

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

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 squalestatin, fosmidomicina, 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 the squalestatin 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 high-express showed IC₅₀ value of 5 μM to isolate 3D7 whereas for strain phyto-HA-pRM2 was 30 μM, suggesting that the enzyme phytoene synthase could be the target of squalestatin at *P. falciparum*, and presumably this compound could be a potential

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

1 INTRODUÇÃO

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 terçã 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 terçã 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 terçã 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].

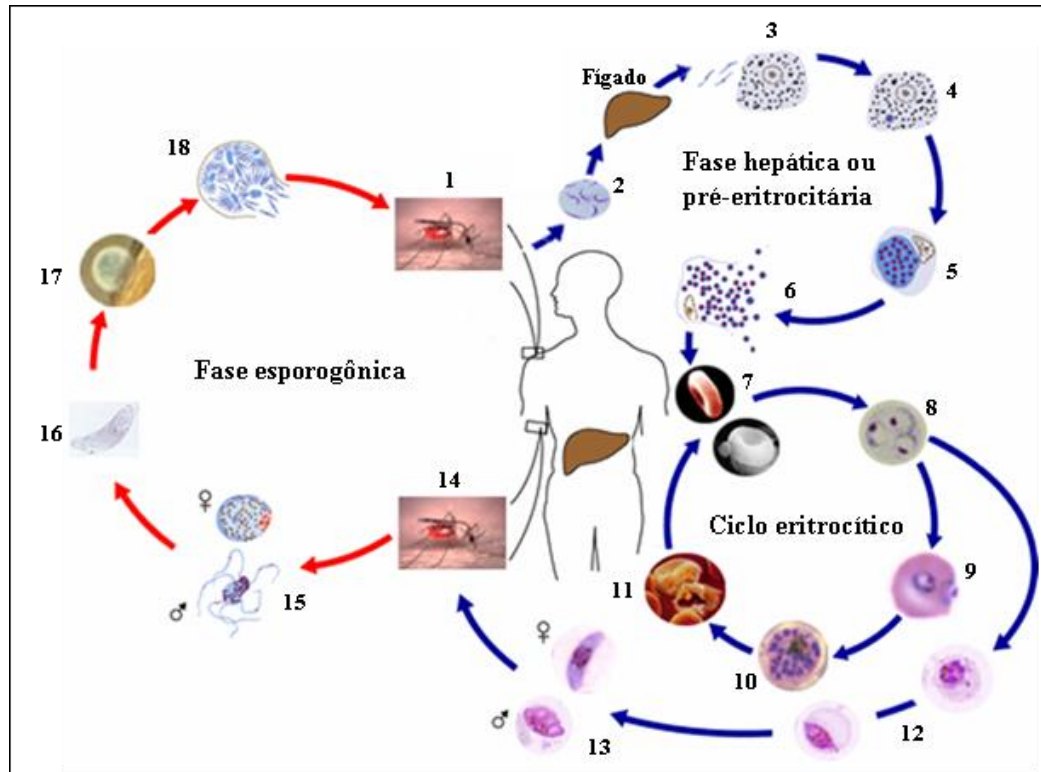
1.3.2 Ciclo no hospedeiro invertebrado

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 ingeridos 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, doxiciclina 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].

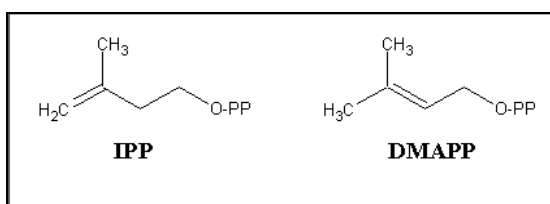
Dentre eles incluem-se compostos como ubiquinona, dolicois, compostos isoprênicos ligados às proteínas e RNA, hormônios em animais e plantas, carotenóides, vitaminas e óleos essenciais.

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 gliberilinas, 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.



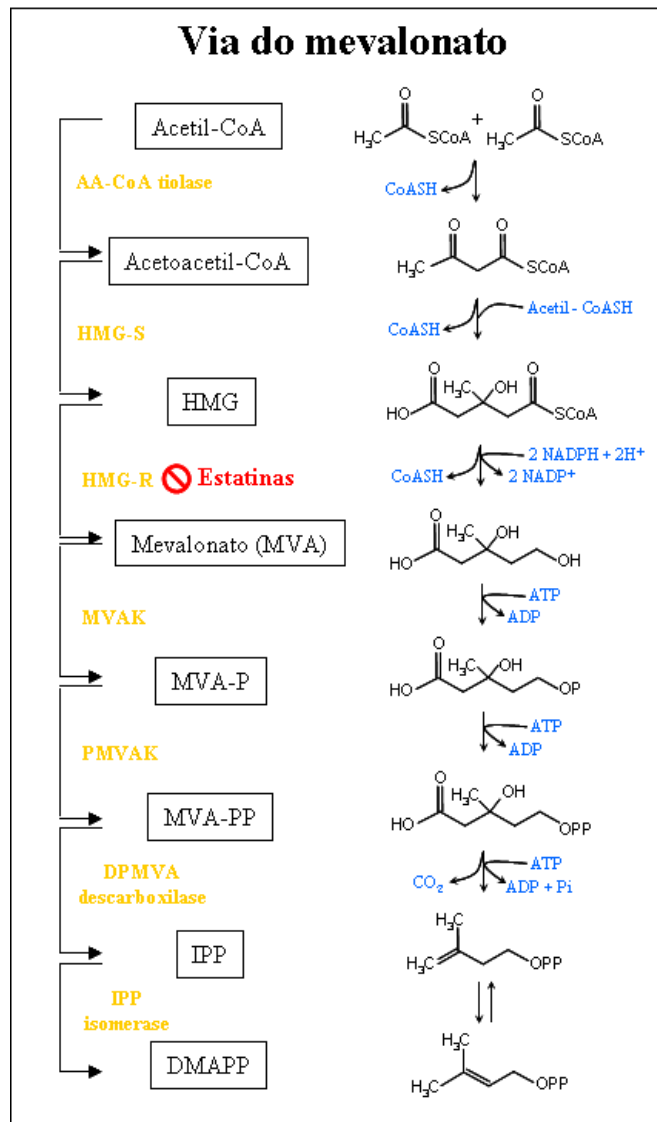
1.6 Biossíntese de isoprenóides

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 seqüência, 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-reductase (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.

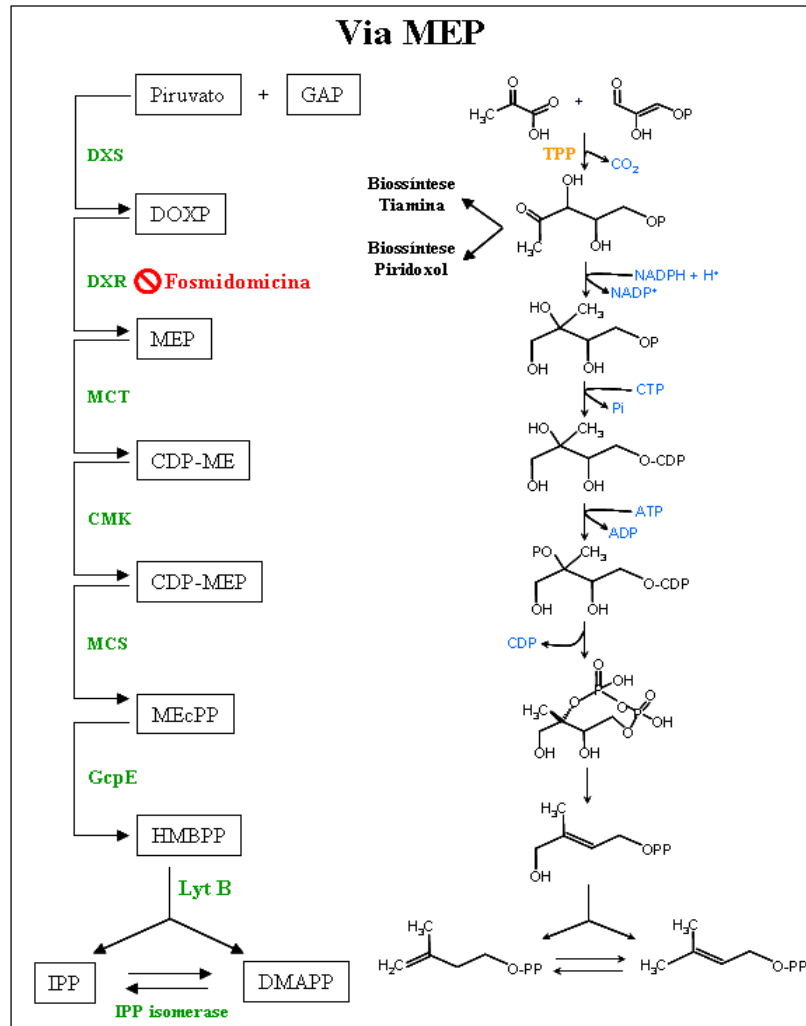
1.7 Via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)

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-ciclopirofosfato; 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-ciclopirofosfato 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 geranylgeranila (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 arqueobacteria, 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 [1-³H]FPP e [1-³H]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 isoprenóides lineares (GPP, FPP e GGPP), que são intermediários para biossíntese de diferentes produtos tais como: dolicois 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 esqualestatina inibe a fitoeno sintase em plantas, como descrita mais detalhadamente no item 1.10.1.

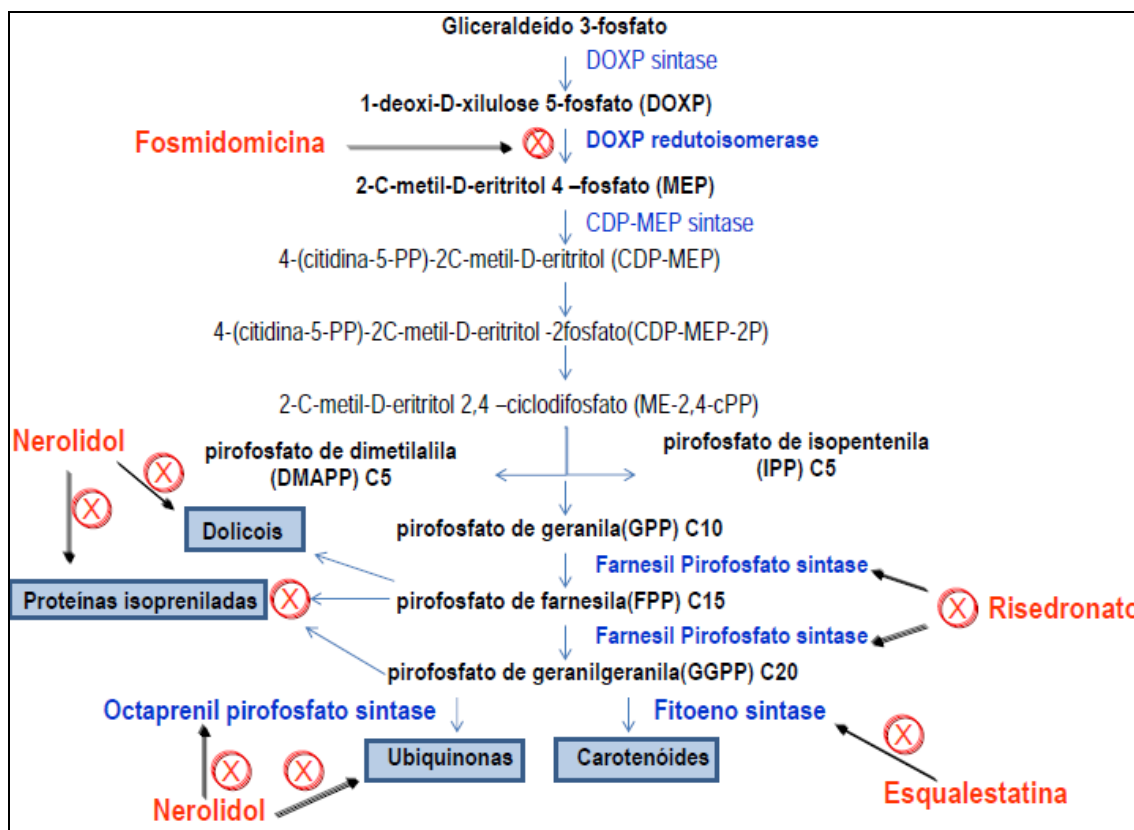
A presença da via ativa para a biossíntese de carotenóides em *P. falciparum* nos remete a dar atenção ao apicoplasto. Por ser uma organela muito similar aos plastídios de plantas, acredita-se que possa apresentar o mesmo perfil metabólico [15,16], em que a via MEP é utilizada para a biossíntese de carotenóides 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 esqualestatina, 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 à 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 sanguínea 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.

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. Estructure and catalytic mechanism of 2-Cmethyl D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MECDP) synthase, an enzyme in the non mevalonate pathway of isoprenoid synthesis. *Acta Crystallogr D BiolCrystallogr*. 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'Alexandri 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'Alexandri 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. *Chemioterapia.* 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-Adams TS, 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.