da malária cerebral Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Bras Neurol.* 2008;44(1):13–9.
2. Brian de Souza J, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect.* 2002 Mar;4(3):291–300.
3. Newton CRJC, Hien TT, White N. Cerebral malaria. *Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;433–41.
4. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. 2002;415(February):673–9.
5. De Souza JB, Hafalla JCR, Riley EM, Couper KN. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology.* 2010 Apr;137(5):755–72.
6. De Kossodo S, Grau GE. Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral malaria. *J Immunol.* 1993 Nov 1;151(9):4811–20.
7. Neill AL, Hunt NH. Pathology of fatal and resolving *Plasmodium berghei* cerebral malaria in mice. *Parasitology.* 1992 Oct;105 (Pt 2):165–75.
8. Kondrachine A V, Trigg PI. Global overview of malaria. *Indian J Med Res [Internet].* 1997 Aug [cited 2015 May 26];106:39–52.
9. World Health Organization. World malaria report 2014 [Internet]. Switzerland; 2014 Feb. Available from: www.who.int
10. World Health Organization. World malaria report 2013. France; 2013.
11. Pina-Costa A De, Brasil P, Santi SM Di, Araujo MP De, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFES, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Aug;109(5):618–33.
12. Pimenta PF, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Ríos-Velásquez CM, Melo FF, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Feb 13;110(February):23–47.
13. Trigg PI, Kondrachine AV. Commentary : Malaria control in the 1990s. *Bulletin OMS.* 1998;76(May 1955):11–6.
14. Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med.* 2010 Mar;30(1):93–129.

*De acordo com:

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

15. Nardin E. The past decade in malaria synthetic peptide vaccine clinical trials. *Hum Vaccin*. 2014 Oct 27;6(1):27–38
16. Mueller I, Genton B, Betuela I, Alpers MP. Vaccines against malaria: Perspectives from Papua, New Guinea. *Hum Vaccin*. 2014 Oct 27;6(1):17–20.
17. Casares S, Richie TL. Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. *Curr Opin Immunol*. 2009 Jun;21(3):321–30.
18. Bruce-Chwatt LJ. Cinchona and its alkaloids: 350 years. *N Y State J Med [Internet]*. 1988 Jun [cited 2015 May 27];88(6):318–22.
19. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Reviews Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet*. 2002;2:209–18.
20. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Simon I. Europe PMC Funders Group The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2011;434(7030):214–7.
21. Rønn AM, Msangeni HA, Mhina J, Wernsdorfer WH, Bygbjerg IC. High level of resistance of *Plasmodium falciparum* to sulfadoxine-pyrimethamine in children in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;90(2):179–81.
22. Checchi F, Durand R, Balkan S, Vonhm BT, Kollie JZ, Biberson P, et al. High *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Harper, Liberia: results in vivo and analysis of point mutations. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;96(6):664–9.
23. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin O a, Akinboye DO, Yusuf BO, Ebong OO, et al. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Trop*. 2005 Sep;95(3):183–93.
24. World Health Organization. the use of antimalarial drugs report of an informal consultation. Switzerland; 2001.
25. Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2100–4.
26. Jordão FM, Saito AY, Miguel DC, de Jesus Peres V, Kimura EA, Katzin AM. In vitro and in vivo antiplasmodial activities of risedronate and its interference with protein prenylation in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May;55(5):2026–31.
27. Beytia ED, Porter JW. Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*. 1976 Jan;45:113–42.
28. Joseph L. Goldstein & Michael. Regulation of mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343.

29. Mep DD, Wanke M, Skorupinska-tudek K, Swiezewska E. Isoprenoid biosynthesis. *Quarterly*. 2001;48(3):663–72.
30. Jordão FM, Kimura EA, Katzin AM. Isoprenoid biosynthesis in the erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106:134–41.
31. Rohmer M, Knani TM, Simonin P, Sutter B, Sahmt H, Nationale E, et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem*.1993;524:517–24.
32. Cvejic JH, Rosa S, Y AE, Hattori R, Y TH, Y MR. Bacterial triterpenoids of the hopane series as biomarkers for the chemotaxonomy of *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Ralstonia* spp. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;183:295–9.
33. Lois M, Campos N, Putra S, Danielsen K, Rohmer M and Boronat A. Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D -1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*.1998;95(March):2105–10.
34. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*. 1997 Nov 27;390(6658):407–9.
35. Roos DS, Crawford MJ, Donald RGK, Fraunholz M, Harb OS, He CY, et al. Mining the *Plasmodium* genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002 Jan 29;357(1417):35–46.
36. Wilson RJMI. Progress with parasite plastids. *J Mol Biol*. 2002 May 31;319(2):257–74.
37. Couto AS, Kimura EA, Peres VJ, Uhrig ML, Katzin AM. *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units. *Biochem*.1999;637:629–37.
38. D’Alexandri FL, Kimura EA, Peres VJ, Katzin AM. Protein dolichylation in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. 2006 Nov 27;580(27):6343–8.
39. Sussmann R a C, Angeli CB, Peres VJ, Kimura E a, Katzin AM. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin E. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*; 2011 Dec 15;585(24):3985–91.
40. Tonhosolo R, D’Alexandri FL, de Rosso V V., Gazarini ML, Matsumura MY, Peres VJ, et al. Carotenoid Biosynthesis in Intraerythrocytic Stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2009 Feb 9;284(15):9974–85.
41. Goulart HR, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Duarte FAA, Katzin AM. Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(7):2502–9.
42. Moura IC, Wunderlich G, Uhrig ML, Couto AS, Kimura LIAA, Peres VJ, et al. Limonene Arrests Parasite Development and Inhibits Isoprenylation of Proteins in

- Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(9):2553–8.
43. Otto A, White JD, Simoneit BRT. Natural product terpenoids in Eocene and Miocene conifer fossils. *Science*. 2002 Aug 30;297(5586):1543–5.
 44. Sybilska D, Asztemborska M. Chiral recognition of terpenoids in some pharmaceuticals derived from natural sources. *J Biochem Biophys Methods*. 2002 Dec 31;54(1-3):187–95.
 45. Lopes NP, Kato MJ, Maia GS, Yoshida M, Planchart AR, Katzin AM. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waia ~ pi Amazon Indians. *Ethnopharmacology*. 1999;67:313–9.
 46. Crowell PL, Ren Z, Lin S, Vedejs E, Gould MN. Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochem Pharmacol*. 1994 Apr 20;47(8):1405–15.
 47. Kamiya Y, Sakurai A, Tamura S, Takahashi N. Structure of rhodotorucine A, a novel lipopeptide, inducing mating tube formation in *Rhodospiridium toruloides*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978 Aug 14;83(3):1077–83.
 48. Wolda S, Glomset JA. Evidence for Modification of Lamin B by a Product of. *Biological Chemistry*. 1988;5–8.
 49. Farnsworth CC, Wolda SL, Gelbs MH, Glomsetg JA. Human Lamin B Contains a Farnesylated Cysteine Residue *. *Biological Chemistry*. 1989;264(34):20422–9.
 50. Chakrabarti D, Da Silva T, Barger J, Paquette S, Patel H, Patterson S, et al. Protein farnesyltransferase and protein prenylation in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):42066–73.
 51. Palsuledesai CC, Distefano MD. Protein prenylation: enzymes, therapeutics, and biotechnology applications. *ACS Chem Biol*. 2015 Jan 16;10(1):51–62.
 52. Da Fonseca CO, Linden R, Futuro D, Gattass CR, Quirico-Santos T. Ras pathway activation in gliomas: a strategic target for intranasal administration of perillyl alcohol. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56(4):267–76.
 53. Gelb MH, Tamanoi F, Yokoyama K, Ghomashchi F, Esson K, Gould MN. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. *Cancer Lett*. 1995 May 8;91(2):169–75.
 54. Yeruva L, Pierre KJ, Elegbede A, Wang RC, Carper SW. Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*. 2007 Nov 18;257(2):216–26.
 55. Belanger JT. Perillyl Alcohol : Applications in Oncology Perillyl Alcohol. *Alternative Medicine*. 1998;3(6):448–57.

56. Afshordel S, Kern B, Clasohm J, König H, Priester M, Weissenberger J, et al. Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation--impact of Ras-/Rho-prenylation. *Pharmacol Res. Elsevier Ltd*; 2015 Jan;91:69–77.
57. Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell Cycle Arrest by the Isoprenoids Perillyl Alcohol , Geraniol , and Farnesol Is Mediated by p21 Cip1 and p27 Kip1 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells.*Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;320(3):1163–70.
58. Elsonj CE, Gould MN. Inhibition of Type I and Type II Geranylgeranyl- Protein Transferases by the Monoterpene Perillyl Alcohol in NIH3T3 Cells.*Biochemical Pharmacology*. 1997;54:113–20.
59. Vivo I, He L, Mo H, Hadisusilo S, Qureshi AA, Elson CE. Biochemical and Molecular Roles of Nutrients Isoprenoids Suppress the Growth of Murine B16 Melanomas In Vitro.*The Journal of Nutrition*. 1997;(September 1996):668–74.
60. D'Alincourt Salazar M, da Silva RF, Da Fonseca CO, Lagrota-Candido J, Quirico-Santos T. Intranasal administration of perillyl alcohol activates peripheral and bronchus-associated immune system in vivo. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014 Feb;62(1):59–66.
61. Bailey HH, Levy D, Harris LS, Schink JC, Foss F, Beatty P, et al. A Phase II Trial of Daily Perillyl Alcohol in Patients with Advanced Ovarian Cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2E96. *Gynecol Oncol*. 2002 Jun;85(3):464–8.
62. Bailey HH, Attia S, Love RR, Fass T, Chappell R, Tutsch K, et al. Phase II trial of daily oral perillyl alcohol (NSC 641066) in treatment-refractory metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Jun;62(1):149–57.
63. Serwer LP, James CD. Challenges in drug delivery to tumors of the central nervous system: an overview of pharmacological and surgical considerations. *Adv Drug Deliv Rev. Elsevier B.V.*; 2012 May 15;64(7):590–7.
64. Da Fonseca CO, Schwartsmann G, Fischer J, Nagel J, Futuro D, Quirico-Santos T, et al. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. *Surg Neurol*. 2008 Sep;70(3):259–66; discussion 266–7.
65. Da Fonseca CO, Simão M, Lins IR, Caetano RO, Futuro D, Quirico-Santos T. Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Feb;137(2):287–93.
66. Trager W; JJ. Human Malaria parasites in continuous culture. *Science (80-)*. 1976;193(August):673–5.
67. Kimura EA, Couto AS, Peres VJ, Casal OL, Katzin AM. N -Linked Glycoproteins Are Related to Schizogony of the Intraerythrocytic Stage in Plasmodium falciparum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996;271(24):14452–61.

68. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979 Jun;65(3):418–20.
69. Goodyer ID, Johnson J, Eisenthal R, Hayes DJ. Purification of mature-stage *Plasmodium falciparum* by gelatine flotation. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994 Apr;88(2):209–11.
70. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 May;48(5):1803–6.
71. Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*. 2003 Jan;10(6-7):499–503.
72. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
73. Carroll RW, Wainwright MS, Kim K-Y, Kidambi T, Gómez ND, Taylor T, et al. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS One*. 2010 Jan;5(10):1–12.
74. Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006 Apr;32(2):177–88.
75. Trager W, Jensen JB. Cultivation of malarial parasites. *Nature* [Internet]. 1978 Jun 22 [cited 2014 Aug 28];273(5664):621–2.
76. Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp Parasitol*. Elsevier Inc.; 2009 Feb;121(2):144–50.
77. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, et al. Novel Rapid , and Inexpensive Cell-Based Quantification of Antimalarial Drug Efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(5):1807–10.
78. Johnson JD, Denuall R a, Gerena L, Lopez-Sanchez M, Roncal NE, Waters NC. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jun;51(6):1926–33.
79. Olagnier D, Costes P, Berry A, Linas M-D, Urrutigoity M, Dechy-Cabaret O, et al. Modifications of the chemical structure of terpenes in antiplasmodial and antifungal drug research. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 Nov 15;17(22):6075–8.
80. Arruda DC, D’Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SRB. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 May;49(5):1679–87.

81. Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katzin AM, Uliana SRB. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother*. Elsevier Masson SAS; 2009 Nov;63(9):643–9.
82. AbouLaila M, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitol Int*. Elsevier Ireland Ltd; 2010 Jun;59(2):278–82.
83. Campbell WE, Gammon DW, Smith P, Abrahams M, Purves TD. Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Med*. 1997 Jun;63(3):270–2.
84. Duker-Eshun G, Jaroszewski JW, Asomaning WA, Oppong-Boachie F, Olsen CE, Christensen SB. Antiplasmodial activity of labdanes from *Aframomum latifolium* and *Aframomum sceptrum*. *Planta Med*. 2002 Jul;68(7):642–4.
85. Xu N, Shen N, Wang X, Jiang S, Xue B, Li C. Protein prenylation and human diseases: a balance of protein farnesylation and geranylgeranylation. *Sci China Life Sci*. 2015 Apr;58(4):328–35.
86. Perez-sala D. Department of Protein Science, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain. 2007;4456–72.
87. Eastman RT, Buckner FS, Yokoyama K, Gelb MH, Van Voorhis WC. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation. *J Lipid Res*. 2006 Feb;47(2):233–40.
88. Weiss L. *Plasmodium berghei*: A Mouse Model for the “ Sudden and ‘ Malarial Lung ’ Syndromes Death ” The rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* is lethal in all mice whereas in hamsters infected with *P . berghei* did not since the mice did not become cyanotic. *Experimental Parasitology*. 1983;151:143–51.
89. Pedroni HC, Bettoni CC, Spalding SM, Dalla Costa T. *Plasmodium berghei*: development of an irreversible experimental malaria model in Wistar rats. *Exp Parasitol*. 2006 Jul;113(3):193–6.
90. Relationship II. Murine Malaria. 1971;102:98–102.
91. Nogueira F, Rosário VE Do. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2010 Sep;1(3):109–24.
92. Morgan-Meadows S, Dubey S, Gould M, Tutsch K, Marnocha R, Arzoomanin R, et al. Phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily continuously. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003 Nov;52(5):361–6.
93. Rénia L, Grüner AC, Snounou G. Cerebral malaria: in praise of epistemes. *Trends Parasitol*. 2010 Jun;26(6):275–7.

94. Hunt NH, Grau GE, Engwerda C, Barnum SR, van der Heyde H, Hansen DS, et al. Murine cerebral malaria: the whole story. *Trends Parasitol.* 2010 Jun;26(6):272–4.
95. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin J-C, van Rooijen N, Viguier M, et al. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol.* 2002;169(11):6369–75.
96. Marijon A, Bonnot G, Fourier A, Bringer C, Lavoignat A, Gagnieu M, et al. Efficacy of intranasal administration of artesunate in experimental cerebral malaria. *Malaria Journal.* 2014;1–10.
97. Islam F, Complete M. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet.* San Fr. 2005;717–25.
98. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): An open-label, randomised trial. *Lancet [Internet]. Elsevier Ltd;* 2010;376(9753):1647–57.
99. Mturi N, Musumba CO, Wamola BM, Ogutu BR, Newton CRJC. Cerebral malaria: Optimising management. *CNS Drugs.* 2003. p. 153–65.
100. Touitou E, Waknine JH, Godin B, Golenser J. Treatment of malaria in a mouse model by intranasal drug administration. *Int J Parasitol.* 2006 Dec;36(14):1493–8.
101. Carvalho LJM, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Pelajo-Machado M, Lenzi HL. Germinal center architecture disturbance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in CBA mice. *Malar J.* 2007;6:59.
102. Clemmer L, Martins YC, Zanini GM, Frangos J a, Carvalho LJM. Artemether and artesunate show the highest efficacies in rescuing mice with late-stage cerebral malaria and rapidly decrease leukocyte accumulation in the brain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Apr;55(4):1383–90.