

Biomédica 2003;23:351-63

REVISION DE TEMA

La mitocondria en el género *Plasmodium*

César Segura, Silvia Blair

Grupo Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

La mitocondria en las células eucarióticas juega un papel central en el metabolismo energético. En *Plasmodium*, la mitocondria se adapta morfológica y fisiológicamente a las condiciones metabólicas de sus hospederos. Así, en el mosquito, los gametocitos tienen un metabolismo aerobio y una mitocondria de apariencia típica, mientras que en vertebrados, los esporozoítos y merozoítos responden a un metabolismo microaerófilo, su mitocondria tiene pocas crestas y matriz menos densa. Como consecuencia de estos cambios metabólicos, la cadena transportadora de electrones y la susceptibilidad a los inhibidores mitocondriales difiere sustancialmente. La dependencia de la síntesis *de novo* de pirimidinas a inhibidores metabólicos ha sido de particular interés en el desarrollo de drogas antimaláricas. El objeto de esta breve revisión es describir las adaptaciones de la mitocondria de *Plasmodium* durante su desarrollo y su potencial como blanco terapéutico. Se mencionan los aspectos bioquímicos importantes de la función mitocondrial en *Plasmodium*.

Palabras clave: mitocondria, *Plasmodium*, malaria, complejos mitocondriales I, II, III y IV, blanco terapéutico.

Mitochondria in the malaria genus *Plasmodium*

In eukaryotic cells, mitochondria are the ATP-producing and oxygen respiring organelles. In malaria cells, mitochondria adapts morphologically and physiologically to the metabolic conditions of the host. Therefore, in the mosquito, gametocytes have aerobic metabolism and a mitochondria of typical appearance, whereas in the vertebrate, sporozoites and merozoites respond to a microaerophilic metabolism and the mitochondria have cristae inner membranes and a low density matrix. Consequently, its electron transport chain and susceptibility to mitochondrial-inhibitors differ substantially. The influence of metabolic inhibitors on pyrimidine *de novo* synthesis has been of particular interest in malaria drug development. The current review briefly describes adaptations of *Plasmodium* mitochondria during development, biochemical aspects of mitochondrial function and the potential of mitochondria as antimalarial drug targets.

Key words: mitochondria, *Plasmodium*, malaria, mitochondrial complexes I, II, III y IV, therapeutic target.

La mitocondria se especializa en la síntesis de ATP en la célula mediante procesos como la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones (1). Está conformada por dos membranas, una interna, otra externa y una matriz: la membrana externa es permeable para metabolitos pequeños debido a la presencia del canal aniónico

dependiente de voltaje (VIDAC), el cual tiene preferencia por nucleótidos y compuestos fosforilados, su límite de permeabilidad es de 1.500 Dalton. La membrana externa permite el intercambio de sustancias con el medio citoplasmático. La membrana interna funciona como un aislante eléctrico, es impermeable para iones y metabolitos hidrofílicos; en ella se insertan los diferentes complejos encargados del transporte de electrones y mantiene un gradiente iónico (de protones) negativo, esenciales para la síntesis de ATP; esta membrana presenta diversas invaginaciones denominadas 'crestas' que le sirven

Correspondencia:

César Segura, Carrera 51D No. 62-29. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Fax: 263 3509

davidsz@epm.net.co

Recibido: 10/01/03; aceptado: 3/06/03

para aumentar su eficiencia. La cadena transportadora de electrones en la membrana interna mitocondrial está conformada por tres complejos (complejos I, III y IV), energéticamente acoplados, que funcionan como bombas protónicas de oxidación-reducción (2). La organización funcional de los complejos en la mitocondria es bien conservada entre las especies con algunas diferencias en el parásito (1). En la matriz se llevan a cabo procesos metabólicos como el ciclo del ácido tricarbóxico, la oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de ubiquinol y del hemo, entre otros (1). Este artículo pretende dar una visión general de la mitocondria del parásito respecto a los componentes relacionados con el transporte de electrones y el metabolismo energético, que han sido sugeridos y aplicados en el control del crecimiento del parásito.

El genoma mitocondrial de *Plasmodium*

El plasmodio contiene un genoma nuclear con 14 cromosomas y 2 moléculas de ADN extra-cromosómico, una de 6 kb de origen mitocondrial y otra de 35 kb de origen plástido (3). El genoma mitocondrial de *Plasmodium falciparum* es una hebra de ADN de doble cadena (4) que contiene tres marcos de lectura para tres proteínas: CoxI, CoxIII (subunidades I y III de la citocromo oxidasa) y Cytb (citocromo b) (5,6) (figura 1), las cuales se expresan diferencialmente durante el desarrollo intraeritrocitario del parásito (cuadro 1) (7); esto sugiere la transferencia del material genético mitocondrial hacia el núcleo. El genoma mitocondrial genera mRNA y rARN de tamaño pequeño altamente fragmentados (8), lo que indica, además, que los mRNA y rARN son transcritos policistricamente (3,5,8). El trazado del mapa de los transcritos mitocondriales de *P. falciparum* muestra que los extremos 3' del final de cada gen lindan directamente con los extremos 5' del siguiente gen (figura 1). Los datos obtenidos son consistentes con la generación de mRNA cortos con la adición de una cola de poli A a partir del transcritto policistrico precursor. Rehkopf *et al.* (8) informan que la presencia y la longitud variable de las colas poli-A son gen-específicas y sugieren que la poliadenilación de los mRNA mitocondriales de *P. falciparum* difiere de los mRNA de otros organismos. Los análisis de

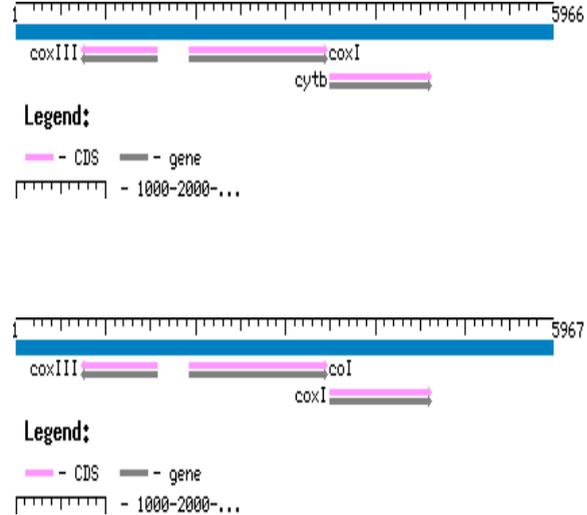


Figura 1. Genoma completo de la mitocondria de *Plasmodium reichenowi*, total de bases secuenciadas 5.966 bp (A)(9) y *Plasmodium falciparum*, con un total de bases secuenciadas de 5.967 bp (B)(5): Cox I, citocromo oxidasa subunidad I; Cox III, citocromo oxidasa subunidad III y Cyt b, citocromo b. CDS, secuencia codificante. (Gráfica tomada de PubMed en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>, números de acceso: NC_002375 y NC_002235).

polimorfismos de secuencias mitocondriales indican que *P. falciparum* ha emergido recientemente. Por otro lado, la distribución geográfica de los haplotipos mitocondriales muestra un patrón de colonización radial desde África hasta el sudeste-asiático y Suramérica (9,10).

La mitocondria de *Plasmodium*

La mitocondria en las diferentes especies de *Plasmodium* varía funcional y fisiológicamente. Las evidencias microscópicas indican que en las especies aviares ésta es crestada, mientras que en las especies de mamíferos puede ser tanto crestada como acrestada o, incluso, ausente (11,12). La forma intraeritrocítica de *P. falciparum* tiene una sola mitocondria, su morfología varía de acuerdo con la edad del trofozoito y se desarrolla desde una fina forma filamentosa hasta una más larga y lobular (11,13-19). Durante el ciclo de vida del parásito, los cambios funcionales de la mitocondria se han podido seguir mediante el método de fluorescencia con rodamina 123 y 3,3'-dihexiloxacarbocianida [DIOC₆(3)]. Tales métodos han permitido estudiar las diferencias en el

Cuadro 1. Algunas enzimas de las rutas metabólicas mitocondriales especificadas por estadio.

Locus	Estadio				Enzima	Número EC†	Reacción catalizada
	Spz*	Mrz*	Tpz*	Gmt*			
Fin de la glicólisis							
PF10_0363	1,2	–	2,4	–	Piruvato cinasa	2.7.1.40	P-enolpiruvato a piruvato
MAL6P1.160	8,6	66,9	18,8	14,7	Piruvato cinasa		
PF13_0141	46,2	83,9	70,9	78,8	L-lactato deshidrogenasa	1.1.1.27	Piruvato a lactato
Ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa							
PF10_0218	12,3	–	–	–	Citrato sintasa	4.1.3.7	Acetil coA + oxaloacetato a citrato
PF13_0242	3,2	–	16,9	8,8	Isocitrato deshidrogenasa (NADP)	1.1.1.41	Isocitrato a 2-oxoglutarato + CO ₂
PF08_0045	2,9	–	2,2	23,1	2-oxoglutarato deshidrogenasa	1.2.4.2	2-oxoglutarato + CO ₂ a 2-oxoglutarato a succinil CoA
PF10_0334	–	–	3,5	27,7	Subunidad flavoproteína de succinato	1.3.5.1	componente e1 Succinato a fumarato deshidrogenasa
PFL0630w	3.7	–	–	12,1	Subunidad hierro-sulfuro de succinato deshidrogenasa		
PF14_0373	–	–	–	12,7	Ubiquinol citocromo oxidoreductasa	1.10.2.2	Ubiquinol a citocromo c reductasa en transporte de electrones
PFB0795w	–	–	–	14,2	ATP sintasa F1, α -subunidad		
PFI1365w	–	–	–	8,8	Citocromo c-oxidasa subunidad	1.9.3.1	(vacío)
PFI1340w	–	–	–	8,8	Fumarato hidratasa	4.2.1.2	Fumarato a malato
MAL6P1.242	30.4	–	–	40,9	Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	Malato a oxaloacetato

Las rutas metabólicas de *Plasmodium* se encuentran en <http://www.sites.huji.ac.il/malaria/>. Spz, esporozoíto; mrz, merozoíto; tpz, trofozoíto; gmt, gametocito. *Se informa la representación de secuencia, es decir, el porcentaje de la secuencia proteica representada por los péptidos identificados, medida en cada estadio. † Los números de la Comisión de Enzimas (EC) se informan para cada proteína. Reproducida con permiso de *Nature Publishing Group* y tomada de Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, *et al.* A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419:520-6.

potencial de membrana mitocondrial y la sensibilidad a los inhibidores mitocondriales (18,20). Estos métodos se han aplicado exitosamente en el estudio de la mitocondria de *Toxoplasma gondii*, en la que se encontró que la forma infecciosa, el taquizoíto, pero no la forma intravacuolar, tiene una mitocondria activa (21). Estas observaciones indican que los cambios en la morfología y función mitocondrial en los parásitos son comunes y reflejan los cambios en la actividad metabólica del parásito.

Durante el tercer estadio morfológico de la gametocitogénesis de *P. falciparum*, los macrogametocitos muestran un incremento acentuado en el número de crestas mitocondriales. En este mismo estadio, la sensibilidad a drogas cambia drásticamente (22). En general, los estadios

tardíos de gametocitos (IV-V) son menos sensibles a las drogas antimaláricas y a los inhibidores metabólicos que los otros estadios. Una droga a la cual los gametocitos tardíos son más sensibles que los estadios asexuales es la primaquina, la cual se acumula selectivamente en la mitocondria del parásito y produce el engrosamiento de su matriz. Por otro lado, el "engrosamiento" mitocondrial ocasionado por factores o sustancias que permean selectivamente la membrana externa han sido asociados con procesos necróticos y apoptóticos, los cuales se relacionan de alguna manera con la interferencia en los procesos energéticos mitocondriales (23). La acumulación de la primaquina en la mitocondria sugiere que su efecto puede explicarse por acción directa sobre el organelo. El mecanismo de acción de la

primaquina no es claro, aunque podría interferir el metabolismo energético mitocondrial; las formas sexuadas de *Plasmodium*, tanto aviares (24) como de mamíferos (25), son sensibles a esta droga.

Un logro significativo que ha permitido el estudio de la mitocondria fue su aislamiento a partir de homogenizados de parásitos provenientes de cultivos *in vitro* (12). Es bien conocido que la principal fuente de ATP de los plasmodios es la fosforilación del sustrato; por otro lado, se ha propuesto que el ciclo del ácido tricarbóxico se ramifica a nivel del oxaloacetato (18), lo que sugiere que el ciclo de Krebs en el parásito es abierto e indica la generación de un potencial de membrana reducido. Se ha sugerido que este potencial en la membrana interna de la mitocondria podría ser funcional en el transporte de proteínas desde el citoplasma hacia la matriz mitocondrial (18,26). Las evidencias que indiquen que la cadena transportadora de electrones está acoplada a la síntesis de ATP vía ATPasa mitocondrial aún no han sido informadas en las formas eritrocíticas de *Plasmodium* (27). En contraste, hay evidencias que indican que los gametocitos mantienen una mitocondria funcional, con un potencial de membrana mitocondrial negativo insensible a glucosa (28), lo que sugiere una mitocondria funcional.

El efecto antiplasmódico de algunos antibióticos y antimaláricos sobre la respiración y el transporte de electrones indica que la mitocondria de *Plasmodium* puede ser un blanco terapéutico (29). Mediante métodos espectrofotométricos se ha demostrado que las drogas quinacrina, quinina y primaquina pueden reducir la desoxigenación de la hemoglobina en eritrocitos parasitados con *Plasmodium berghei* (15). En observaciones similares, Divo *et al.* (30) mostraron que los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas de la subunidad 70S tienen efecto antimalárico contra *P. falciparum* en cultivo porque actúan en la mitocondria y su efecto está influenciado por la tensión de oxígeno del medio y el tiempo de exposición.

Metabolismo mitocondrial en *Plasmodium*

La mitocondria del parásito aviar *Plasmodium lophurae* es crestada a través del ciclo

intraeritrocítico (27), mientras que la de roedores y otros mamíferos es preferencialmente acrestada (31). Tales observaciones indican que en los estadios eritrocíticos, los parásitos aviares usan un metabolismo respiratorio, en contraste con el metabolismo fermentativo de los parásitos de mamíferos. Así, el desarrollo de crestas mitocondriales se asocia con la presencia de un ciclo de Krebs activo y con la respiración (32). A pesar de la aparente inactividad del ciclo de Krebs en los estadios intraeritrocíticos de *P. falciparum*, hay evidencias que indican que la cadena transportadora de electrones es funcional, lo que significa que procesos como la síntesis *de novo* de pirimidinas pueden mantener la cadena durante todo el ciclo del parásito (33). Por otro lado, en *P. falciparum* las enzimas malato deshidrogenasa (34,35) e isocitrato deshidrogenasa (36) parecen tener localización citoplasmática, lo que sugiere su participación en otras rutas metabólicas (37), mientras la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa aún no ha sido detectada (38). La contribución energética del ciclo de Krebs en los estadios eritrocíticos del parásito es muy limitada (39). Adicionalmente, la mayor fuente de glucosa proviene del hospedero; se ha observado que su consumo es 100 veces mayor en eritrocitos infectados que en los no infectados (38). Esta observación sugiere que el transporte de glucosa hacia el parásito es un potencial blanco terapéutico antiparasitario.

Además del metabolismo energético, también se ha observado que la interrupción de otras rutas metabólicas mitocondriales puede interferir con la supervivencia de *Plasmodium*. Recientemente, en su mitocondria se evidenció la actividad de la δ -aminolaevulinato sintasa (PfALAS), la enzima clave en la síntesis del grupo hemo, durante todo el ciclo intraeritrocítico (40). La inhibición de esta ruta metabólica por el inhibidor etanolamina puede también afectar el crecimiento del parásito, lo que indica que el gen PfALAS es funcional y vital para la síntesis de hemo y la supervivencia del parásito (41).

Actividad respiratoria de la mitocondria

La actividad respiratoria de la mitocondria de *P. falciparum* y *Plasmodium yoelii* se ha determinado espectrofotométricamente en presencia de

sustratos como NADH, α -glicerofosfato y succinato (cuadro 2). Las tasas más bajas de respiración se observan con prolina, dihidroorotato y glutamato. Dado que en el estadio eritrocítico del parásito, el ciclo de Krebs es incompleto, la oxidación de NADH puede ser mediada por una ruta transportadora de electrones diferente a la empleada para el α -glicerofosfato y succinato o por una deshidrogenasa insensible a inhibidores

de la NADH-deshidrogenasa (complejo I). Mediante la técnica polarigráfica se detectó que la adición de superóxido dismutasa y catalasa influye en el consumo de oxígeno, observación que se asoció con la producción de radicales libre provenientes del parásito (42). Por otro lado, en la mitocondria de *P. berghei* permeada con digitonina se observó el control respiratorio después de la adición de adenosina difosfato (ADP), lo que

Cuadro 2. Características bioquímicas de la mitocondria de *Plasmodium*. Inhibidores: antimicina A, inhibidor del complejo III; mixotiazol, inhibidor del complejo III; UHDBT, 5-n-undecil-6-hidroxi-4-7-dioxobenzotiazol, inhibidor del complejo III; HQNO 2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-óxido, inhibidor de la menaquinol fumarato reductasa; funiculosina, inhibidor del complejo III; malonato, inhibidor del complejo II; SHAM, ácido salicilhidroxiámico, inhibidor de la oxidasa alternativa; rotenona, inhibidor del complejo I; piercidina, inhibidor del complejo I; ácido agárico, inhibidor del translocador de nucleótidos de adenina en la mitocondria; indometacina, inhibidor de la α -glicerofosfato citocromo c reductasa; (SOD), superóxido dismutasa (CAT) catalasa; TTFA, tenoiltrifluoroacetona, inhibidor del complejo II; mersalil, inhibidor de NADH-citocromo c reductasa de la membrana externa; flavona, inhibidor de la NADH deshidrogenasa mitocondrial vegetal; dicumarol, inhibidor del complejo III; funiculosina, inhibidor del complejo III por unión al citocromo b. Reproducido con permiso de *Cambridge University Press*: Fry M, Besley JE. Mitochondria of mammalian *Plasmodium* spp., *Parasitology* 1991;102:17-26.

Sustrato respiratorio	Inhibidor	Inhibición	Actividad específica (nmoles de sustrato oxidado/min/mg proteína) <i>P. falciparum</i>	
α -Glicerofosfato (5 mM)	Ninguno	Ninguna	176±24	
	Antimicina A	Complejo III	92±8	
	Mixotiazol	Complejo III	94±7	
	UHDBT	Complejo III	89±6	
	HQNO	Menaquinol fumarato reductasa	85±6	
	Funiculosina	Inhibidor del complejo III	92±8	
	SHAM	Oxidasa alternativa	81±10	
	Rotenona	Complejo I	124±18	
	Acido agárico	Translocador de nucleótidos de adenina	98±13	
	Indometacina	α -glicerofosfato citocromo c reductasa	88±9	
	SOD-CAT		169±21	
	Succinato (5 mM)	Ninguno	Ninguna	112±13
		Antimicina A	Complejo III	66±5
TTFA		Complejo II	68±9	
Malonato		Complejo II	77±10	
Rotenona		Complejo I	78±8	
SOD-CAT			103±9	
NADH (0,3 mM)		Ninguno	Ninguna	385±37
	Antimicina A	Complejo III	389±35	
	Rotenona	Complejo I	368±27	
	Piercidina	Complejo I	365±24	
	Dicumarol	Complejo III	361±25	
	Flavona	NADH deshidrogenasa vegetal	204±12	
	Mersalil	NADH-citocromo c reductasa	188±10	
	SOD-CAT		302±18	

indica que después de su aislamiento ésta es funcional (control respiratorio = O_2 consumido en presencia de ADP/ O_2 consumido en ausencia), aunque con una baja eficiencia energética (33). Se ha observado que la sensibilidad a inhibidores de la respiración, el potencial de la membrana interna mitocondrial y la producción de ATP a partir de ADP exógeno conforman una maquinaria oxidativa similar a la observada en vertebrados. Uyemura *et al.* demuestran la sensibilidad del potencial de membrana a inhibidores mitocondriales e ionóforos, como el carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) y la valinomicina, lo que apoya la sugerencia de la generación y utilización de un gradiente protónico (33).

Las evidencias bioquímicas y biofísicas indican la presencia de los cuatro complejos en la mitocondria de *Plasmodium* (12,19,29,33); sin embargo, su regulación en los diferentes estadios del desarrollo está por determinarse y es objeto de intensa investigación. Los cuatro complejos mitocondriales de *Plasmodium* que participan en la cadena transportadora de electrones y algunas de sus características únicas son: la NADH deshidrogenasa (complejo I), la succinato deshidrogenasa (complejo II), la ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa (complejo III), y la citocromo c oxidasa (complejo IV) (figura 2) (2).

Complejo I

El complejo I, denominado también como NADH deshidrogenasa, ha sido aislado a partir de las mitocondrias de *P. falciparum* y *P. berghei* (43). El complejo I se evidenció en el parásito por la inhibición del consumo de oxígeno sensible a rotenona. Esta inhibición es dependiente del sustrato, así, en presencia de NADH el complejo es insensible, mientras que en presencia de succinato y α -glicerofosfato (cuadro 2) es sensible (12). La actividad específica es aproximadamente 15% para succinato, 33% para α -glicerofosfato y 45% para NADH de la correspondiente a las obtenidas en la mitocondria de hígado de rata (cuadro 2) (42). Tales diferencias en la actividad de los diferentes estadios pueden reflejar diferencias en las técnicas empleadas en su aislamiento. El complejo I tiene una estructura

oligomérica, con un peso molecular relativo mínimo de 670 kDa y una baja eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m , constante catalítica/constante de Michaelis-Menten) de $5,9 \times 10^{-5} M^{-1} \times min^{-1}$ (33), presenta similitud con su contraparte en el hígado de mamíferos; sin embargo, los datos del genoma del parásito indican la ausencia de subunidades importantes en bombeo de protones y se sugirió que este complejo no constituye un paso electrogénico (7). Las diferencias en actividad del complejo con su contraparte mamífera sugiere características únicas (33) y los mecanismos responsables de las diferencias en actividad del complejo están aún por determinarse.

Diferentes sustratos tales como citrato, glutamato, α -cetoglutarato, malato y α -glicerofosfato pueden estimular la fosforilación en la mitocondria del trofozoito de *Plasmodium berghei* mientras otros sustratos como piruvato y NADH no. Así mismo, la fosforilación en la mitocondria de *Plasmodium* es estimulada en presencia de dihidroorotato (12,33); esto indica que la síntesis de pirimidinas pasa por la cadena respiratoria en la cual la dihidroorotato deshidrogenasa transfiere electrones a la cadena transportadora de electrones a través de la ubiquinina, citocromo c y O_2 (60). Todas estas observaciones muestran características únicas del complejo I mitocondrial del trofozoito de *Plasmodium*. Por otro lado, un inhibidor como la piercidina, aunque efectivo contra el complejo I humano no inhibe ni la enzima parasitaria, ni muestra actividad antiplasmódica (42). Estas observaciones indican diferencias en la susceptibilidad del complejo I a los inhibidores.

Complejo II

El complejo II o succinato deshidrogenasa (SDH) en *P. falciparum* se compone de dos subunidades: una flavoproteína y una proteína hierro-sulfuro con masas moleculares de 55 ± 6 y 35 ± 4 kDa, respectivamente (44,45). La reacción enzimática que cataliza el complejo requiere de succinato y coenzima Q (CoQ) para su máxima catálisis, mientras que la eficiencia catalítica del complejo para los sustratos succinato y ubiquinona se encontró relativamente baja. Los compuestos fumarato, malonato y oxaloacetato pueden inhibir la enzima con un valor K_i de 81, 13 y 12 mM,

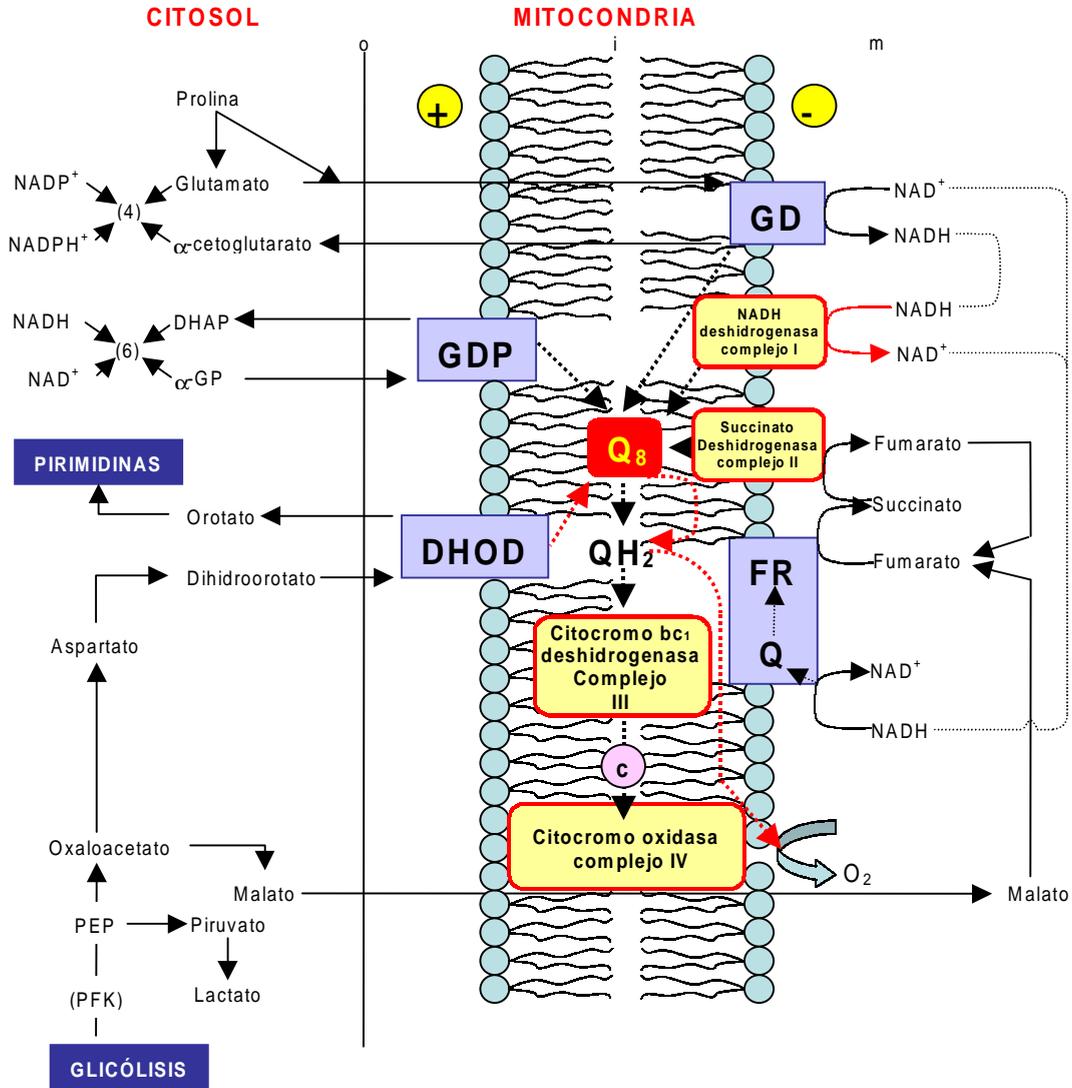


Figura 2. Esquema general propuesto de la mitocondria de *Plasmodium*. Obsérvese la conexión entre la síntesis de pirimidinas y el transporte de electrones como lo propuso Kita y col. (19). Las líneas sólidas representan el camino de los electrones en la cadena transportadora de electrones; las líneas punteadas representan posibles rutas, aunque no validadas para la mitocondria de *Plasmodium*. El signo interrogación indica que la actividad de este complejo no ha sido validada. En el complejo II se representan dos actividades: quinol fumarato reductasa y succinato ubiquinol reductasa, siendo funcional la primera. o, membrana externa mitocondrial; i, membrana interna mitocondrial; m, matriz mitocondrial; GDP, α -glicerofosfato deshidrogenasa; GDPC, α -glicerofosfato deshidrogenasa citosólica; DHOD, dihidroorotato deshidrogenasa; GD, glutamato deshidrogenasa; GDC, glutamato deshidrogenasa citosólica; FR, fumarato reductasa; PFK, fosfo-fructocinasa; PEP, fosfo-enol-piruvato. Figura modificada de Fry M (42) y reproducida con permiso del autor.

respectivamente. Otro inhibidor como el tenoiltrifluoroacetona (TTFA) (cuadro 2) inhibe la actividad respiratoria de la mitocondria en presencia de succinato (13). La actividad de la enzima es también inhibida por un sustrato análogo de la CoQ, 5-hidroxi-2-metil-1,4-

naftoquinona (plumbagin) a una concentración inhibitoria (IC_{50}) de 5 mM, mientras que la quinona tuvo actividad antiplasmódica contra *P. falciparum* e inhibió el consumo de oxígeno del parásito a la concentración de 0,88 mM (12,44). Un conocido inhibidor del complejo en mamíferos, la 2-

tenoiltrifluoroacetona, no tiene efecto en *Plasmodium* y sugiere diferencias del complejo con su contraparte en mamíferos. El complejo II puede actuar como una fumarato o succinato reductasa dependiendo de la disponibilidad de oxígeno del ambiente (19). Dado su papel dual en el ciclo de Krebs y en el transporte de electrones, el complejo II tiene un importante papel en el metabolismo anaerobio de *P. falciparum* (19). Usando un método de cavitación ha sido posible preparar mitocondrias activas de *P. falciparum* con alta actividad de succinato deshidrogenasa y respiración dependiente de dihidroorotato; igualmente, se informó que el fumarato puede inhibir la respiración dependiente de dihidroorotato, lo que sugiere que el complejo II en los estados eritrocíticos de *P. falciparum* funciona como una quinol-fumarato reductasa (FRD) (46). La actividad fumarato reductasa del complejo II es vital en parásitos anaerobios como *Ascaris suum*, en el cual el paso final de la ruta fosfoenol piruvato-succinato es catalizado por la NADH-FRD y, finalmente, el succinato es producido por la actividad FRD del complejo II. Este sistema puede sintetizar ATP con baja eficiencia, usando un sitio de acoplamiento en el complejo I en ausencia de oxígeno (19). Las evidencias bioquímicas (cuadro 2) indican que el complejo II podría suplir energía en forma de ATP al trofozoíto de *Plasmodium*, aunque la presencia de rodoquinona necesaria para la actividad fumarato reductasa del complejo II no se ha encontrado.

Complejo III

El complejo ubiquinona-citocromo-c oxido-reductasa, también conocido como complejo bc_1 o citocromo-c reductasa (1), ha sido evidenciado mediante el espectro de baja temperatura de la mitocondria de *P. falciparum* y *P. yoelii* (42). Los espectros diferenciales indican la presencia de los citocromos aa_3 , b , c y c_1 (12,42). Aunque el gen correspondiente al citocromo c , aún no ha sido validado para *Plasmodium*, un análisis de similitud y alineamiento de secuencias aminoacídicas (47,48) frente a secuencias del citocromo c de otras especies revela la existencia de tres posibles polipéptidos con 67% de homología con las proteínas predichas en el cromosoma 14. Recientemente, el análisis del proteoma de

Plasmodium (7) no indica su presencia, lo que sugiere que pueden existir otros niveles de regulación en la expresión de genes en *Plasmodium*, como ya ha sido sugerido (7), o rutas alternativas para la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial.

La actividad y el espectro del complejo III han sido estudiados en mitocondrias aisladas de *P. falciparum* (12). Las pruebas bioquímicas sugieren que la actividad respiratoria del complejo III en las formas eritrocíticas de *P. falciparum* es 10 a 100 veces menos susceptible a inhibidores del complejo III tales como antimicina A y mixotiazol (inhibidores del complejo III) (49). En contraste, el complejo III de *P. falciparum* es 1.000 veces más sensible a la inhibición por hidroxinafto-quinona o atovacuona (50). Las comparaciones de la actividad del complejo III entre formas asexuales y sexuales de *P. falciparum* se han basado en la medición del potencial de membrana de la mitocondria y en la determinación de la sensibilidad de los diferentes estadios del parásito a la atovacuona. Como se mencionó anteriormente, se ha informado que los estadios eritrocíticos y los gametocitos tardíos tienen un potencial de membrana interna mitocondrial relativamente bajo (51,52); en contraste, el potencial de membrana interna mitocondrial en los gametocitos tempranos es mayor, lo cual los hace más susceptibles a la atovacuona (53).

Complejo IV

La citocromo oxidasa o complejo IV cataliza la oxidación del citocromo c reducido y generalmente es sensible a cianuro y otros venenos. En *Plasmodium*, el complejo IV es insensible a cianuro, actividad que es similar en su contraparte en plantas y hongos, en la cual los electrones se transfieren directamente desde la ubiquinona al oxígeno, en un sistema conocido como oxidasa alternativa (54). La actividad del complejo IV sensible a cianuro se determinó indirectamente ensayando la sensibilidad del potencial de membrana mitocondrial a inhibidores específicos del complejo con el uso de sondas fluorescentes (18). Otra evidencia de la existencia en *Plasmodium* del complejo IV proviene de los estudios con inhibidores de la síntesis de la

subunidad 70S del ribosoma, los cuales tienen un efecto antimalárico contra *P. falciparum* y su actividad está influenciada por la tensión de oxígeno (18). A pesar de la sensibilidad de la citocromo oxidasa de *P. berghei* al cianuro (25 mM) (55), en los trofozoítos de *P. falciparum* se observó que la inhibición es sólo un cuarto de la informada para *P. berghei* a la concentración de 2 mM (56). Se conoce un sistema de oxidasa alternativo presente en la mitocondria del *Plasmodium* (33), el cual es insensible al cianuro pero susceptible al ácido salicilhidroxiamico (SHAM) y al propilgalato, dos inhibidores conocidos de la oxidasa alternativa de naturaleza vegetal (56). La importancia para el parásito de esta oxidasa alternativa quedó demostrada por el efecto de los inhibidores SHAM y el propilgalato sobre el crecimiento *in vitro* del parásito (56). Este efecto se expresa diferencialmente de acuerdo con el estadio de desarrollo de los gametocitos, así, los inhibidores de la enzima reducen en 70% a 75% el número de gametocitos tempranos mientras que sólo reducen en 25% los gametocitos tardíos (56,39). Sin embargo, el potencial de membrana mitocondrial en los gametocitos tardíos de *P. falciparum* es más sensible a SHAM o una combinación de SHAM con cianuro, que al cianuro solo (56). En contraste, en los estadios eritrocíticos asexuados de *P. falciparum*, el potencial de membrana mitocondrial acoplado a la oxidasa alternativa no se afecta por SHAM, lo cual indica que la actividad oxidasa alternativa del complejo IV solamente se ejerce en los gametocitos (56). Debido a que SHAM afecta las formas sexuales del parásito, pero no su supervivencia en el mosquito, esta ruta puede ser de interés para bloquear la formación de gametocitos (39).

Llama la atención que la mitocondria es la mayor productora de especies reactivas de oxígeno (ROS); tal producción se ha relacionado con la oxidación incompleta del oxígeno molecular (57). En la mitocondria se han descrito varios sitios donde se pueden generar las ROS: el complejo I, el sitio ubisemiquinona del complejo III y otras proteínas transportadoras de electrones (57). El papel de las ROS en la infección por *Plasmodium* es aún objeto de debate; sin embargo, la

generación y regulación de ROS por la mitocondria del parásito aún no ha sido investigada y puede ser tema de investigación futura.

Síntesis de pirimidinas y de folatos en *Plasmodium*

En mamíferos, la función de la cadena transportadora de electrones es la generación de un potencial de membrana para la síntesis de ATP; sin embargo, se ha informado que algunos desórdenes del metabolismo energético pueden ocasionar el bloqueo de la síntesis de pirimidinas (58) y en *Plasmodium* es bien conocido el papel de la cadena transportadora de electrones en la síntesis *de novo* de pirimidinas (59). La enzima que vincula el metabolismo energético con la síntesis de pirimidinas es la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). En *Plasmodium*, la DHODH es una proteína mitocondrial que se localiza en el espacio intermembranal sobre la cara externa de la membrana interna y lleva a cabo la síntesis *de novo* de pirimidinas (60); es una proteína monofuncional de 56±4 kDa, que dona electrones a la cadena transportadora de electrones y para su actividad óptima requiere la cadena larga de la coenzima Q (CoQ6-10), que es esencial para la transferencia de electrones (61,62). En el parásito, la enzima es sensible a varios inhibidores de la cadena transportadora de electrones como cianuro, monoctona (61) y atovacuona (63), los cuales afectan su crecimiento *in vitro*. La DHODH es también susceptible a la inhibición de la oxidasa alternativa, SHAM y atovacuona; estos dos compuestos son capaces de inhibir el crecimiento del parásito, lo que indica que la inhibición del transporte de electrones afecta el crecimiento del parásito por inhibición de la síntesis de pirimidinas (58).

La síntesis de pirimidinas puede ser también inhibida por la interrupción de la producción de tetrahidrofolato. La presencia de la ruta de síntesis de tetrahidrofolato en la mitocondria es una característica general de las plantas; por ejemplo, la mitocondria del tubérculo de la papa contiene alta concentración de folatos, además de tener toda la maquinaria necesaria para la síntesis de tetrahidrofolato poliglutamato (64). El tetrahidrofolato funciona en la transferencia de grupos metilo y es un cofactor esencial en la síntesis de

pirimidinas (58). Las sulfonamidas y sulfonas actúan como inhibidores competitivos del ácido para-aminobenzoico (PABA) por la unión a la dihidropterato sintetasa; por tanto, inhiben la formación del dihidropterato, el precursor del dihidrofolato. En el parásito, el dihidrofolato, ya sea sintetizado *de novo* o por salvamento, es el sustrato de la dihidrofolato reductasa, la enzima que convierte el dihidrofolato en tetrahidrofolato (65). Durante décadas, la interferencia de esta ruta metabólica ha sido utilizada como blanco terapéutico en el tratamiento de la malaria no complicada. La sulfadoxina es selectivamente tóxica para el parásito (66); sin embargo, la resistencia del parásito a esta droga ya está bien documentada en la literatura (67).

Perspectivas

El incremento de la resistencia del parásito a las drogas antimaláricas de primer orden, las fallas informadas por los programas de control de vectores, el cambio climático y las migraciones, entre otros factores, predicen un aumento en la incidencia de la malaria, no solamente en países en desarrollo sino también en los desarrollados, donde la malaria tradicionalmente se creía erradicada (68). Durante décadas, numerosos esfuerzos en la búsqueda de antimaláricos, ya fueran vacunas o drogas, han producido algunos resultados relativamente exitosos. Sin embargo, la malaria persiste como un problema de salud pública importante y la búsqueda de otras alternativas terapéuticas es prioritaria. La base de datos que contiene la secuencia completa del genoma de *Plasmodium* (69), junto con los métodos que permiten su análisis, es una herramienta que tendrá un enorme impacto tanto en el desarrollo de vacunas como en la identificación de drogas nuevas y blancos terapéuticos. Con esta herramienta se anticipa un incremento en el volumen de información relacionada con la expresión de genes y de secuencias proteicas en *Plasmodium*, así como la descripción en detalle de las rutas metabólicas del parásito. De especial interés en la comprensión del metabolismo parasitario será el análisis de las rutas metabólicas o metaboloma en los parásitos (70) y, en particular, el estudio de la interconexión metabólica entre el apicoplasto y la mitocondria,

cuya caracterización está aún por determinarse, podrá permitir el desarrollo racional e integral de métodos de diagnóstico y terapéuticos contra el parásito (71). La información disponible sobre la bioquímica y la biofísica de la mitocondria (59) contribuirá a la dilucidación de los mecanismos de acción de las drogas y de los antibióticos cuya actividad antimalárica se dé por efecto sobre la mitocondria, así como a la caracterización bioquímica de los complejos mitocondriales del parásito, la cual aumentará nuestra comprensión de la biología del parásito. Por otro lado, el conocimiento de la función mitocondrial en células de mamíferos ha puesto de manifiesto el papel central de la mitocondria en la apoptosis y, por consiguiente, su participación en la regulación de la muerte celular. La búsqueda de sustancias que afecten la supervivencia del parásito por acción directa sobre la mitocondria podría representar un nuevo blanco en la búsqueda de drogas antimaláricas. Datos recientes indican que la invasión del parásito podría inducir en el glóbulo rojo infectado, cambios relacionados con mecanismos de muerte celular, los cuales podrían estar determinados por el proceso invasor (72).

Los mecanismos de neutralización de los radicales libres de oxígeno, provenientes de la cadena respiratoria, podrían conducirnos a pistas que nos lleven a entender mejor los procesos antioxidantes mitocondriales del parásito (73). De especial interés es la regulación iónica del parásito, la cual podría jugar un papel clave en la viabilidad del parásito. Varios de los aspectos de la mitocondria mencionados aquí, tales como el potencial de membrana, el consumo de oxígeno, las características cinéticas e inhibitorias de los complejos mitocondriales, la generación de ROS en la cadena respiratoria, la regulación genética de la expresión de los diferentes complejos, los mecanismos de importación y exportación de proteínas a la mitocondria y el papel central de la mitocondria en la muerte celular se constituyen en nuevas alternativas terapéuticas contra la malaria.

Referencias

1. **Scheffler IE.** Mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation. En Scheffler IE, editor. *Mitochondria*. New York: Wiley J and Sons Inc; 1999. p.141-85.

2. **Nicholls DG, Ferguson SJ.** Respiratory chains. En: Harcourth B, editor. Bioenergetics 2. London: Academic Press Limited; 1992. p.107-56.
3. **Vaidya AB, Akella R, Suplick K.** Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 35:97-107.
4. **Sharma I, Rawat DS, Pasha ST, Biswas S, Sharma YD.** Complete nucleotide sequence of the 6 kb element and conserved cytochrome b gene sequences among Indian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 2001;31:1107-13.
5. **Feagin JE, Gardner MJ, Williamson DH, Wilson RJ.** The putative mitochondrial genome of *Plasmodium falciparum*. *J Protozool* 1991; 38:243-5.
6. **Feagin JE.** The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Mol Biochem Parasitol* 1993;52:145-8.
7. **Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Graingerk M, Haynes JD, et al.** A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 2002;419: 520-6.
8. **Rehkopf DH, Gillespie DE, Harrell MI, Feagin JE.** Transcriptional mapping and RNA processing of the *Plasmodium falciparum* mitochondrial mRNAs. *Mol Biochem Parasitol* 2000;105:91-103.
9. **Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, Al-Joubori BMA, Baloch AH, Somanta SD, et al.** Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111:163-71.
10. **Kurland CG, Anderson SGE.** Origin and evolution of the mitochondria proteome. *Microb Mol Biol Rev* 2000; 64:786-820.
11. **Slomianny C, Prensier G.** Application of the serial sectioning and tridimensional reconstruction techniques to the morphological study of the *Plasmodium falciparum* mitochondrion. *J Parasitol* 1986;72:595-8.
12. **Fry M, Beesley JE.** Mitochondria of mammalian *Plasmodium* spp. *Parasitology* 1991;102:17-26.
13. **Bowman IBR, Grant PT, Kermack WO, Ogston D.** The metabolism of *Plasmodium berghei*, the malaria parasite of rodents. *Biochem J* 1961;78:472-8.
14. **Homewood CA, Warhust DC, Baggaley CD, Atkinson EM.** Respiration in intra-erythrocytic *Plasmodium berghei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1971; 65:2-3.
15. **Deslauriers R, Moffatt DJ, Smith IC.** Oxygen consumption in *Plasmodium berghei*-infected murine red cells: a direct spectrophotometric assay in intact erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1986;886:319-26.
16. **Howells RE.** Mitochondrial changes during the life cycle of *Plasmodium berghei*. *Ann Trop Med Parasitol* 1970; 64:181-7.
17. **Sherman IW.** Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). *Microbiol Rev* 1979;43:453-96.
18. **Divo AA, Geary TG, Jensen JB.** Oxygen- and time-dependent effects of antibiotics and selected mitochondrial inhibitors on *Plasmodium falciparum* in culture. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:21-7.
19. **Kita K, Hirawake H, Miyadera H, Amino H, Takeo S.** Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta* 2002;1553:123-39.
20. **Srivastava P, Sharma SN, Shukla OP, Pandey VC.** Studies of the hepatic mitochondrial and microsomal mixed-function oxidase system during *Plasmodium yoelii* infection and inducer treatment in Swiss albino mice. *Trop Med Int Health* 1997;2:989-92.
21. **Melo EJ, Attias M, De Souza W.** The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol* 2000;130:27-33.
22. **Sinden RE.** Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: an electron microscopic study. *Parasitology* 1982;84:1-11.
23. **Kroemer G, Reed J.** Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* 2000;6:513-9.
24. **Beaudoin RL, Aikawa M.** Primaquine-induced changes in morphology of exoerythrocytic stages of malaria. *Science* 1968;160:1233-4.
25. **Lanners HN.** Effect of the 8-aminoquinoline primaquine on culture-derived gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 1991;77:478-81.
26. **Krishna S, Webb R, Woodrow C.** Transport proteins of *Plasmodium falciparum*: defining the limits of metabolism. *Int J Parasitol* 2001;31:1331-42.
27. **Aikawa M.** The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malaria parasites, *Plasmodium fallax*, *P. lophurae* and *P. cathemerium*. *Am J Trop Med Hyg* 1966; 15:449-71.
28. **Izumo A, Tanabe K, Kato M, Doi S, Maekawa K, Takada S.** Transport processes of 2-deoxy-D-glucose in erythrocytes infected with *Plasmodium yoelii*, a rodent malaria parasite. *Parasitology* 1989;98:371-9.
29. **Krungkrai J, Krungkrai SR, Suraveratum N, Prapunwattana P.** Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase: chemotherapeutic targets in malarial parasites. *Biochem Mol Biol Int* 1997;42:1007-14.
30. **Divo AA, Geary TG, Jensen JB, Ginsburg H.** The mitochondrion of *Plasmodium falciparum* visualized by rhodamine 123 fluorescence. *J Protozool* 1985; 32:442-6.
31. **Ladda RI.** New insights into the fine structure of rodent malaria parasite. *Mil Med* 1969;134:825-65.

32. **Langsley G, Hyde JE, Goman M, Scaife JG.** Cloning and characterization of the rRNA genes from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* 1983;11:8703-17.
33. **Uyemura SA, Luo S, Moreno SNJ, Docampo R.** Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. *J Biol Chem* 2000;275:9709-15.
34. **Lang-Unnasch N.** Purification and properties of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase. *Mol Biochem Parasitol* 1992;50:17-26.
35. **Lang-Unnasch N.** *Plasmodium falciparum*: antiserum to malate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 1995;80:357-9.
36. **Vanderjart DL, Hunsaker LA, Kibirige M, Campos NM.** NADPH production by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood* 1989;74:471-4.
37. **Howells RE, Maxwell L.** Further studies on the mitochondrial changes during the life cycle of *Plasmodium berghei*: electrophoretic studies on isocitrate dehydrogenases. *Ann Trop Med Parasitol* 1973;67:279-83.
38. **Sherman IW.** The biochemistry of malaria: an overview. En: Coombs G, North M, editors. *Biochemical protozoology*. London: Taylor and Francis Limited;1991. p. 6-34.
39. **Lang-Unnasch N, Murphy AD.** Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. *Annu Rev Microbiol* 1998;52:561-90.
40. **Padmanaban G, Rangarajan PN.** Heme metabolism of *Plasmodium* is a major antimalarial target. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:665-8.
41. **Varadharajan S, Dhanasekaran S, Bonday ZQ, Rangarajan PN, Padmanaban G.** Involvement of delta-aminolaevulinic synthase encoded by the parasite gene in *de novo* haem synthesis by *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 2002;367:321-7.
42. **Fry M.** Mitochondria of *Plasmodium*. En: Coombs G, North M, editors. *Biochemical protozoology*. London: Taylor & Francis Limited; 1991. p.154-67.
43. **Krungkrai J, Kanchanarithsak R, Krungkrai SR, Rochanakij S.** Mitochondrial NADH dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*. *Exp Parasitol* 2002;100:54-61.
44. **Suraveratum N, Krungkrai SR, Leangaramgul P, Prapunwattana P, Krungkrai J.** Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* succinate dehydrogenase. *Mol Biochem Parasitol* 2000;105:215-22.
45. **Takeo S, Kokaze A, Ng CS, Mizuchi D, Watanabe JI, Tanabe K, et al.** Succinate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum* mitochondria: molecular characterization of the SDHA and SDHB genes for the catalytic subunits, the flavoprotein (Fp) and iron-sulfur (Ip) subunits. *Mol Biochem Parasitol* 2000;107:191-205.
46. **Takashima E, Takamiya S, Takeo S, Mi-Chi F, Amino H, Kita K.** Isolation of mitochondria from *Plasmodium falciparum* showing dihydroorotate dependent respiration. *Parasitol Inter* 2001;50:273-8.
47. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-402.
48. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W.** Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 1994;22:4673-80.
49. **Thierbach G, Reichenbach H.** Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome *b-c1* segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1981;638: 282-9.
50. **Fry M, Pudney M.** Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4(4'-chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinine (566C80). *Biochem Pharmacol* 1992;43:1545-53.
51. **Divo AA, Patton CL, Sartorelli AC.** Evaluation of rhodamine 123 as probe for monitoring mitochondrial membrane potential in *Trypanosoma brucei* spp. *J Eukaryotic Microbiol* 1993;40:329-35.
52. **Kato M, Tanabe K, Miki A, Ichimori K, Waki S.** Membrane potential of *Plasmodium falciparum* gametocytes monitored with rhodamine 123. *FEMS Microbiol Lett* 1990;57:283-8.
53. **Fleck S, Pudney M, Sinden RE.** The effect of atovaquone (566C80) on the maturation and viability of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:309-12.
54. **McIntosh L.** Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol* 1994;105:781-6.
55. **Krungkrai J, Krungkrai SR, Bhumiratana A.** *Plasmodium berghei*: partial purification and characterization of the mitochondrial cytochrome c oxidase. *Exp Parasitol* 1993;77:136-46.
56. **Murphy AD, Doeller JE, Hearn B, Lang-Unnasch N.** *Plasmodium falciparum*: cyanide-resistant oxygen consumption. *Exp Parasitol* 1997;87:112-20.
57. **Chandel NS, Schumacker PT.** Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* 2000;88:1880-9.
58. **Loffler M, Jockel J, Schuster G, Becker C.** Dihydroorotate-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem* 1997;174:125-9.
59. **Scheibel LW, Sherman IW.** *Plasmodium* metabolism and related organellar function during various stages

- of the life-cycle: proteins, lipids, nucleic acids and vitamins. En: Wernsdorfer WH, McGregor SI, editors. *Malaria: principles and practice of malariology*. New York: Churchill Livingstone Medical Division of Longman Group UK Limited; 1988. p.219-52.
60. **Rawls J, Knecht W, Diekert K, Lill R, Loffler M.** Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 2000;267:2079-87.
 61. **Gutteridge WE, Dave D, Richards WH.** Conversion of dihydroorotate to orotate in parasitic protozoa. *Biochim Biophys Acta* 1979;582:390-401.
 62. **Krungkrai J.** Purification, characterization and localization of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum*, human malaria parasite. *Biochim Biophys Acta* 1995;1243:351-60.
 63. **Ittarat I, Asawamahasakda W, Meshnick SR.** The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 1994;79: 50-6.
 64. **Neuburger M, Rebeille F, Jourdain A, Nakamura S, Douce R.** Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *J Biol Chem* 1996;271: 9466-72.
 65. **Wernsdorfer WH, Trigg PI.** Recent progress of malaria research: chemotherapy. En: Wernsdorfer WH, McGregor SI, editors. *Malaria: principles and practice of malariology*. New York: Churchill Livingstone Medical Division of Longman Group UK Limited; 1988. p.1569-74.
 66. **Casteel DA.** Antimalarial agents. En: Wolff ME, editor. *Burger's medical chemistry and drug discovery*. 5th edition. New York: Wiley-Interscience publication; 1997. p.4-91.
 67. **Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, et al.** Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol* 2001;17:582-8.
 68. **Organización Mundial de la Salud.** Hacer retroceder el paludismo. ¿Hechos o retórica? *Bull World Health Org* 2001;4:143-9.
 69. **Bahl A, Brunk B, Coppel RL, Crabtree J, Diskin SJ, Fraunholz MJ, Grant GR, et al.** PlasmoDB: the *Plasmodium* genome resource. An integrated database providing tools for accessing, analyzing and mapping expression and sequence data (both finished and unfinished). *Nucleic Acids Res* 2002;30:87-90.
 70. **Fairlamb AH.** Metabolic pathways analysis in trypanosomes and malaria parasites. *Phil Trans R Soc Lond B* 2002;357:101-7.
 71. **McFadden GI, Ross DS.** Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends Microbiol* 1999;7:328-33.
 72. **Shigetoshi E, Sherman IW.** Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:373-84.
 73. **Marchetti P, Mortier L, Beauvillain V, Formstecher P.** Are mitochondria targets of anticancer drugs responsible for apoptosis? *Ann Biol Clin* 2002;60:391-403.