

ANHIDRASA CARBÓNICA DE *Plasmodium falciparum*: UN BLANCO ÚTIL PARA EL DISEÑO DE MEDICAMENTOS ANTIMALÁRICOS Y COMPUESTOS BLOQUEADORES DE LA TRANSMISIÓN DE MALARIA

CARBONIC ANHYDRASE IN *Plasmodium falciparum*: A USEFUL TARGET
FOR ANTIMALARIAL DRUG DESIGNING AND MALARIA BLOCKING
TRANSMISSION COMPOUNDS

Carlos D. AGUDELO R.¹, María CORENA-McLeod², Sara M. ROBLEDO R.^{1*}

Recibido: 6 de mayo de 2009 Aceptado: 9 de noviembre de 2009

RESUMEN

La anhidrasa carbónica es una metaloenzima que cataliza la conversión reversible del CO₂ a bicarbonato, un componente metabólico indispensable para la síntesis de pirimidinas *de novo* por *Plasmodium* spp y los procesos de exflagelación llevados a cabo por el parásito al interior del mosquito vector. La enzima participa además en el transporte del bicarbonato dentro y fuera de las células para evitar un desequilibrio en el sistema CO₂/HCO₃⁻ y la alteración del pH al interior de las células y en el espacio intercelular. Por lo tanto, al inhibir la enzima, ya sea en el parásito o en el insecto vector, se podría conducir a una disminución de la replicación y al detrimento y/o muerte del parásito. De esta forma, los inhibidores de anhidrasa carbónica constituyen una alternativa, tanto terapéutica como de bloqueo de la transmisión, para el control de la malaria. La actividad anti-*Plasmodium in vitro* de algunos compuestos inhibidores de anhidrasa carbónica ya se ha determinado. Sin embargo, la eficacia *in vivo* y el mecanismo por el cual los inhibidores son capaces de afectar el desarrollo del parásito en los mosquitos vectores permanecen aún por evaluarse. En el marco del proyecto de investigación “Evaluación de inhibidores de anhidrasa carbónica como medidas terapéuticas y de bloqueo de la transmisión de malaria” este artículo presenta una revisión del estado del arte sobre el papel de la anhidrasa carbónica de *Plasmodium* spp y el uso de inhibidores específicos de esta enzima como una estrategia para el tratamiento de la malaria y el bloqueo de la transmisión de la enfermedad. Se incluyeron artículos publicados en los últimos 59 años, identificados a partir de las bases de datos bibliográficos PubMed y ScienceDirect, cruzando las palabras claves, al igual que artículos recopilados por los autores y se analizan e integran los resultados de investigaciones publicadas alrededor del tema.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, anhidrasa carbónica, bicarbonato, dióxido de carbono.

ABSTRACT

Carbonic anhydrase is a metalloenzyme that catalyzes the reversible conversion of CO₂ to bicarbonate, an essential metabolic component used by the malaria parasites for *de novo* synthesis of pyrimidines and the exflagellation of gametocytes inside the mosquito vector. Carbonic anhydrase is involved in the transport of bicarbonate. This enzyme participates in transport of bicarbonate inside and outside the cells to avoid an imbalance in the system CO₂/HCO₃⁻ and alteration of pH in the interior of the cell as well as in the intercellular space. Therefore, inhibition of this enzyme either in the parasite or the insect vector, could

1 Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET. Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín, Colombia.

2 World Solutions Against Infectious Diseases. Jacksonville, Florida, USA.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: srobledo@guajiros.udca.edu.co.

lead to a decrease in replication and to the detriment and/or death of the parasite. Given the importance of carbonic anhydrase in the metabolism, development and survival of *Plasmodium*, it could be postulated that carbonic anhydrase inhibitors are both a therapeutic and a blocking transmission alternative. Previous studies have demonstrated the *in vitro* anti-*Plasmodium* activity of some inhibitors. However, it is necessary to determine their effectiveness to confirm its usefulness in the treatment or blocking malaria transmission and the mechanism by which these inhibitors are able to affect the development of the parasite in the mosquito vector. In this paper we present a review about the role of carbonic anhydrase in *Plasmodium* spp and using some specific inhibitors as a strategy for malaria treatment and transmission blocking strategy. Articles published in the past 59 years identified from bibliographic database (PubMed and ScienceDirect) and papers collected by the authors were included.

Key words: *Plasmodium falciparum*, carbonic anhydrase, bicarbonate, carbon dioxide.

INTRODUCCIÓN

La malaria (o paludismo) es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida desde un humano infectado a otro sano a través de la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*. La enfermedad está ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales donde los factores climáticos como temperatura, humedad y lluvias favorecen la transmisión. Sin embargo, el calentamiento global y el transporte de mosquitos vectores y parásitos entre regiones por medio de los humanos favorecen la propagación de las infecciones a otras áreas geográficas, dando como resultado la aparición de casos de malaria en países donde previamente había sido erradicada. Este es el caso de la aparición de un brote de malaria en el condado de Palm Beach, Florida, USA, en 2003, donde la presencia de mosquitos vectores residentes, junto con la entrada de visitantes procedentes de países donde la malaria es endémica, ha hecho posible la transmisión local de la enfermedad (3).

Se estima en más de 3.000 millones el número de personas que viven en zonas de riesgo de transmisión de la enfermedad, que causa aproximadamente 250 millones de casos de malaria diagnosticados al año y cerca de un millón de muertes, la mayoría de ellas en niños menores de 5 años. Para el 2008 son 109 los países identificados como endémicos para la malaria, por lo cual ésta se considera como una de las enfermedades de mayor impacto a en el mundo (1,2). En Colombia, cerca de seis millones de personas están en riesgo de adquirir la infección y anualmente se diagnostican más de 100.000 casos, lo que corresponde al 20% de los casos registrados en América (2). La aparición de resistencia a las drogas antimaláricas en las especies de *Plasmodium* pone en evidencia la necesidad de desarrollar nuevos

medicamentos. Entre las moléculas blanco en el parásito que permitan el diseño de nuevos medicamentos, se encuentra la anhidrasa carbónica (AC), una enzima responsable de la conversión reversible del bicarbonato y, por lo tanto, muy importante en los procesos de desarrollo, multiplicación y supervivencia del parásito dentro del insecto vector y el hospedero mamífero. En este artículo presentamos una revisión sobre el papel de la AC de *Plasmodium* y el uso de inhibidores específicos de la enzima, como una estrategia para el tratamiento de la malaria y el bloqueo de la transmisión de la enfermedad. Se incluyeron artículos publicados en los últimos 59 años, identificados a partir de la bases de datos bibliográficos PubMed y ScienceDirect, cruzando las palabras claves, así como artículos recopilados por los autores.

Plasmodium spp y su ciclo de vida

Las especies del *Plasmodium* que infectan al humano son: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malarie*, y más recientemente *P. knowlesi*, una especie que infecta primates y que ha comenzado a producir infecciones naturales en humanos en Malasia, Singapur, Tailandia, y otros lugares del sureste de Asia (4). Todas las especies de *Plasmodium* tienen ciclos de vida similares y requieren de dos hospederos: el humano y el vector (dípteros hembras del género *Anopheles*). El humano es el hospedero intermedio en el que se desarrolla la esquizogonia o ciclo asexual. Por su parte, el vector es el hospedero definitivo en el que se desarrolla la esporogonia o ciclo sexual, que conduce a la formación de esporozoitos o formas del parásito infectantes para el humano (5).

El ciclo de transmisión indicado en la figura 1, comienza cuando mosquitos hembras del género *Anopheles*, infectados con esporozoitos de *Plasmodium* en sus glándulas salivales, pican a un

hospedero vertebrado e inoculan junto con la saliva los esporozoitos (5,6). Estas formas parasitarias entran al torrente sanguíneo e invaden los hepatocitos donde se diferencian a merozoitos y se multiplican por esquizogénesis (disgregación) formando el esquizonte hepático. Los esporozoitos de *P. vivax* y *P. ovale* en el hígado pueden desarrollar hipnozoitos, que son formas latentes que pueden permanecer inactivas durante meses o años, antes de diferenciarse en merozoitos (6). Los merozoitos, a su vez, pueden reinfectar hepatocitos o volver de nuevo al torrente sanguíneo, donde penetran en los eritrocitos a través del complejo apical (7). Los merozoitos intraeritrocitarios pasan rápidamente al estadio de anillos, luego a trofozoitos y de allí a esquizontes, que son formas multinucleadas que liberan de 6 a 8 nuevos merozoitos. Por la ruptura de los eritrocitos infectados se producen los síntomas clásicos de la enfermedad: fiebre, escalofríos y sudoración. Algunos merozoitos, al invadir los eritrocitos, se convierten en gametocitos (hembras o machos), los cuales son ingeridos por los mosquitos hembras durante su alimentación con sangre del humano (8). Al interior del mosquito comienza el ciclo esporogónico o sexuado. El cambio de temperatura y pH induce la división del gameto formando los cuerpos flagelados (microgametos). La fusión de los gametos macho y hembra forma el cigoto y posterior ooquineto, que invade células del intestino medio para formar los ooquistes, que contienen abundantes esporozoitos, los cuales salen del ooquiste y migran hacia las glándulas salivales del mosquito (6).

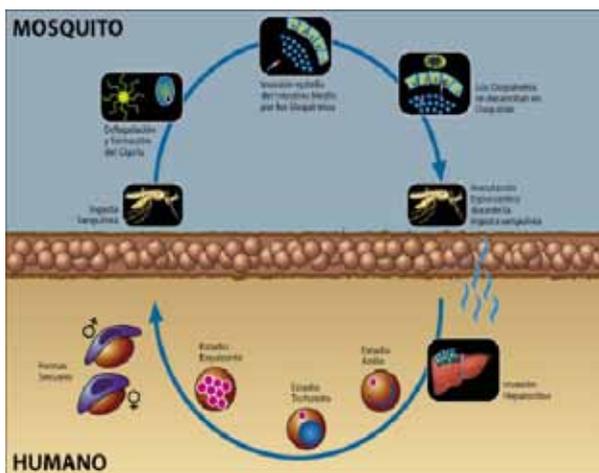


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Diseño original de C. Vélez y D. Agudelo.

Estrategias para el control de la malaria

Hasta la fecha, el control de la malaria se basa en la implementación del diagnóstico y el tratamiento oportuno de las personas enfermas. Otras medidas de control están orientadas a reducir la transmisión, sea evitando la picadura de los mosquitos con el uso de repelentes y toldillos tratados o no con insecticidas, sea con el rociamiento de viviendas con insecticidas de acción residual y la intervención de los criaderos de los mosquitos (2).

a) Tratamiento de la malaria

Las drogas antimaláricas disponibles tienen acciones selectivas para diferentes fases del ciclo de vida del parásito. Así por ejemplo, las drogas esquizontocidas tisulares atacan las formas pre-eritrocíticas presentes en el hígado; las drogas gemetocitocidas destruyen las formas sexuales del parásito; y las drogas esporontocidas inhiben el desarrollo de ooquistes en el vector. La eficacia del tratamiento depende de la sensibilidad del parásito a los medicamentos, entre otros factores. El tratamiento de la malaria recae de manera importante en un modesto número de medicamentos disponibles pertenecientes a cuatro clases de compuestos: a) *aminoquinolinas*: 4-aminoquinolinas {cloroquina (1), quinina (2), amodiaquina (3), mefloquina (4), y halofantrina (5)} y 8-aminoquinolinas {primaquina (6)}, b) *antifolatos*: pirimetamina (7), sulfadoxina (8), proguanil (9), cloroproguanil (10), dapsona (11), c) derivados de *Artemisia annua*: artemisinina (12), artemeter (13), artesunato (14), dihidroartemisinina (15), arteeter (16) y d) *hidroxinaftoquinona*: atovacuona (17) (9).

- **Cloroquina (CQ)** (*N'*-(7-cloroquinolina-4-il)-*N,N*-dietil-pentano-1,4-diamina): fue sintetizada en 1934 y continúa siendo efectiva para el tratamiento de la malaria en áreas donde no se ha informado de la resistencia a la CQ (10). Al parecer, la droga daña la hemopolimerasa del parásito interfiriendo con la degradación de la hemoglobina y la eliminación del hierro y el parásito muere intoxicado por el grupo Hemo (10).

- **Quinina**: es un alcaloide derivado de la corteza de *Cinchona*, que actúa principalmente sobre los trofozoitos maduros y gametocitos (11). La quinina forma complejos con la hematina (ferriprotoporfirina IX) evitando su polimerización, lo que impide la detoxificación de los radicales libres

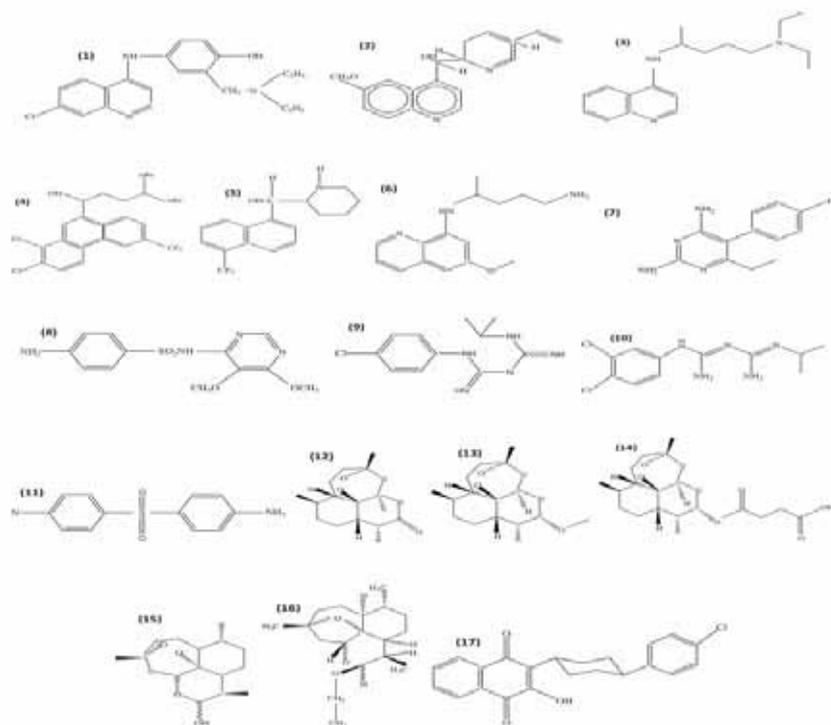


Figura 2. Estructuras de las drogas antimaláricas de uso actual.

producidos durante el metabolismo de la hemoglobina por el parásito (10).

- **Amodiaquina** (4-[(7-cloroquinolina-4-il) amino]-2-[(dietilamino)metil]fenol): es una 4-aminoquinolina que actúa en forma similar a la CQ y ha mostrado ser efectiva en el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* resistente a la CQ (12).

- **Primaquina** ((*RS*)-*N*-(6-metoxiquinolona-8-il) pentano-1,4-diamina): es una 8-aminoquinolina efectiva contra las formas intrahepáticas de *P. vivax* y *P. ovale*, esquizontes de todas las especies de *Plasmodium*, gametocitos de *P. falciparum* y estadios eritrocíticos de *P. vivax* (y algunos estadios asexuales de *P. falciparum*) (9). La primaquina parece inhibir la síntesis de poliaminas en el parásito (13).

- **Mefloquina** {(*R**,*S**)-2,8-bis(trifluorometil)quinolina-4-yl}-(2-piperidil)metanol}: es una 4-metanolquinolina relacionada con la quinina. Es efectiva contra todas las formas asexuales de las especies de *Plasmodium* que parasitan al humano. La resistencia clínica a la mefloquina se observa en Tailandia, Burma y Cambodia (14). Al igual que la quinina interactúa con la hematina evitando la detoxificación de los radicales libres (10).

- **Pirimetamina** (5-(4-clorofenil)-6-etil-2,4-pirimidinadiamina): es una diaminopirimidina

que se usa en combinación con la sulfadoxina. Actúa contra esquizontes y formas pre-eritrocíticas inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) que reduce el ácido fólico a tetrahidrofolato (15). También inhibe el desarrollo de esporozoitos en el vector (16). La sulfadoxina es efectiva contra *P. falciparum* pero relativamente ineficaz contra *P. vivax*. Se usa para el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* resistente a CQ (17).

- **Proguanil** (1-(4-clorofenil)-2-(*N*'-propan-2-ilcarbamimidoil)guanidina): es un compuesto que inhibe específicamente la DHFR del parásito, actuando sobre formas pre-eritrocíticas y esporozoitos (18).

- **Atovaquona** (*trans*-2-[4-(4-clorofenil) ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftalenodiona): es un hidroxinaftoquinona que inhibe la síntesis de ATP (19, 20) afectando la maduración de trofozoitos en el hígado y de ooquistes en el vector (21). Se usa en combinación con atovaquona en el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* multi-resistente a drogas (19).

- **Artemisinina** (*qinghaosu*) {(3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,12*S*,12*aR*)-octahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12*H*-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10(3*H*)-ona}: es una lactona sesquiterpeno extraída

de las hojas de *A. annua*. La artemisinina y sus derivados (artesunato, artemeter, arteeter y dihidroartemisinina) tienen actividad contra esquistosomas. La artemisinina se puede usar por vía parenteral para el tratamiento de malaria complicada por *P. falciparum* multi-resistente a drogas, y por vía oral para el tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum* multi-resistente (22). Tienen como ventaja que pueden reducir el número de gametocitos y por lo tanto disminuir la transmisión de la malaria (23).

- **Halofantrina** (3-dibutilamino-1-[1,3-dicloro-6-(trifluorometil)fenantren-9-il]-propan-1-ol): es un aril aminoalcohol con mecanismo de acción similar al de la quinina y mefloquina (24). Se usa en combinación con el artemeter y es muy activo contra *P. falciparum* multi-resistente a drogas (24).

- **Dapsona** (4,4'-diaminodifenil sulfona): se usa en combinación con el clorproguanil para el tratamiento de la malaria no complicada (25). Al parecer afecta la síntesis de folato al inhibir la dihidropteroato sintetasa (DHPS), una enzima que se une a dihidroxi-metil-dihidropterin pirofosfato (DHPPP) y al ácido paraaminobenzoico (PABA) para formar pterato, que es precursor del folato (25).

La resistencia a las drogas antimaláricas se ha documentado para *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*, siendo *P. falciparum* la especie que ha desarrollado resistencia a casi todos los antimaláricos de uso actual con excepción de artemisinina y sus derivados (26, 27). Por su parte, *P. vivax* ha desarrollado resistencia a pirimetamina-sulfadoxina en varias regiones y permanece sensible a CQ en el sur y este de Asia, la India subcontinental, la península de Corea, noreste de África y Centro y Sur América (28).

b) Otras estrategias de control

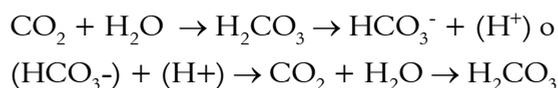
El rociamiento de las paredes de las viviendas con insecticidas de acción residual como el DDT (1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano), λ cialotrina y deltametrina, o el uso de toldillos impregnados con estos insecticidas han sido efectivos en programas de control de la transmisión de malaria en varios países (29). Sin embargo, el costo y los cambios ocurridos en los patrones de comportamiento de las poblaciones de mosquitos y la capacidad de los anofelinos de tolerar altas dosis de insecticidas de acción residual han disminuido la eficacia de dichas medidas de control (24).

Ante las dificultades para obtener una vacuna a corto plazo que prevenga la malaria, las posibilidades para el control de la enfermedad se concentran

actualmente en el desarrollo de medicamentos a partir de nuevos compuestos, o de medicamentos disponibles para el tratamiento de otras enfermedades (30). Así mismo, el control recae también en el diseño de alternativas diferentes, como por ejemplo, la interrupción del desarrollo del parásito en los mosquitos vectores (31), lo que implica impedir la exflagelación de gametocitos o bloquear procesos de replicación celular para evitar que lleguen a glándulas salivales y que el mosquito pueda transmitirlos a un humano. Diferentes compuestos poseen potencial como bloqueadores de la transmisión, siendo los más promisorios aquellos capaces de inhibir la producción de moléculas indispensables en el metabolismo y desarrollo de *Plasmodium*, tanto en el hospedero humano como en el hospedero vector.

Anhidrasa carbónica

La anhidrasa carbónica (AC) es una metaloenzima dependiente de zinc, ya que el ion metal zinc es esencial para la actividad catalítica de la enzima. La AC cataliza la reacción reversible del dióxido de carbono (CO_2) a ión bicarbonato (HCO_3^-) y viceversa:



La enzima se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza; está presente tanto en organismos procariotas como en eucariotas y es codificada por cuatro familias de genes que dan origen a los cinco tipos de ACs identificadas como α AC (en vertebrados, algas, bacterias y citoplasma de plantas verdes), las β AC (en bacterias, algas y plantas), las γ ACs (principalmente en arquea y bacterias), las δ ACs (en organismos marinos), y las ϵ ACs (en bacterias, cianobacterias y plantas). En mamíferos se han descrito al menos 16 isoformas de la enzima o proteínas relacionadas, con diferente localización subcelular y distribución en los tejidos (32-36). Las ACs presentes en la mayoría de los sistemas biológicos participan en diferentes procesos fisiológicos tales como respiración y metabolismo ácido-base, entre otros (37). En los mamíferos, además de participar en el balance del pH, las ACs también participan en la biosíntesis de glucosa, urea y lípidos, y en la resorción ósea, calcificación, formación de tumores entre otros (38). La AC cataliza, además, las reacciones de hidratación de grupos cianatos y aldehídos, al igual que la hidrólisis de grupos carboxilos o sulfonilos (39).

Anhidrasa carbónica de *P. falciparum*

Gracias al conocimiento actual del genoma de *P. falciparum* (40) se han identificado al menos tres isoenzimas con actividad AC en *P. falciparum*, la mayoría de ellas de la clase α AC (41), y secuencias putativas de α AC en *P. chabaudi*, *P. yoelii* y *P. berghei* (42). Adicionalmente, se ha aislado y purificado una AC de *P. falciparum* denominada PfAC (41). La PfAC posee una identidad de entre 40 y 47% con las ACs de *Plasmodium* de roedores, en donde las secuencias de aminoácidos del sitio activo, responsables de la unión del sustrato y los procesos catalíticos de la enzima, son altamente conservados (43). Hasta el momento sólo la PfAC de la clase alfa se ha clonado y expresado funcionalmente en *E. coli* usando el vector pET-15b, mostrando una homología del 70% con la PfAC aislada de cultivos *in vitro* de *P. falciparum* y valores K_m , K_{cat} , y K_i similares (41). Por otro lado, los eritrocitos infectados con *P. falciparum* contienen dos veces más actividad de AC que eritrocitos no parasitados (43); dicha actividad se ve incrementada con el desarrollo intraeritrocitario de cada uno de los estadios de *P. falciparum*. Adicionalmente, se ha demostrado que cultivos de *P. falciparum* tratados con inhibidores de AC (IAC) disminuyen notablemente el crecimiento del parásito al interior de los eritrocitos (42).

El papel de las AC en la transmisión de la malaria no se ha demostrado; sin embargo, es claro que el bicarbonato producido por la acción catalítica de la AC a partir del CO_2 metabólico es uno de los requerimientos esenciales para el crecimiento y desarrollo del parásito tanto en el intestino del mosquito como en el interior del eritrocito (44), ya que la conversión del CO_2 a bicarbonato es necesaria para la síntesis de pirimidinas (45) y el transporte de CO_2 a través de la membrana del eritrocito (43). Los parásitos de la malaria requieren purinas y pirimidinas durante su crecimiento intraeritrocitario para la síntesis de ADN/ARN y otros metabolitos durante su crecimiento y replicación. *Plasmodium* recicla purinas preformadas a partir de bases y nucleótidos como la hipoxantina o la adenosina del hospedero mamífero; sin embargo, las pirimidinas deben ser sintetizadas *de novo* a partir del bicarbonato, ATP, glutamina, aspartato y 5-fosforribosilpirofosfato (46). Por otro lado, el bicarbonato se debe transportar dentro y fuera de la célula para que no se acumule. La AC, junto con la hemoglobina, regula la homeostasis intraeritrocitaria de tal forma que cualquier desequilibrio en la actividad de la AC puede generar un

desequilibrio en el sistema tampón CO_2/HCO_3^- , que puede afectar el pH intracelular, disminuir el transporte de iones y ocasionar cambios en la permeabilidad de la membrana. La disminución del HCO_3^- a su vez, puede alterar la síntesis de pirimidinas en el parásito (47, 48).

Puesto que el bicarbonato no se difunde libremente, su transporte debe ser mediado por proteínas de membrana. Estos transportadores se clasifican en una gran familia de compuestos que comprenden los cotransportadores de sodio-bicarbonato, los intercambiadores de cloro-bicarbonato conocidos como intercambiadores aniónicos (IA), los cotransportadores de potasio-bicarbonato y los intercambiadores de cloro-bicarbonato dirigidos por sodio (49). Con excepción de las células parietales gástricas, los eritrocitos humanos poseen el contenido más alto de AC (50) y expresan el polipéptido de membrana Banda 3 o Intercambiador aniónico 1 que media el intercambio Cl^-/HCO_3^- , y aumenta la capacidad de la sangre para transportar CO_2 y para la homeostasis ácido-base (51). Como *Plasmodium* también necesitan bicarbonato para su desarrollo en el intestino del mosquito vector (52), es lógico considerar que la AC y los IA tienen un papel fundamental en el desarrollo del parásito dentro del vector. Al parecer, el papel de los IA se asocia con la regulación del ión en el estado larval y en la digestión, manteniendo el pH en un rango de 10-11 (53). Sin embargo, aún no se han caracterizado los IA y AC en el intestino del vector y no se conoce muy bien su papel en el desarrollo de *Plasmodium*. Tampoco se conoce muy bien el mecanismo de transporte del bicarbonato en el intestino del mosquito y el papel que los IA juegan en el mecanismo de infección por *Plasmodium*.

El bicarbonato también es necesario para la maduración de gametocitos y exflagelación de *P. falciparum* en el vector. Los gametocitos ingeridos durante la picadura del mosquito llegan al intestino y en el lumen se estimula la maduración de gametocitos a gametos, un proceso que es dependiente del pH, de la pCO_2 y de los niveles de bicarbonato (54). A su vez, el proceso de exflagelación de los microgametocitos ingeridos por el mosquito, que ocurre en la región posterior del intestino, requiere un pH mayor a 7,8, una concentración de bicarbonato mayor que 20 mM (55), tensión pCO_2 , una temperatura constante de 30°C (56) y la presencia de ácido xanturénico (57-59). Al igual que para los eritrocitos y para *Plasmodium*, la presencia de AC también se ha demostrado en el intestino de algu-

nas especies de mosquitos *Anopheles* (*An. gambiae*, *An. albopictus* y *An. quadrimaculatus*), *Aedes aegypti* y *Culex nigripalpus*, mediante el uso de técnicas moleculares, de histoquímica, inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (58, 60-62). Adicionalmente, la presencia de la enzima en diferentes regiones del intestino de las larvas y adultos en estas especies de mosquitos se ha cuantificado utilizando la técnica de intercambio de O^{18} acoplado a espectrometría de masas (63). La mayoría de la actividad de AC se observa preferencialmente en el intestino posterior, en hembras adultas de *An. gambiae* y *An. Quadrimaculatus*, pero también en la parte anterior del intestino posterior en las especies *A. aegypti*, *An. albopictus* y *C. nigripalpus* (64). Sin embargo, el número de ACs presentes en el intestino de mosquitos adultos permanece desconocido.

Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Con el descubrimiento de que el bicarbonato es necesario para la exflagelación y desarrollo de *Plasmodium* dentro del mosquito, aparece la posibilidad para controlar la transmisión de malaria inhibiendo la AC con los IACs, bloqueando con ellos el desarrollo del parásito dentro del vector (65, 66). Las principales clases de IAC están constituidas por complejos de aniones (tales como cianida $\{[:C\equiv N:]^{-}\}$, azida ($R-N=N^{+}=N^{-}$) y tiocianato (${}^{(-)}S-C\equiv N$)} y sulfonamidas no sustituidas ($-S(=O)_2-NH_2$), con metales como Zn(II), los cuales actúan sustituyendo el ligando no proteico del zinc o uniéndose al zinc en su estado desprotonado dentro del sitio activo de la enzima (36). Entre las sulfonamidas indicadas en la figura 3, que presentan actividad inhibitoria de AC se encuentran la Acetazolamida (AZM) (18), la Metazolamida (MZM) (19), la Etoxolamida (ETX) (20), la Dorzolamida (DZA) (21), la Diclorofenamida (DCP) (22) y la Brinzolamida (BZM) (23).

- La AZM: N - (5 - Sulfamoil - 1,3,4 - tiadiazol - 2 - il) acetamida; N - [5 - (aminosulfonil) - 1,3,4 - tiadiazol - 2 - il] - acetamida; 5 - Acetamido - 1,3,4 - tiadiazol - 2 - sulfonamida, es un compuesto de origen sintético, con peso molecular de 222.2. Es ligeramente soluble en agua y en etanol y prácticamente insoluble en éter y cloroformo. Se usa en la clínica para el tratamiento del glaucoma (67), el manejo de las crisis de ausencia y convulsiones tónico-clónicas, mioclónicas y atónicas (68).

- La MZM: (N - [5 - (aminosulfonil) - 3 - metil - 1,3,4 - tiadiazol - 2(3H) - ilideno] - acetamida) es un ácido débil, ligeramente soluble en agua, alcohol y

acetona, con un peso molecular de 236.27. Se usa en el tratamiento del glaucoma (67).

- La DZA: 4-etilamino-6-metil-7,7-dioxo-5,6-dihidro-4H-tieno[5,4-b]tiopiran-2-sulfonamida, peso molecular de 324.4, se usa como solución oftálmica para el tratamiento del glaucoma (67, 69). También se usa como formulación tópica en terapia antiviral y cancer (70).

- ETX: (6-etoxi-1,3-benzotiazol-2-sulfonamida), peso molecular 258.3, se usa para el tratamiento de las úlceras duodenales, glaucoma, edema y convulsiones asociadas a epilepsia. También es útil como diurético (67).

- DCP: {(4R)-4-etilamino-2-(3-metoxipropil)-1,1-dioxo-3,4-dihidrotieno[4,5-e]tiazina-6-sulfonamida}, peso molecular de 383.5, se usa para el tratamiento del glaucoma y varios desórdenes neuromusculares (67,71).

- BZM: (4,5-diclorobenzeno-1,3-disulfonamida), peso molecular de 305.1, es un compuesto insoluble en agua y se usa para el tratamiento del glaucoma (72).

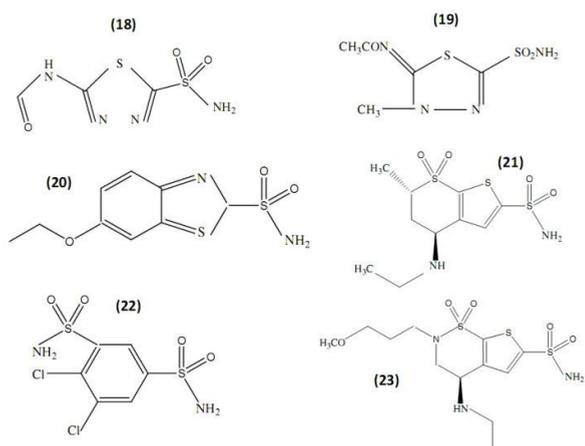


Figura 3. Estructuras de los inhibidores de anhidrasa carbónica tipo sulfonamidas

Los IAC se unen de una manera tetraédrica al ión de zinc en su estado desprotonado por medio del átomo de nitrógeno del motivo amida de la sulfonamida, mientras que las cadenas aromáticas laterales forman puentes de hidrógeno que involucran los aminoácidos Thr199 y Glu106 del sitio activo de la enzima (36). La parte aromática heterocíclica de los IAC tipo sulfonamidas interactúa con residuos hidrofílicos e hidrofóbicos del sitio activo, pero también puede unirse de una manera tetraédrica con el ión metal (36). Estudios de cristalografía

de rayos X indican la formación de aductos de los IAC tipo sulfonamida con isoenzimas de AC tipo I, II y IV (73). En los aductos, la acción de la sulfonamida es coordinada con el zinc de la enzima y el motivo NH que forma un puente de hidrógeno con el átomo de O de la Thr199, la cual, a su vez, se une con otro puente de hidrógeno con el grupo C=O de Glu106. Los átomos de oxígeno del motivo SO₂NH también participan con la formación de un puente de Hidrógeno con el NH de la Thr199. Las sulfonamidas poseen una alta afinidad con el sitio activo de la AC, alterando la cinética enzimática a muy bajas concentraciones (rango nanomolar) (36).

Puesto que los IAC inhiben las α ACs y que *Plasmodium* necesita el bicarbonato para la síntesis de ácidos nucleicos y su supervivencia, se ha estudiado la capacidad de algunos de estos IAC para inhibir el crecimiento *in vitro* de *P. falciparum*. Se ha observado, por ejemplo, que AZM es un potente inhibidor del crecimiento intraeritrocitario de *P. falciparum* (43), y que las sulfonamidas que poseen enlaces C=N en sus cadenas laterales inhiben fuertemente la PfAC (62). El tratamiento con AZM y MZM disminuye el pH dentro del intestino de las hembras adultas (56), confirmando no sólo la presencia de la enzima AC en el intestino, sino también el papel de la AC en el mantenimiento del pH. También se ha demostrado que el tratamiento de cultivos *in vitro* de *P. falciparum* con AZM reduce la parasitemia (43, 47), y que la AZM es capaz de inhibir la AC recombinante (74). La actividad anti-*Plasmodium in vitro* de IAC tales como MZM, AZM, ETX y DZA se está evaluando actualmente contra diferentes estadios de *P. falciparum* (cepa NF54) (S. Robledo, comunicación personal). Los resultados observados hasta ahora indican que la exposición de *P. falciparum* a los IAC evaluados afecta el crecimiento y multiplicación del parásito *in vitro*, en los estadios de anillos, trofozoitos y esquizontes, e inhibe el proceso de exflagelación *in vitro*. La inhibición del crecimiento de los parásitos observada aporta suficiente evidencia para sugerir que los IAC poseen potencial como agentes quimioterapéuticos. Por otro lado, la inhibición del proceso de exflagelación observada *in vitro*, aporta evidencias también para pensar que este mismo efecto pudiera ocurrir al interior del mosquito, afectándose con ello el desarrollo del parásito en el mosquito vector. Puesto que los IAC tipo sulfonamidas son medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento del glaucoma y otras enfermedades, y que han mostrado actividad contra *P. falciparum* en sus

diferentes estadios de desarrollo, sería oportuno continuar estudios de eficacia en modelo animal que permitan pasar a ensayos clínicos en humanos. Los compuestos IAC ofrecen ventajas para su uso como antimaláricos sobre otros candidatos, ya que cuentan con la aprobación para su uso en humanos.

Otra estrategia promisoría sería obtener nuevos antagonistas específicos de la CA de *Plasmodium*, diferentes de los compuestos tipo sulfonamidas, haciendo uso de la bioinformática y metodologías *in silico*, y posterior validación mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* (74, 75).

Por último, la posibilidad de disponer de agentes bloqueadores de la transmisión representa una estrategia novedosa ya que lo que se busca con este tipo de agentes es prevenir o evitar la fertilización o el desarrollo del parásito en el intestino del vector. Como consecuencia se reducirían las tasas de infección de mosquitos y su número reproductivo en una comunidad determinada. Es importante también continuar los estudios sobre mosquitos, que permitan, por ejemplo, caracterizar las CAs presentes en el intestino del mosquito *An. albimanus*, las células que las expresan y el papel fisiológico de dichas AC en el desarrollo del parásito dentro del mosquito, y así determinar el mecanismo por el cual los IAC puedan ser capaces de reducir el desarrollo del parásito allí.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CODI, Universidad de Antioquia, y a COLCIENCIAS por la ayuda financiera en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005; 434 (7030): 214-217.
2. Nafu-Traoré F, Gautam K, Veneman AM. World Malaria Report 2008 WHO Roll Back Malaria Department & UNICEF. WHO/HTM/GPM/2008.1. [Internet] Disponible en: URL: <http://apps.who.int/malaria/wmr2008/malaria2008.pdf>. Consultado: 30 de abril de 2009.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Multifocal Autochthonous Transmission of Malaria-Florida, Morbid Mortal Weekly Report. 2004; 53 (19): 412-413.
4. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008; 46 (2): 165-171.
5. Shortt HE. Life-cycle of the mammalian malaria parasite. *Br Med Bull*. 1951; 8 (1): 7-9.
6. Meis JF, Verhave JP, Jap PH, Sinden RE, Meuwissen JH. Malaria parasites-discovery of the early liver form. *Nature*. 1983; 302 (5907): 424-426.

7. Sinden RE. A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79 (5): 598-605.
8. Sinden RE, Canning EU, Bray RS, Smalley ME. Gametocyte and gamete development in *Plasmodium falciparum*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1978; 201 (1145): 375-399.
9. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. [Internet]. Disponible en URL: <http://apps.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>. Consultado: 30 de abril de 2009
10. Mungthin M, Bray PG, Ridley RG, Ward SA. Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-aminoquinolines, quinoline methanols, and phenanthrene methanols. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42 (11): 2973-2977.
11. Sánchez CP, Stein WD, Lanzer M. Dissecting the components of quinine accumulation in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* 2008; 67 (5): 1081-1093.
12. Checchi F, Balkan S, Vohnm BT, Massaquoi M, Biberson P, Eldin de Pecoulas P, et al. Efficacy of amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Harper, Liberia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96 (6): 670-673.
13. Goldsmith R. Antiprotozoarios. En: Katzung B, editor. *Farmacología Clínica y Básica.* 7ª ed. México DF: El Manual Moderno; 1998. pp. 970-971.
14. Croft S. Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance and New Directions in Drug Discovery. *Drug Discov Today.* 2001; 6 (22): 1151.
15. Cosentino MJ, Pakyz RE, Fried J. Pyrimethamine: an approach to the development of a male contraceptive. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87 (4): 1431-1435.
16. Butcher GA. Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Int J Parasitol.* 1997; 27 (9): 975-987.
17. Ogunbamigbe TO, Ojurongbe O, Ogunro PS, Okanlawon BM, Kolawole SO. Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Osogbo Nigeria: efficacy of amodiaquine + sulfadoxine-pyrimethamine and chloroquine + chlorpheniramine for treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103 (1): 79-84.
18. Nduati E, Diriye A, Ommeh S, Mwai L, Kiara S, Masseno V, et al. Effect of folate derivatives on the activity of antifolate drugs used against malaria and cancer. *Parasitol Res.* 2008; 102 (6): 1227-1234.
19. Rose GW, Suh KN, Kain KC, Le Saux N, McCarthy AE. Atovaquone-proguanil resistance in imported falciparum malaria in a young child. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27 (6): 567-569.
20. Hudson AT. Atovaquone - a novel broad-spectrum anti-infective drug. *Parasitol Today.* 1993; 9 (2): 66-68.
21. Butcher GA, Sinden RE. Persistence of atovaquone in human sera following treatment: inhibition of *Plasmodium falciparum* development *in vivo* and *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68 (7): 111-114.
22. Araújo JQ, Carneiro JW, de Araújo MT, Leite FH, Taranto AG. Interaction between artemisinin and heme. A density functional theory study of structures and interaction energies. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16 (9): 5021-5029.
23. McIntosh HM, Olliaro P. Artemisinin derivatives for treating severe malaria. [Base de Datos]. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; 2: CD000527.
24. Denis MB, Tsuyuoka R, Lim P, Lindegardh N, Yi P, Top SN, et al. Efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in northwest Cambodia. *Trop Med Int Health.* 2006; 11 (12): 1800-1807.
25. Winstanley P. Chlorproguanil-dapsone (LAPDAP) for uncomplicated falciparum malaria. *Trop Med Int Health.* 2001; 6 (11): 952-954.
26. Ekland EH, Fidock DA. Advances in understanding the genetic basis of antimalarial drug resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10 (4): 363-370.
27. Soto J, Toledo J, Gutiérrez P. *Plasmodium vivax* clinically resistant to chloroquine in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65 (1): 90-93.
28. Marfurt J, de Monbrison F, Brega S, Barbolat L, Müller I, Sie A, et al. Molecular markers of *in vivo Plasmodium vivax* resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in *pvdhfr* and *pvm-dr1*. *J Infect Dis.* 2008; 198 (3): 409-417.
29. WHO Expert Committee on insecticides. Insecticide resistance and vector control. Seventeenth report of the WHO Expert Committee on Insecticides. Technical Report Series 1970; No. 443.
30. Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol.* 2003; 206 (Pt 21): 3735-3744.
31. Coleman RE, Polsa N, Eikarat N, Kollars TM Jr, Sattabongkot J. Prevention of sporogony of *Plasmodium vivax* in *Anopheles dirus* mosquitoes by transmission-blocking antimalarials. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65 (3): 214-218.
32. Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, Ferry JG. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *PNAS.* 1999; 96 (26): 15184-15189.
33. Smith KS, Ferry JG. Prokaryotic carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1994; 45 (7): 369-392.
34. Supuran CT, Vullo D, Manole G, Casini A, Scozzafava A. Designing of novel carbonic anhydrase inhibitors and activators. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2004; 2 (1): 49-68.
35. Hilvo M, Tolvamen M, Clark A. Characterization of CA XV, a new GPI- anchored form of CA. *Biochem J.* 2005; 392 (4): 83-92.
36. Supuran CT. Carbonic anhydrase: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7 (2): 168-181.
37. Chegwiddden WR, Dodgson SJ, Spencer IM. The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals. *EXS* 2000; 344 (90): 343-363.
38. Lehtonen J, Shen B, Vihinen M, Casini A, Scozzafava A, Supuran CT. Characterization of CA XIII, a novel member of the CA isozyme family. *J Biol Chem.* 2004; 279 (5): 2719-2727.
39. Jones NL. An obsession with CO₂. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008; 33 (4): 641-650.
40. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002; 419 (6906): 498-511.
41. Krungkrai SR, Suraveratum N, Rochanakij S. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol.* 2001; 12 (5): 661-668.
42. Krungkrai J, Supuran CT. The alpha Carbonic Anhydrase from the Malaria Parasite and its Inhibition. *Current Pharm Design.* 2008; 14 (3): 631-640.
43. Krungkrai J, Krungkrai SR, Supuran CT. Malarial parasite carbonic anhydrase and its inhibitors. *Curr Top Med Chem.* 2007; 7 (9): 909-917.
44. Scheibel LW, Ashton SH, Trager W. *Plasmodium falciparum*. Microaerophilic requirements in human red blood cells. *Exp Parasitol.* 1979; 47 (3): 410-418.
45. Pardee AB, Yates RA. Pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1956; 221 (2): 743-756.
46. Krungkrai J, Prapunwattana P, Wichitkul C, Reungprapavut S. Molecular biology and biochemistry of malarial parasite pyrimidine biosynthetic pathway. *Trop Med Public Health.* 2003; 45 (7): 32-43.
47. Sein KK, Aikawa M. The pivotal role of carbonic anhydrase in malaria infection. *Med Hypotheses.* 1998; 50 (3): 19-23.
48. Boudko DY, Moroz LL, Linsler PJ, Trimarchi JR, Smith PJS, Harvey WR. Alcalinization by chloride/bicarbonate pathway in larval mosquito midgut. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98 (26): 15354-15359.
49. Romero MF, Henry D, Nelson S, Harte PJ, Dillon AK, Sciortino CM. Cloning and characterization of a Na⁺-driven anion exchanger (NDAE1). A new bicarbonate transporter. *J Biol Chem.* 2000; 275 (32): 24552-24559.

50. Maren TH. Carbonic anhydrase: Chemistry, Physiology and Inhibition. *Physiol Rev.* 1967; 47 (6): 595-781.
51. Cabantchik ZI, Moody S, Gordeuk VR. Iron chelators as anti-infectives; malaria as a paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 26 (4): 289-298.
52. Dessens JT, Kiamos I, Mendoza J, Mahairaki V, Khater E, Vlachou D, *et al.* A novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol Microbiol.* 2003; 49 (8): 319-329.
53. Boudko DY, Moroz LL, Linser PJ, Trimarchi JR, Smith PJ, Harvey WR. In situ analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH sensitive microelectrodes. *J Exp Biol.* 2001; 204 (Pt 4): 691-699.
54. Nijhout MM. Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH *in vitro*. *Parasitol.* 1978; 76 (2): 39-53.
55. Corena MP, Seron TJ, Lehman HK, Ochriotor JD, Kohn A, Chingkuang Tu, *et al.* Carbonic anhydrase in the midgut of larval *Aedes aegypti*: cloning, localization and inhibition. *J Exp Biol.* 2002; 205 (3): 591-602.
56. Ogwan'g RA, Mwangi JK, Githure J, Were JB, Roberts CR, Martin SK. Factors affecting exflagellation of in vitro-cultivated *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49 (1): 25-29.
57. Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, *et al.* Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.* 1998; 19 (2): 289-292.
58. Arai M, Billker O, Morris HR, Panico M, Delcroix M, Dixon D, *et al.* Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of *Plasmodium* in the midgut of the mosquito. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 116 (1): 17-24.
59. Hirai M, Wang J, Yoshida S, Ishii A, Matsuoka H. Characterization and identification of exflagellation-inducing factor in the salivary gland of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287 (4): 859-864.
60. Seron TJ, Hill J, Linser PJ. A GPI-linked carbonic anhydrase expressed in the larval mosquito midgut. *J Exp Biol.* 2004; 207 (Pt 26): 4559-4572.
61. Fisher SZ, Tariku I, Case NM, Tu C, Seron T, Silverman DN, *et al.* Expression, purification, kinetic, and structural characterization of an alpha-class carbonic anhydrase from *Aedes aegypti* (AaCA). *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1764 (8): 1413-1419.
62. Corena MP, Molly MF, Van LE, Chingkuang T, Silverman DN, Linser PJ. Alkalization of Larval Mosquito Midgut and the Role of Carbonic Anhydrase in Different Species of Mosquitoes. *Comp Biochem Phys. Part C.* 2004; 137 (5): 207-225.
63. Silverman DN, Tu CK. Molecular basis of the oxygen exchange from CO₂ catalyzed by carbonic anhydrase III from bovine skeletal muscle. *Biochem.* 1996; 25 (8): 8402-8408.
64. Corena MP, Seron TJ, Lehman HK, Ochriotor JD, Kohn A, Chingkuang Tu, *et al.* Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *J Exp Biol.* 2005; 208 (14): 3263-3273.
65. Corena MP, Ceballos C, Jiménez E, Arenas A, Quiñonez M, López L, *et al.* Bicarbonate Production Inhibitors as a Novel Transmission-blocking Approach. En: *FAO/IAEA International Conference on Area-Wide Control of Insect Pests: Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques.* Vienna; 2005.
66. Linser PJ, Boudko DY, Corena MP, Harvey WR, Seron TJ. The molecular genetics of larval mosquito biology: a path to new strategies for control. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007; 23 (2 Suppl): 283-293.
67. Mincione F, Scozzafava A, Supuran CT. The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. *Curr Pharm Des.* 2008; 14 (7): 649-665.
68. Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002; 248 (1-2): 1-14.
69. Pfeiffer N. Dorzolamide: development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Survey Ophthalmol.* 1997; 42 (2): 137-151.
70. Scozzafava A, Owa T, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Anticancer and antiviral sulfonamides. *Curr Med Chem.* 2003; 10 (11): 925-953.
71. Cleland JC, Griggs RC. Treatment of neuromuscular channelopathies: current concepts and future prospects. *Neurotherapeutics.* 2008; 5 (4): 607-612
72. Iester M. Brinzolamide ophthalmic suspension: a review of its pharmacology and use in the treatment of open angle glaucoma and ocular hypertension. *Clin Ophthalmol.* 2008; 2 (3): 517-523.
73. Stams T. X ray crystallographic studies of mammalian Carbonic anhydrase isozymes. In: *The carbonic anhydrase new horizons.* EXS. 2000; 90: 159-174.
74. Reungprapavut S, Krungkrai SR, Krungkrai J. *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase is a possible target for malaria chemotherapy. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004; 19 (3): 249-256.
75. Wiwanitkit V. *Plasmodium* and host carbonic anhydrase: molecular function and biological process. *Gene Ther Mol Biol.* 2006; 10 (2): 251-254.