HELOISA BERTI GABRIEL

Caracterização da função biológica da vitamina K
Biossintetizada pelas formas intraeritrocitárias de
Plasmodium falciparum

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

São Paulo
2010

HELOISA BERTI GABRIEL

Caracterização da função biológica da vitamina K biossintetizada pelas
formas intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum*

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

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador:
Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Gabriel, Heloisa Berti.

Caracterização da função biológica da vitamina K biossintetizada pelas formas intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum* / Heloisa Berti Gabriel. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Alejandro Miguel Katzin.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biossíntese de isoprenóides e de glicoproteínas em *P. falciparum*

Versão do título para o inglês: Analysis of the biological function of the vitamin K biosynthesized by intraerythrocytic forms of *Plasmodium falciparum*.

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Vitamina K 4. Menaquinona 5. Filoquinona 6. Cadeia respiratória I. Katzin, Alejandro Miguel II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0203/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Heloisa Berti Gabriel.

Título da Dissertação: Caracterização da função biológica da vitamina K
 biossintetizada pelas formas intraeritrocitárias de
 Plasmodium falciparum.

Orientador(a): Alejandro Miguel Katzin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **301**, referente ao projeto intitulado: "*Verificação da possível função biológica dos carotenóides e vitamina K biossintetizados pelas formas intraeritrocitárias de Plasmodium falciparum*" sob a responsabilidade de **Heloisa Berti Gabriel**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 30 de abril de 2009.

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

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

*Aos meus pais Antônio e Maria
Jandira, por todo apoio e
carinho...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram comigo ao longo desse trabalho, em especial:

A Alejandro, pela oportunidade, ensinamentos, apoio, paciência e confiança depositada todo esse tempo.

A Emília, Renata e Valnice, pelos ensinamentos, apoio, amizade e imensa colaboração durante todo o desenvolvimento desta dissertação.

A Rodrigo, Fabiana e Alexandre pela sua imensa amizade, incentivo, apoio e colaboração sempre que necessário.

A Gerhard e Fernanda, pelos ensinamentos, amizade, apoio e colaboração.

Em especial quero agradecer a eles, pelo apoio nos momentos mais difíceis, que se fazem mais difíceis ainda quando a família está longe.

Aos professores Silvia Uliana, Ariel Silber, Tânia Katzin e Beatriz Stolf, pelos ensinamentos, discussões e colaboração ao longo desse trabalho.

A todo o pessoal do Departamento de Parasitologia: alunos, técnicos e professores, pela convivência e amizade.

Aos meus grandes amigos do departamento e os de fora do departamento, pelo apoio, carinho, paciência e incentivo.

Aos meus pais e familiares, pelo amor e apoio que nunca me faltaram.

À Deus pela força e paciência nos momentos mais difíceis.

*"Noventa por cento do sucesso
se baseia simplesmente em
insistir".*
Woody Allen

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Gabriel HB. Caracterização da função biológica da vitamina K biossintetizada pelas formas intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum* [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A falta de uma vacina eficaz e o problema da resistência aos fármacos têm dificultado o controle da malária. A busca de novos alvos biológicos para o desenvolvimento de antimaláricos eficazes tem se concentrado, em parte, na pesquisa e compreensão de vias metabólicas exclusivas do parasita. Nosso grupo vem investigando e caracterizando produtos da biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum*. Resultados preliminares identificaram a biossíntese das duas formas da vitamina K: filoquinona (PhQ) e menaquinona (MQ), ambas provenientes das vias do chiquimato e da via 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Salienta-se, ainda, que as vias do chiquimato e MEP são exclusivas do parasita, portanto alvos interessantes para o estudo e desenvolvimento de drogas alternativas contra a malária. Ensaios enzimáticos demonstraram a participação da MQ-4 na cadeia respiratória como transportadora de elétrons. Resultados indicaram que o parasita controla a concentração de ubiquinona e menaquinona (UQ/MQ) de acordo com as condições de aeração a qual é submetido, assim como descrito em *E. coli* e *Ascaris suum*. A biossíntese de MQ em *P. falciparum* é bloqueada pelo composto Ro 48-8071, inibidor da enzima 1,4-dihidroxi-2-naftoato prenilttransferase da via de biossíntese de MQ. Em relação a PhQ, dados preliminares mostram uma provável participação na proteção antioxidante no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Finalmente, por meio de ensaios de *Real Time-PCR*, investigou-se o padrão de transcrição de prováveis genes que supostamente codificariam algumas enzimas da via de biossíntese de MQ, PhQ, e UQ (esse último previamente caracterizado). Os resultados demonstraram que não há alterações na transcrição desses genes prováveis nos parasitas mantidos em diferentes condições de pressão de O₂.

Palavras-chaves: Malária. *Plasmodium falciparum*. Vitamina K. Menaquinona. Filoquinona. Ubiquinona. Cadeia respiratória.

ABSTRACT

Gabriel, HB. Analysis of the biological function of the vitamin K biosynthesized by intraerythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* [dissertation (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010

The lack of an effective vaccine and the problem of drug resistance have hampered the control of malaria. The search for new biological targets for the development of effective antimalarials in part has focused on research and understanding of metabolic pathways unique to the parasite. Our group has investigated and characterized the products of the isoprenoids biosynthesis in *P. falciparum*. Preliminary results have identified the biosynthesis of two forms of vitamin K: phylloquinone (PhQ) and menaquinone (MQ), both derived from the Shikimate pathway and 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway (MEP). The shikimate and MEP pathways are unique to the parasite therefore are interesting targets for study and development of alternative drugs against the malaria. The enzymatic assay showed the participation of MQ-4 in the respiratory chain as electron carrier. Results indicated that the parasite controls the concentration of ubiquinone and menaquinone (UQ / MQ) according to the aeration conditions which is submitted, as described in *E. coli* and *Ascaris suum*. The MQ biosynthesis in *P. falciparum* is blocked by the compound Ro 48-8071, an inhibitor of the enzyme 1,4-dihydroxy-2-naftoato prenyltransferase. Also was described in the parasite, the biosynthesis of another form of vitamin K (PhQ), and preliminary results showed probably participation of PhQ in the antioxidant protection in the cycle of *P. falciparum*. Finally, by the *Real Time-PCR*, we investigated the pattern of transcription of putative genes some enzymes of MQ, PhQ and UQ biosynthesis (the last was previously characterized). The results showed no changes in the transcription profile in the parasites kept in different conditions of O₂ pressure.

Key-words: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Vitamin K. Menaquinone. Phylloquinone. Ubiquinone. Respiratory chain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da malária no mundo (2009)	18
Figura 2. Ciclo de vida do parasita da malária.....	20
Figura 3. Via de biossíntese de retinóides, vitamina K, vitamina E e carotenóides..	26
Figura 4. Estrutura dos homólogos de vitamina K.	27
Figura 5. Cadeia respiratória mitocondrial típica.....	29
Figura 6. Perfil de biossíntese de MQ-4, PhQ e UQ no estágio de esquizonte.	45
Figura 7. Representação dos intermediários da via de biossíntese de MQ.	47
Figura 8. Determinação de IC ₅₀ da droga Ro 48-8071 em culturas sincrônicas de <i>P. falciparum</i>	48
Figura 9. Teste de recuperação através de adição de MQ-4 em parasitas sob tratamento com Ro 48-8071.....	49
Figura 10. Teste de recuperação através de adição de PhQ em parasitas sob tratamento com Ro 48-8071.....	50
Figura 11. Efeito de Ro 48-8071 sobre a biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ nos estágios intraeritrocitários de <i>P. falciparum</i>	51
Figura 12. Efeito da condição de anaerobiose na biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ nos estágios intraeritrocitários de <i>P. falciparum</i> :	53
Figura 13. Efeito do restabelecimento das condições de oxigenação normais pós-manutenção em anaerobiose na biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ..	54
Figura 14. Microteste com Ro 48-8071 em parasitas mantidos em condições normais de cultivo comparado aos parasitas mantidos em anaerobiose.....	55
Figura 15. Perfil de transcrição dos genes provavelmente envolvidos na via de biossíntese de MQ e UQ em parasitas mantidos sob condições de anaerobiose..	57
Figura 16. Efeito da condição de estresse oxidativo (20% O ₂) na biossíntese MQ-4 e PhQ nos estágios intraeritrocitários de <i>P. falciparum</i> :	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos construídos pelo programa <i>Primer3</i> para comparação do perfil de transcrição de genes/seqüências provavelmente envolvidas nas vias de biossíntese de MQ e UQ em análises por <i>Real Time-PCR</i>	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Fe(III) PPIX	Ferriprotoporfirina IX
MEP	2C-metil-D-eritritol-4-fosfato
IPP	Isopentenil pirofosfato
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DOXP	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato
FPP	Farnesil pirofosfato
pABA	p-aminobenzoato
EPSP sintase	5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
DAHP sintase	3-deoxi-D-arabino-heptolusonato-7-fosfato-sintase
PhQ	Filoquinona (2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona)
MQ	Menaquinona
MQ-4	Menaquinona com 4 unidades isoprênicas
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
GPP	Geranil pirofosfato
(n)	Número variável de unidades isoprênicas
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
RP-HPLC	<i>High Performance Liquid chromatography</i>
UQ	Ubiquinona
ATP	Adenosina Trifosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PfNDH2	tipo II NADH:quinona oxidoreductase
G3pdh	Glicerol-3-fosfato desidrogenase
DHO	Dihidroorotato desidrogenase
MQO	Malato: oxidorreductase quinona
PBS	<i>Phosphate Buffer saline</i>
BHT	Etanol-0,01% hidroxitolueno butilado
Cpm	Contagem por minuto
IC ₅₀	Concentração inibitória de crescimento de 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	real-time PCR
C _t	<i>crossing threshold</i>
DPI	Difenileno-iodônio
ESI-MS/MS	Electrospray ionization tandem mass spectrometry
HGT	Horizontal gene transfer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Generalidades	17
1.2 Os parasitas	18
1.3 Ciclo de vida	19
1.4 O problema	21
1.5 Vias metabólicas	22
1.5.1 Via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)	23
1.5.2 Via do Chiquimato	24
1.6 Vitamina K e a cadeia respiratória	25
2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	34
3.2 Sincronização dos estágios intraeritrocitários	34
3.3 Separação dos estágios intraeritrocitários	34
3.4 Marcações metabólicas	35
3.5 Extração de MQ, PhQ e UQ	35
3.5.1 Protocolo I	35
3.5.2 Protocolo II	35
3.6 Cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC)	36
3.6.1 Protocolo I	36
3.6.2 Protocolo II	36
3.7 Ensaios de inibição <i>in vitro</i> de parasitas intraeritrocíticos mantidos em culturas sincrônicas de <i>P. falciparum</i> pela droga Ro 48-8071	37
3.7.1 Determinação da IC ₅₀ de Ro 48-8071	37
3.7.2 Recuperação <i>in vitro</i> de parasitas mantidos em culturas sincrônicas de <i>P. falciparum</i> tratadas com a droga Ro 48-8071 e suplementadas com MQ ou PhQ	37
3.7.3 Marcação metabólica e purificação de parasitas tratados com a droga Ro 48-8071 após 48 horas	38
3.8 Condições de O ₂ na cultura <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i>	38
3.9 Extração e purificação por RP-HPLC de UQ, MQ e PhQ de parasitas mantidos em condições de anaerobiose	39
3.10 Perfil da biossíntese de MQ, PhQ e UQ de parasitas de <i>P. falciparum</i> em condições normais de cultura após 48 horas em anaerobiose	39
3.12 Reação enzimática para verificar a provável função da MQ como transportadora de elétrons na cadeia respiratória em <i>P. falciparum</i>	40
3.13 Avaliação do perfil de transcrição dos genes provavelmente envolvidos na via de biossíntese de MQ/UQ em parasitas mantidos em anaerobiose	41
3.14.1 Extração e purificação por HPLC de parasitas submetidos a estresse oxidativo	42
4 RESULTADOS	44
4.1 Cromatografia líquida de alto desempenho (RP-HPLC) para análise do perfil de biossíntese de MQ, PhQ e UQ	45
4.2 Ensaios de inibição <i>in vitro</i> de culturas sincrônicas de <i>P. falciparum</i>	46
4.2.1 Recuperação <i>in vitro</i> de culturas sincrônicas de <i>P. falciparum</i> tratadas com a droga Ro 48-8071, com adição simultânea de MQ ou PhQ exógena	48

4.2.2 Efeito da droga Ro 48-8071 na biossíntese de MQ, PhQ e UQ em parasitas de <i>P. falciparum</i>	50
4.3 Condição de anaerobiose no cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i>	51
4.3.1 Perfil da biossíntese de MQ, PhQ e UQ em parasitas mantidos em anaerobiose comparados aos parasitas mantidos em condições normais	52
4.3.2 Perfil de biossíntese de MQ, PhQ e UQ após restabelecimento da condição normal de cultura	53
4.3.3 Determinação de IC ₅₀ da droga Ro 48-8071 em culturas sincrônicas de <i>P. falciparum</i> cultivados sob condições anaeróbicas	55
4.4 Reação enzimática para verificar a provável função da MQ como transportadora de elétrons na cadeia respiratória de <i>P. falciparum</i>	56
4.5 Avaliação do perfil de transcrição dos genes provavelmente envolvidos na via de biossíntese de MQ/UQ em parasitas mantidos em anaerobiose	56
4.6 Perfil da biossíntese de PhQ e MQ em parasitas de <i>P. falciparum</i> cultivados em condições de estresse oxidativo	58
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXO: Intraerythrocytic stages of <i>Plasmodium falciparum</i> biosynthesize menaquinone – Artigo no prelo	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

A malária também conhecida como paludismo, impaludismo, maleita, febre terçã ou quartã, é um dos principais flagelos da humanidade desde a antiguidade. Sua origem ainda é discutida, duas de suas teorias seriam que tivesse se desenvolvido a partir de adaptação de Coccídios do epitélio intestinal para tecidos de órgãos internos e células sanguíneas, ou através de uma transferência lateral de parasitos de outros vertebrados (1).

Originada provavelmente no continente Africano, a doença acompanhou as migrações do ser humano pelas regiões do mediterrâneo, Índia e Sudeste Asiático. No século XVIII, recebeu o nome italiano de “*mal aria*”, que significa mau ar ou ar insalubre, quando Lancisi, em 1717, relacionou que a doença era causada pelas emanções e miasmas provenientes dos pântanos (2). A chegada da doença ao Novo Mundo ainda hoje é motivo de especulações, a teoria mais aceita seria que a introdução da malária no novo mundo tenha ocorrido no início do século XVII. O *Plasmodium vivax* teria sido transportado do sudeste da Ásia para as colônias americanas em Jamestown e Virginia, enquanto o *P. falciparum* teria sido introduzido na América Central por meio dos escravos africanos (3). Análises de DNA mitocondrial em espécies de *Plasmodium* da Ásia, América do Sul e Papua Nova Guiné mostram que essas populações são mais antigas (50.000 a 100.000 anos atrás) que o evento de migração dos africanos, sugerindo que o parasita tenha migrado da África antes da expansão ocorrida neste continente, talvez durante o Pleistoceno (4).

Ainda hoje, a doença se faz presente em cerca de 100 países nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (**Figura 1**). Cerca de 40% da população mundial vive em áreas com risco de transmissão de malária, resultando em aproximadamente 300 a 500 milhões de pessoas infectadas no mundo a cada ano. A transmissão ocorre em países da América Central, América do Sul, América do Norte (México), África subsaariana, Índia, Sudeste da Ásia, Oriente Médio e Oceania. Entretanto, mais de 90% dos casos ocorrem em países africanos, com mortalidade aproximada entre 1 e 1,5 milhões (5,6). No Brasil, a área endêmica é conhecida como Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mata Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia e Tocantins.¹⁻²

¹ Disponível em: www.sucen.sp.gov.br

² Disponível em: www.cdc.gov

Figura 1. Distribuição geográfica da malária no mundo (2009). ■ Áreas onde ocorre transmissão de malária. ■ Áreas com risco limitado.³

1.2 Os parasitas

A malária é uma doença sistêmica causada por parasitas protozoários pertencentes ao filo **Apicomplexa**, família **Plasmodiidae**, gênero **Plasmodium**. Há quase 100 espécies de plasmódios, 22 das quais infectam macacos e 50 são parasitas de aves ou répteis. As espécies que infectam o homem são quatro (7):

- I. ***Plasmodium falciparum***, descrita por Welch em 1987, responsável pela febre terçã maligna, com acessos febris em intervalos de 36 a 48 horas (7).
- II. ***Plasmodium vivax***, descrita por Grassi e Feletti em 1890, agente causador da febre terçã benigna com ciclos de 48 horas (7).
- III. ***Plasmodium ovale***, descrita por Strphens em 1922, com distribuição limitada ao continente Africano e responsável por outra forma da febre terçã benigna com ciclos de 48 horas (7).
- IV. ***Plasmodium malariae***, descrita por Laveran em 1881, causa a febre quartã, que se caracteriza pela ocorrência de acessos febris a cada 72 horas (7).

³ Disponível em: www.who.int/

Os agentes transmissores da malária são os mosquitos do gênero *Anopheles*. Apenas as fêmeas são hematófagas e são as responsáveis pela transmissão do parasita. Esse gênero inclui aproximadamente 400 espécies no mundo, mas apenas 60 são capazes de transmitir o parasita em condições naturais (2).

1.3 Ciclo de vida

Laveran foi o responsável pela descoberta do plasmódio, ao observá-los nos eritrócitos humanos e foi o primeiro a descrevê-lo, em 1880. O ciclo biológico de parasitas humanos do gênero *Plasmodium* é muito semelhante entre as espécies, apresentando duas fases distintas (**Figura 2**). Uma das fases na qual acontece reprodução sexuada (esporogonia) no hospedeiro definitivo invertebrado. A outra fase é desenvolvida no hospedeiro vertebrado, em que ocorrem alguns ciclos de reprodução assexuada (esquizogonia)(7).

Quando as fêmeas dos anofelinos picam indivíduos infectados por *Plasmodium*, formas sexuais do parasita (gametócitos) são liberadas na luz de seu intestino. Os gametas masculinos e femininos produzidos se diferenciam em micro, pelo processo de exflagelação, e macrogametas, respectivamente. Quando os gametas se unem forma-se uma célula-ovo ou zigoto, que se diferencia em oocineto, este se locomove e penetra na lâmina basal intestinal, originando o oocisto. No interior do oocisto ocorrem muitas divisões nucleares, a primeira meiótica e as subseqüentes mitóticas, dando origem a milhares de esporozoítos e, posteriormente, essas formas infectantes migram para as glândulas salivares do mosquito, sendo liberados durante um novo repasto sanguíneo em outro hospedeiro intermediário. Os esporozoítos liberados após a picada do anofelino, alcançam o fígado do hospedeiro vertebrado e invadem os hepatócitos originando a forma arredondada denominada criptozoíta, estes crescem e realizam a esquizogonia pré-eritrocitária. De acordo com a espécie de *Plasmodium*, ocorre variações no tempo do ciclo nos hepatócitos, sendo em média 6 dias para *P. falciparum*, 10 dias para *P. vivax*, 15 dias para *P. ovale* e *P. malariae*. Os merozoítas da esquizogonia pré-eritrocitária são então liberados pelo rompimento dos hepatócitos, os que sobrevivem à fagocitose e destruição pelas células de Kupffer invadem as hemácias iniciando o ciclo intra-eritrocitário.(7)

No sangue, o ciclo esquizogônico repete-se em ciclos bastante regulares e característicos para cada espécie. Esse ciclo ocorre preferencialmente no sangue dos capilares profundos das vísceras. No caso de *P. falciparum*, as formas esquizogônicas raramente são encontradas no

sangue periférico devido à sua capacidade de citoaderência em células endoteliais, favorecendo a retenção dessas formas nas paredes dos vasos profundos, o que, se ocorre em excesso, leva às formas graves da infecção com *P. falciparum* (7).

No ciclo intra-eritrocitário o parasita se desenvolve em três fases, se diferenciando em trofozoíto jovem, trofozoíto maduro e esquizonte, ocorrendo de 36 a 48 horas em *P. falciparum*, 48 horas em *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas em *P. malariae*. Originam-se novos merozoítas durante a esquizogonia no ciclo intra-eritrocitário onde, são liberados na corrente sanguínea, através do rompimento da hemácia, podendo invadir novas hemácias, iniciando um novo ciclo intra-eritrocitário. Alguns trofozoítos diferenciam-se em formas sexuadas, os gametócitos, que são responsáveis pela infecção do hospedeiro invertebrado, completando todo o ciclo.

Figura 2. Ciclo de vida do parasita da malária. Durante a alimentação sanguínea, a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítas no hospedeiro humano (1). Os esporozoítas infectam as células do fígado (2). Formando os esquizontes (3). A ruptura dos hepatócitos leva à liberação dos merozoítas (4). Após a replicação no fígado, ciclo pré-eritrocitário (A). Os parasitas sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos, ciclo eritrocitário (B). Os merozoítas infectam as hemácias (5). O estágio de anel diferencia-se em trofozoíto e esquizonte (6). Alguns parasitas diferenciam-se em gametócitos (7), os quais são ingeridos pelo mosquito (8). No mosquito a multiplicação é conhecida como ciclo esporogônio (C). No estômago do mosquito, ocorre a geração dos zigotos (9). Os oocinetos (10) invadem a parede do estômago, em que é desenvolvido o oocisto (11). No oocisto são produzidos os esporozoítas (12) os quais, após liberados migram até a glândula salivar, em que invadem ativamente.²

1.4 O problema

Os danos econômicos atribuídos à malária classificam esta doença como uma das quatro principais causas da pobreza no mundo, acarretando problemas sócio-econômicos e contribuindo para menor desenvolvimento dos países afetados. A falta de uma vacina eficaz, o problema da resistência aos fármacos e a falta de investimento na procura e aplicação de novos compostos, contribuem para o adiamento da solução do controle desta infecção. Além disso, existe ainda um grave problema na escolha e distribuição de antimaláricos, principalmente em países mais pobres como os da África (8-9).

Apesar de muitos esforços a fim de reduzir o número de casos da malária, são relatados cerca de 1,4 bilhões de pessoas expostas em áreas de risco e ainda um grave problema na escolha e distribuição de antimaláricos, principalmente em países mais pobres como os da África (8-9).

No Brasil, devido às mudanças sócio-econômicas ocorridas principalmente a partir da década de 50, com a implantação dos projetos de desenvolvimento da Amazônia, ocorreu uma migração interna no país em especial para a região norte. As mudanças impostas levaram à exposição de grandes contingentes populacionais para as áreas endêmicas de malária e a alterações no meio ambiente (10), entre as quais destacam-se os projetos de assentamentos, agropecuários, construção de hidroelétricas, extrativismos vegetal e mineral, os quais têm provocado desmatamento de áreas extensas, agressões ao ambiente, desorganização espacial e concentração de pessoas em condições sanitárias inadequadas. Estes fatores associados a questões relacionadas à população suscetível, ao agente etiológico, ao vetor, além de condições ecológicas, geográficas, econômicas, sociais e culturais, foram determinantes para o aumento da transmissão da malária.

Outro fator determinante para o aumento no número de casos de malária foi o surgimento e propagação de parasitas resistentes à maior parte dos antimaláricos disponíveis, tornando-se um grave problema de saúde pública.

Nos últimos anos observou-se o surgimento de parasitas cada vez mais resistentes à drogas e vetores aos inseticidas. Isso se deve à administração indevida de antimaláricos e inseticidas, aos movimentos populacionais em massa, aos serviços de saúde inadequados, aos recursos financeiros limitados, a falta e dificuldades operacionais na implementação de medidas para o controle da doença (11). Esses fatores colaboram para o aumento do número de casos de morbidade e

mortalidade ocasionados pela doença. Essa resistência pelo *P. falciparum* às drogas antimaláricas, utilizadas na terapêutica, levam a necessidade do desenvolvimento de novas terapias antimaláricas (12).

É sabido que a resistência às drogas é um dos obstáculos encontrados no combate a doença; por exemplo, em 1967 já era observado, em um programa de erradicação da doença, a resistência à cloroquina na maioria das regiões onde o *P. falciparum* era endêmico (11), além da resistência de outros antimaláricos habitualmente utilizados hoje em dia como sulfadoxina, pirimetamina e mefloquina.

O desafio atual é usar os antimaláricos existentes de forma mais eficiente para melhorar o controle da doença. Isto significa que se deve aprimorar o acesso às drogas apropriadas e suas combinações, fornecendo medicamentos com custos baixos, vigilância crescente a fim de orientar o uso adequado das drogas e mais atenção para estratégias alternativas de prevenção, como uso de mosquiteiros tratados com inseticidas, por exemplo.

A cloroquina inibe a degradação da hemoglobina pelo parasita. Cerca de 80% da hemoglobina é degradada, para a alimentação do parasita, por enzimas proteolíticas, em peptídeos que, posteriormente, serão degradados a aminoácidos. Assim é formado um resíduo livre denominado heme ou ferriprotoporfirina IX (Fe(III) PPIX) tóxico ao parasita, sendo este polimerizado, formando um composto inerte, insolúvel e não tóxico ao parasita, o pigmento malárico hemozoína (13).

Os alvos biológicos visados no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da malária abrangem tanto funções celulares, tais como detoxificação do heme ou ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX) (14), metabolismo redox e mecanismos de defesa antioxidante que possam gerar um estresse oxidativo no parasita (15-17) e o metabolismo do folato, já explorados para drogas estabelecidas como antimaláricos, assim como também novas vias metabólicas, tais como síntese de ácidos graxos, e biossíntese de isoprenóides (18).

1.5 Vias metabólicas

O *Plasmodium* é um protozoário que pertence ao grupo dos apicomplexas, parasitas intracelulares obrigatórios que são responsáveis por uma série de doenças graves que afetam uma ampla gama de hospedeiros animais, incluindo os seres humanos. Recentemente, nesses

organismos, observou-se a presença de uma organela, denominada apicoplasto, relatada pela primeira vez em *Toxoplasma* e *Plasmodium*. Sugere-se que ela seja resultante de uma endossimbiose secundária, assim como o cloroplasto de plantas (19).

No curso da evolução o apicoplasto perdeu sua função fotossintética, mas parece ser importante para a penetração do parasita na célula hospedeira, pois, quando bloqueado, observa-se que o parasita é capaz de crescer e se multiplicar, mas incapaz de invadir novas células durante o ciclo intraeritrocitário (20).

O apicoplasto reteve algumas vias biossintéticas como a biossíntese de isoprenóides, e de ácidos graxos. As enzimas dessas vias são codificadas no núcleo, e apresentam peptídeos que sinalizam sua sub localização no apicoplasto (20). Essas vias como exemplos a via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) e a via do Chiquimato, são excelentes alvos para a produção de novas drogas, uma vez que não são compartilhadas com o hospedeiro humano.

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

Por várias décadas, a via do Mevalonato, presente em animais e plantas, foi considerada a única via de síntese para os intermediários IPP (Isopentenil pirofosfato) e seu isômero DMAPP (Dimetilalil pirofosfato), unidades isoprênicas básicas para a biossíntese de isoprenóides. Trabalhos mostraram, independentemente, que a biossíntese, desses compostos, em certas bactérias, não podiam ser explicadas pela via do Mevalonato. A existência de uma segunda via para a biossíntese de unidades isoprênicas foi descoberta em 1988 por Flesch e Rohmer em seus estudos sobre a biossíntese de hopanóides (esteróides triterpênicos pentacíclicos) em bactérias (21). Essa via foi originalmente chamada de via de Rohmer ou via independente do mevalonato. Após a identificação do primeiro passo da via, o nome foi trocado para indicar os substratos (via do piruvato/gliceraldeído-3-fosfato GAP) ou o primeiro intermediário da via, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (via DOXP). Entretanto, o nome mais aceito é via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (22), o primeiro precursor exclusivo da via seguindo a mesma regra usada para nomear a via Mevalonato.

A identificação e caracterização do farnesil pirofosfato (FPP) em *P. falciparum* (23), assim como a presença de dolicois (24), e proteínas covalentemente modificadas por isoprenóides (25) foram as primeiras evidências para o estudo da biossíntese de isoprenóides em *Plasmodium*.

Jomaa e colaboradores (26) caracterizaram dois genes essenciais da via MEP (DOXP sintase e redutoisomerase) em *P. falciparum*, demonstrando que o parasita utiliza a via MEP para a biossíntese de isoprenóides.

Na última década, nosso grupo caracterizou diversos produtos da biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* (24-25, 27-32), resultantes da via alternativa 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (22). Esta via metabólica não é compartilhada por nós, os hospedeiros vertebrados, o que a torna um excelente alvo para o desenvolvimento de estratégias que visam o combate da malária (30, 32-33).

1.5.2 Via do Chiquimato

A via do Chiquimato, presente em algas, plantas superiores, bactérias e fungos, também está presente nos parasitos apicomplexos. Essa via tem como produtos finais os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, e como intermediário o corismato. São sete passos até a formação do corismato, iniciando com a condensação de fosfoenolpiruvato e eritrose 4-fosfato e seus intermediários são pontos de ramificação para diversas vias. As sete enzimas da via do Chiquimato foram originalmente descobertas em bactérias, principalmente *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (34).

Além dos aminoácidos aromáticos, o corismato, produto final da via do Chiquimato, pode dar origem a diversos outros compostos aromáticos, como tetraidrofolato, ubiquinonas, e vitaminas E e K (34).

Em *P. falciparum* a via foi descoberta como parte da biossíntese de folatos, onde o p-aminobenzoato (pABA), um intermediário da via, essencial para a produção de ácido fólico, foi descrito como sendo essencial para a sobrevivência do parasita, revertendo a ação de inibição ocasionada pelo herbicida glifosato, inibidor da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSP sintase) na via do Chiquimato (35-36). Posteriormente as enzimas chiquimato quinase, 3-deoxi-D-arabino-heptolusonato-7-fosfato-sintase (DAHP sintase), e chiquimato desidratase, foram descritas em *P. falciparum* (35).

Por ser uma via metabólica encontrada em plantas e microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* e *P. falciparum*, e ausente em mamíferos, considera-se um alvo importante para o desenvolvimento de herbicidas, vacinas e outras drogas.

1.6 Vitamina K e a cadeia respiratória

As vitaminas são substâncias orgânicas que são fatores alimentares essenciais de alta atividade biológica e requerida em pequenas quantidades. São divididas em lipossolúveis e hidrossolúveis. As primeiras geralmente fazem parte da membrana celular, agindo de forma semelhante aos hormônios esteróides, e as hidrossolúveis são cofatores enzimáticos. Entre as vitaminas lipossolúveis encontramos as vitaminas A, E e K, que apresentam cadeia isoprênica em sua constituição, provenientes da via MEP, sendo que as vitaminas E e K também possuem anéis aromáticos, que são oriundos da via do Chiquimato (37).

A vitamina K, nos vertebrados, é importante por sua função de cofator da enzima que promove a γ -carboxilação de fatores envolvidos na coagulação, entre outros. O termo vitamina K agrupa os compostos derivados de 2-metil-1,4-naftoquinonas que apresentam atividades de cofator na gama carboxilação de resíduos de glutamato. A estrutura básica é um anel naftoquinona, proveniente da via do Chiquimato, metilado na posição 2 e uma cadeia lateral, proveniente da via MEP, situada na posição 3.

Na via do Chiquimato, duas formas de vitamina K (filoquinona - PhQ, menaquinona - MQ) são sintetizadas a partir do corismato, onde seis reações enzimáticas subseqüentes conduzem à formação do anel naftoquinona, ou 1,4-dihidroxi-2-naftoil-CoA por meio dos genes MenF, MenD, MenC, MenE, MenB, MenA e MenG respectivamente. Este anel é isoprenilado por uma molécula de geranilgeranil pirofosfato e então metilado (**Figura 3**) (38).

Figura 3. Via de biossíntese de retinóides, vitamina K, vitamina E e carotenóides. Os retinóides (retinal, retinol e ácido retinóico) e as vitaminas K (filoquinona e menaquinona), vitamina E e carotenóides são produtos finais da via dos isoprenóides. A formação das unidades isoprenílicas pode ocorrer por meio da via do Mevalonato (animais) ou de ambas (bactérias e plantas). O anel aromático de ambas as formas de vitamina K é proveniente da via do Chiquimato. DMAPP (dimetilalil pirofosfato), DOXP (1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato), FPP (farnesil pirofosfato), GAP (gliceraldeído-3-fosfato), GPP (geranil pirofosfato), GGPP (geranilgeranil pirofosfato), IPP (isopentenil pirofosfato) e MEP (metil-eritritol-fosfato).

A filoquinona (2-metil-3-fitol-1,4-naftoquinona) é produzida por cianobactérias e plantas, possui uma cadeia lateral com quatro unidades isoprenílicas, sendo somente a primeira insaturada (**Figura 4A**). Por outro lado, as denominadas menaquinonas compõem um grupo de compostos produzidos por bactérias gram-positivas, e possuem a cadeia lateral com número variável de unidades isoprenílicas (de 2 a 15 moléculas de IPP) completa ou parcialmente insaturada, na

posição 3 do anel naftoquinona (**Figura 4B**). As MQs são abreviadas como MQ-n ou Q-n, sendo (n) o número de isoprenóides que compõem essa cadeia (39-40).

Figura 4. Estrutura dos homólogos de vitamina K. A: filoquinona, B: menaquinona. A filoquinona possui cadeia lateral com quatro unidades isoprênicas, e insaturação apenas na primeira unidade. Já a menaquinona possui cadeia lateral com número variável de unidades isoprênicas (n), todas com uma insaturação.

Trabalhos anteriores, do nosso grupo, por meio de marcações metabólicas com precursor direto [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato da via de biossíntese de PhQ e MQ, seguida dos métodos de extração, purificação por sistemas cromatográficos (*TLC*, *HPLC*), análises por espectrometria de massas; demonstrou a presença de via ativa de biossíntese das duas formas de vitamina K pelos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Esse resultado nos levou a especular que, aparentemente, *P. falciparum* seja um raro organismo a apresentar a biossíntese das duas formas de vitamina K.

Em plantas e cianobactérias a PhQ participa na transferência de elétrons do fotossistema I (41). Já a MQ, presente em bactérias, também atua na transferência de elétrons, mas na cadeia respiratória de bactérias anaeróbicas, em alguns casos, atua reduzindo o fumarato (42).

Em *E.coli*, por exemplo, a MQ está envolvida no transporte de elétrons na cadeia respiratória assim como a ubiquinona (UQ), outro produto da biossíntese de isoprenóides (15), sendo que as UQs de 7-9 unidades isoprênicas já foram identificadas e caracterizadas em *P. falciparum* pelo nosso grupo (28).

Em *P. falciparum*, dados bioquímicos indicam que função da mitocôndria não é a de gerar ATP, mas de manter a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial metabolicamente ativa para a regeneração da UQ, exigida como oceptor de elétrons (43). Na cadeia respiratória de *P. falciparum* a UQ funciona como elo entre o complexo I alternativo (tipo II NADH: ubiquinona oxidoreductase - PfNDH2) e o complexo III, tendo a função de coletar equivalentes de redução

(elétrons), doados por PfNDH2, transportando ao citocromo (complexo III), funcionando assim como aceptora de elétrons do complexo II. Ao receber elétrons é reduzida a ubiquinol e após o transporte é regenerada à sua forma oxidada (**Figura 5**).

Alguns organismos, como o *Ascaris suum*, têm a cadeia respiratória adaptada às mudanças na concentração de oxigênio do ambiente, que ocorrem durante o seu ciclo de vida. As larvas utilizam o metabolismo aeróbico semelhante aos mamíferos, tendo a ubiquinona com transportadora de elétrons. No entanto, os adultos utilizam uma quinona de baixo potencial, a rodoquinona, no metabolismo anaeróbico (44,45).

Na maioria dos organismos anaeróbios e nas bactérias anaeróbicas gram-positivas, a MQ é a única transportadora de elétrons na cadeia respiratória, sendo essencial para a sobrevivência desses organismos e, portanto, um alvo importante de drogas e vacinas. Por outro lado, muitas enzimas respiratórias de bactérias anaeróbicas facultativas, como *E. coli*, podem usar ambas MQ/UQ como substrato na transferência de elétrons; UQ em condições aeróbicas e MQ em condições anaeróbicas (46,47).

Figura 5. Cadeia respiratória mitocondrial típica (a) consiste de três bombas de prótons (Complexo I, III e IV), agindo em paralelo ao circuito de prótons (linha contínua azul) e em série com a transferência de elétrons (e-) (linha vermelha). Conforme ilustrado, o circuito é completo pela corrente de prótons retornando via Complexo V, geração de energia sob a forma de síntese de ATP. Na mitocôndria de *P. falciparum* (b), o circuito de prótons (linha contínua azul) é diferente da mitocôndria típica porque não há bombeamento de prótons por PfNDH2 (Complexo I alternativo), os produtores primários são complexos III e IV. Além disso, evidências bioquímicas indicam que não há (ou pouco, somente para completar o circuito) geração de ATP pelo complexo V. Há outros componentes que contribuem para a cadeia respiratória além do succinato desidrogenase (ou Complexo II), sendo glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3pdh), dihidroorotato desidrogenase (DHO) e malato: oxidoredutase quinona (MQO)

FONTE: Fisher et al. (2009) (48).

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A malária atualmente é uma das principais parasitoses humanas e um dos problemas de saúde mundial. Os casos de malária tendem a aumentar, já que têm surgido cada vez mais parasitas resistentes a drogas e vetores aos inseticidas. Assim, observa-se a importância do desenvolvimento de estratégias que objetivem tratamentos eficazes, possíveis vacinas e novas drogas antimaláricas.

O conhecimento sobre a bioquímica, biologia e fisiologia dos parasitas abre novas alternativas no estudo contra a malária. Os conhecimentos adquiridos até o presente momento sobre aspectos gerais de *P. falciparum* estimulam a investigação de vias ou compostos análogos aos de plantas, como também estimulam a especulação do papel desempenhado por esses compostos no ciclo do parasita.

A via MEP, cujos vários produtos já caracterizados pelo nosso grupo em *P. falciparum*, assim como a via do Chiquimato apresentam-se como alvos quimioterápicos, por serem vias compartilhadas por vários microorganismos patogênicos, incluindo *Mycobacterium tuberculosis* e não com o homem.

O presente trabalho destinou-se a complementar os estudos em andamento em nosso laboratório sobre a biossíntese das duas formas de vitamina K (MQ e PhQ) nas formas intraeritrocitárias de *P. falciparum*. Esses produtos, provenientes da via MEP e da via do Chiquimato, são considerados potenciais alvos para o desenvolvimento de estratégias antimaláricas. Com o objetivo de se conhecer mais profundamente o metabolismo de *P. falciparum* e o conhecimento do papel desempenhado por essas moléculas na fisiologia do parasita, foram propostas os seguintes objetivos:

- 2.1 Testar o efeito da droga (Ro 48-8071), inibidora da enzima 1,4-diidroxi-2-naftoato prenilttransferase, na biossíntese de MQ e PhQ, determinando previamente os valores de IC₅₀, em *P. falciparum*;
- 2.2 Comparar o perfil de biossíntese de MQ e UQ em parasitas mantidos em condições de anaerobiose;
- 2.3 Verificar a provável função da MQ como transportadora de elétrons na cadeia respiratória de *P. falciparum*;
- 2.4 Analisar o perfil de transcrição de prováveis genes da via de biossíntese de MQ juntamente com um gene já descrito da via de biossíntese de UQ em parasitas mantidos em

condições de anaerobiose comparando-os a parasitas mantidos em condições normais de oxigenação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

A cepa 3D7 de *P. falciparum* foi cultivada de acordo com o método de Trager e Jensen (49). Os parasitas foram cultivados em garrafas de cultivo em meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de Hepes, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 μ M de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 g/ml de gentamicina e 0,5% (v/v) de Albu-max I. Eritrócitos foram adicionados à cultura obtendo um hematócrito de 5%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C com trocas diárias de meio de cultura e injeção de uma mistura gasosa composta por 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. O controle da parasitemia foi realizado com a verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa.

3.2 Sincronização dos estágios intraeritrocitários

As culturas com mais de 10% de parasitemia no estágio anel jovem foram centrifugados, retirado o sobrenadante, adicionado o Sorbitol na proporção 1:25 (v/v, precipitado:solução Sorbitol 5% a 37 °C). Após incubar a 37 °C por 5 minutos, os parasitas foram centrifugados a 800 x g por 10 minutos. O precipitado, que corresponde ao concentrado de parasitas no estágio anel, foi introduzido novamente à cultura (50).

Para parasitas altamente sincrônicos utilizamos o método de flotação por plasmagel onde parasitas maduros são separados dos parasitas jovens. Após centrifugação a 1500g (o precipitado foi medido e adicionado 1,4 do volume com meio RPMI contendo Albumax, em seguida foi adicionado, gentilmente, 2,4 do volume total de (plasmagel) 6% seguido de incubação por 20 minutos a 37°C separando, assim, os esquizontes ou trofozoítas maduros de anéis em uma fase turva (51). A sincronização por sorbitol é realizada no dia seguinte.

3.3 Separação dos estágios intraeritrocitários

Os estágios intraeritrocitários: anéis, trofozoítos e esquizontes, foram separados em um gradiente descontínuo de Percoll (Pharmacia Chemicals, Uppsala, Sweden). Um mililitro de cultura foi adicionado em tubos de vidro Corex (Du PontTM, USA) de 18 ml contendo 2,4 e 3 ml das soluções 40/70/80% respectivamente, centrifugados a 10.000 x g durante 30 minutos a 25 °C. Após a centrifugação, foi obtida uma banda superior (52) de esquizontes, uma banda

intermediária (interface 70/80%) de trofozoítos maduros, ficando no fundo do tubo os anéis e as hemácias não-infectadas (53). Cada banda foi separada e lavada três vezes com uma solução tampão contendo 30 mM de Na_2HPO_4 , 6 mM de KH_2PO_4 , pH 7,4, 120 mM de NaCl (PBS). As hemácias não-infectadas na fase anel foram eliminadas por tratamento com saponina 1% em PBS e os parasitas foram lavados três vezes com tampão PBS. Os volumes de células de cada estágio foram quantificados e congelados em N_2 líquido para sua posterior análise.

3.4 Marcações metabólicas

Culturas de *P. falciparum* com pelo menos 20% de parasitemia e sincronizadas no estágio trofozoíta jovem foram marcadas com [1-(n)- ^3H] geranilgeranil pirofosfato (atividade específica 16,5Ci/mmol e concentração 3,125 $\mu\text{Ci/ml}$) durante 12 horas. Após o tratamento, foram separados pelo gradiente de Percoll e congelados em N_2 líquido até a utilização (54).

3.5 Extração de MQ, PhQ e UQ

3.5.1 Protocolo I

Utilizamos uma metodologia que extrai, simultaneamente, UQ, MQ e PhQ. Após marcação metabólica com [1-(n)- ^3H] geranilgeranil pirofosfato e separação por gradiente descontínuo de Percoll, cerca de $1,5 \times 10^9$ esquizontes (300 μl), foram utilizados para extração. Parasitas foram homogeneizados em uma solução de 3 ml gelado de 0,2 M HClO_4 em metanol que proporciona o rompimento das hemácias, em seguida foi adicionado éter de petróleo, misturado em um *vórtex* e então centrifugado (2000 x g, 10 min) (15). O sobrenadante foi seco em pressão de nitrogênio, ressuscitado com solvente metanol/etanol (1:1 v/v) e, posteriormente filtrado em membrana de 0,22 μm . O extrato final (250 μl) foi injetado no RP-HPLC.

3.5.2 Protocolo II

O segundo protocolo para a extração de MQ e PhQ, foi baseado na metodologia proposta por Gueguen e colaboradores (55). Em $1,5 \times 10^9$ de esquizontes (300 μL), marcados metabolicamente com [1-(n)- ^3H] geranilgeranil pirofosfato e separados por gradiente descontínuo de Percoll, foi adicionado 1 mL de água deionizada, em um tubo de vidro Corex (Du PontTM,

USA) de 18 ml. Para a lise das células foi utilizado um disruptor de células e as proteínas foram precipitadas pela adição de 200 μ L etanol-0,01% hidroxitolueno butilado (BHT). Em seguida foram homogeneizados por 1 min e 2 mL de n-hexano-0,01% BHT foi adicionado. A amostra foi homogeneizada por mais 1 min e centrifugada a 2700 $\times$ g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e evaporado em corrente de nitrogênio a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensão em 250 μ L da fase móvel da cromatografia e submetido à purificação por RP-HPLC (55).

3.6 Cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa (RP-HPLC)

3.6.1 Protocolo I

Padronizamos um sistema de purificação (15) das moléculas de MQ, PhQ e UQ para avaliação comparativa entre elas. O sistema utilizado para as separações de MQ, PhQ e UQ foi um sistema isocrático equipado com uma coluna *Phenomenex Luna C₁₈* (250mm $\times$ 4,6mm $\times$ 5 μ m) (*Phenomenex*, CA, USA) como fase estacionária, com pré-coluna, um detector UV Gilson 152/UV-visível e um coletor de frações FC203B. O *software* utilizado para o processamento dos dados foi o *Unipointtm LC 3.0 System Software*.

Sistema isocrático com fase móvel metanol:etanol (50:50 v/v), fluxo de 0,5 ml/min, a detecção foi realizada pelo espectro de absorção UV em comprimento de onda de 270 nm para UQ, PhQ e MQ (15). As fases móveis foram filtradas em membrana de PTFE de 0,20 μ m.

As frações radioativas, provenientes dos estágios esquizonte marcados metabolicamente foram secas por evaporação em capela a temperatura ambiente e ressuspensas em líquido de cintilação. A quantificação da radioatividade (c.p.m) foi realizada no aparelho *Beckman 5000 β -radiation scintillation counter* (*Beackman*, CA, USA).

3.6.2 Protocolo II

O segundo sistema eficiente para purificar MQ e PhQ consistiu-se de sistema de gradiente linear, com fase móvel solvente A metanol e solvente B acetonitrila começando com 50/50% (A/B) e terminando em 28min a 30/70% (A/B) em fluxo de 1 mL/min. O comprimento de onda monitorado foi de 290 nm (56). A fase móvel foi filtrada em uma membrana de PTFE (solvente A) e NYLON (solvente B) de 0,20 μ m.

As frações radioativas, provenientes dos estágios esquizonte marcados metabolicamente, foram secas por evaporação em uma capela a temperatura ambiente e ressuspensas em líquido de cintilação. A quantificação da radioatividade (c.p.m) foi realizada no aparelho *Beckman 5000 β -radiation scintillation counter* (Beckman, CA, USA).

3.7 Ensaios de inibição *in vitro* de parasitas intraeritrocíticos mantidos em culturas sincrônicas de *P. falciparum* pela droga Ro 48-8071

3.7.1 Determinação da IC₅₀ de Ro 48-8071

Utilizamos o método de Desjardins et. al. (57) para determinação da concentração inibitória da droga Ro 48-8071 (derivada de amino alquoxi difenilmetano, que inibe a enzima que prenha o anel naftoato para formar dimetilmenaquinona) que inibe 50% dos parasitas em 48 horas. Iniciamos os tratamentos no estágio anel, realizando os testes em microplacas de 96 poços, por 96 horas. O controle da parasitemia foi realizado com a verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa. Foram usadas dez concentrações diferentes de Ro 48-8071 que variavam entre 500 nM a 200 μ M mais dois controles: i) sem adição da droga e ii) somente o solvente DMSO. Foi preparada uma solução estoque da droga em DMSO e posteriormente, diluída seriadamente em meio de cultura até as concentrações desejadas. Todos os experimentos foram realizados pelo menos em duplicata.

3.7.2 Recuperação *in vitro* de parasitas mantidos em culturas sincrônicas de *P. falciparum* tratadas com a droga Ro 48-8071 e suplementadas com MQ ou PhQ

Os parasitas mantidos em cultivo *in vitro* foram tratados com o valor de IC₅₀ previamente obtido para Ro 48-8071, adicionando-se, simultaneamente, diferentes concentrações de MQ-4 (Sigma-Aldrich, Brasil) ou PhQ exógenas. As soluções estoque de MQ-4 e PhQ foram preparadas em etanol, sendo posteriormente diluídas em meio de cultura.

Inicialmente realizamos experimentos para determinar a concentração ideal (não tóxica ao parasita) de MQ-4 ou PhQ exógena à cultura que não inibisse o desenvolvimento dos parasitas. Submetemos a cultura de parasitas ao tratamento com o valor de IC₅₀ obtido de Ro 48-8071 por 48 horas e, simultaneamente, adicionamos MQ-4 nas concentrações que variavam entre 400 μ M a 3 nM, ou PhQ nas concentrações que variavam entre 500 μ M a 5 μ M. Iniciamos os

tratamentos no estágio anel, realizando os testes em microplacas de 96 poços, por 48 horas. O controle da parasitemia foi realizado com a verificação microscópica de esfregaços corados com Giemsa. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.7.3 Marcação metabólica e purificação de parasitas tratados com a droga Ro 48-8071 após 48 horas

Culturas sincrônicas de *P. falciparum* na fase esquizonte foram tratadas por 36 horas com o valor de IC₅₀ obtido de Ro 48-8071 e, posteriormente marcadas metabolicamente com [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato por 12 horas, na presença da droga. Após a marcação, separamos por gradiente descontínuo de Percoll, a fração de esquizontes, cerca de $1,5 \times 10^9$ parasitas (300 µl), submetemos à extração descrita no item 2.5.1 (Protocolo I) (15). O mesmo procedimento foi realizado com culturas de parasitas não tratados com a droga. O sobrenadante foi seco em pressão de N₂, ressuspenso em solvente metanol/etanol (1:1 v/v) e, posteriormente, filtrado em membrana de 0,22µm. A partir da solução final obtida, 250 µl, com seu respectivo controle, foram purificadas por RP-HPLC (Protocolo I) (15).

As frações, provenientes das amostras controle e tratada, foram coletadas e a radioatividade contada com descrito no item 3.6.1. Frações correspondentes ao mesmo tempo de retenção dos padrões de UQ, MQ-4 e PhQ foram analisadas. Para determinar a significância estatística das possíveis alterações na biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ, em parasitas tratados em relação aos parasitas controle, realizamos uma média na diferença entre as contagens da radioatividade do tratado em relação ao controle, entre os três experimentos realizados. Utilizamos o programa One-way ANOVA.

3.8 Condições de O₂ na cultura *in vitro* de *P. falciparum*

Para experimentos em condições de anaerobiose, cultivamos os parasitas em uma atmosfera sem oxigênio (5% CO₂, 95% N₂). Inicialmente cultivamos os parasitas durante dez dias em anaerobiose para avaliar o crescimento dos parasitas nestas condições. Uma vez que não foi constatada diferença morfológica e na parasitemia, comparamos o perfil de biossíntese de MQ/UQ em parasitas mantidos em anaerobiose aos dos parasitas mantidos em condições normais de cultivo (5% O₂). Para os experimentos que especulavam uma provável participação de PhQ

como protetora antioxidante, cultivamos os parasitas por 48 horas em condições de estresse oxidativo (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂).

3.9 Extração e purificação por RP-HPLC de UQ, MQ e PhQ de parasitas mantidos em condições de anaerobiose

Submetemos os parasitas ao cultivo em anaerobiose (5% CO₂, 95% N₂) por 24, 48 e 72 horas. Culturas sincrônicas de *P. falciparum* na fase de trofozoíta foram mantidas por 12 horas em condições de anaerobiose, culturas na fase de esquizonte foram mantidas por 36 horas em condições de anaerobiose e culturas na fase anel foram mantidas por 60 horas em condições de anaerobiose. Em paralelo, as mesmas fases de parasitas foram mantidas em condições normais de cultura, como controle. Após este período, todas as culturas foram marcadas metabolicamente com [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato por 12 horas, em anaerobiose. Após a marcação, separamos por gradiente descontínuo de Percoll, as frações de esquizontes, cerca de 1,5 x 10⁹ de parasitas (300 µl) por fração, foram submetidas à extração descrita no item 2.5.1 (Protocolo I) (15). O sobrenadante foi seco em pressão de N₂, ressuspenso em solvente metanol/etanol (1:1 v/v) e, posteriormente, filtrado em membrana de 0,22µm. A partir da solução final extraída em cada período de tratamento com seus respectivos controles, 250 µl de amostra foi injetada e purificada por RP-HPLC (protocolo I) (15).

As frações, provenientes de amostras de parasitas mantidos por diferentes períodos em anaerobiose com seus respectivos controles, foram coletadas e a radioatividade medida como descrito no item 3.6.1 e o perfil cromatográfico analisado. A significância estatística das possíveis alterações na biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ, foi determinada como descrito no item 3.7.3.

3.10 Perfil da biossíntese de MQ, PhQ e UQ de parasitas de *P. falciparum* em condições normais de cultura após 48 horas em anaerobiose

Após cultivo dos parasitas por 48 horas em anaerobiose, retornamos os parasitas por 36 horas em condições normais de cultivo e os marcamos metabolicamente com [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato por 12 horas, permanecendo em condições normais. Após a marcação, separamos os estágios por gradiente descontínuo de Percoll, a fração de esquizonte, cerca de 1,5

x 10^9 parasitas (300 μ l), submetemos à extração descrita no item 2.5.1 (Protocolo I) (15). O extrato obtido de controle e tratado (250 μ l) foi analisado por RP-HPLC (Protocolo I) (15).

As frações foram coletadas e a radioatividade medida como descrito no item 3.6.1. As frações correspondentes aos tempos de retenção dos padrões UQ, MQ-4 e PhQ foram analisadas. A significância estatística das possíveis alterações na biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ, foi determinada como descrito no item 3.7.3.

3.11 Determinação da IC₅₀ da droga Ro 48-8071 em parasitas de *P. falciparum* mantidos em anaerobiose

Tratamos os parasitas, mantidos em condições de anaerobiose (5% CO₂, 95% N₂), com a droga (Ro 48-8071), nas concentrações que variavam entre 500 nM a 20 μ M, por 48 horas. Iniciamos o tratamento no estágio anel, realizando os testes em microplacas de 96 poços, por 96 horas, o controle da parasitemia foi realizado com a verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.12 Reação enzimática para verificar a provável função da MQ como transportadora de elétrons na cadeia respiratória em *P. falciparum*

Eritrócitos infectados com formas na fase esquizonte foram lisados com 0,15% de saponina em um tampão fosfato-salino (1,76 mM K₂HPO₄, 8,0 mM Na₂HPO₄, pH 7,4; 137 mM de NaCl, 2,7 mM KCl, 5,5 mM de D-glicose,) por 5 minutos, seguido por três lavagens, ressuspensos em meio RPMI, obtendo cerca de 8×10^9 parasitas. O extrato de parasitas foi preparado por congelamento e descongelamento, repetido 3 vezes, em N₂ líquido, seguido por ruptura em desruptor de células (sonicador). A atividade enzimática foi quantificada em uma solução tamponada contendo 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM KCN, e atovaquona (10 μ M) com Q1 (CoQ1). KCN e atovaquona foram adicionados para evitar o fluxo de elétrons através do sistema citocromo (complexos III e IV) e, 600 μ M de NADH foi utilizada para oxidação. A reação foi iniciada com a adição do extrato bruto de parasitas (cerca de 500 μ g de proteína), a atividade foi monitorada por espectrofotômetro acompanhando a diminuição da absorbância a 340 nm (NADH ϵ = 6,22 mM) (48). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.13 Avaliação do perfil de transcrição dos genes provavelmente envolvidos na via de biossíntese de MQ/UQ em parasitas mantidos em anaerobiose

Inicialmente foram realizadas análises *in silico* no banco de dados *PlasmodDB* (www.plasmodb.org) para busca de seqüências/genos relacionados(as)/envolvidos(as) na via de biossíntese de vitamina K. Essas análises foram feitas pelo técnico de nosso Departamento Márcio Masayama (Tabela 1). Desta forma, foram desenhados quatro pares de oligonucleotídeos que amplificam os transcritos que codificam as enzimas MenA, MenB, MenG e UQ utilizando o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), todos os oligonucleotídeos amplificaram com o mesmo desempenho em relação ao gene do controle interno (± 1 Ct), seril-tRNA sintetase (PF07_0073 [27]). Utilizamos a sincronização dos parasitas através da flotação por plasmagel (51), seguido de sincronização por sorbitol. Desta maneira cultivamos os parasitas sincrônicos em condições de anaerobiose por 48 horas, obtendo frações de anéis, trofozoítas e esquizontes com cerca de 80% de sincronização em cada estágio, posteriormente retornamos os parasitas às condições normais de cultivo por mais 48 horas como controle da especificidade fenotípica dos resultados obtidos. Os parasitas foram lisados com saponina 1% em PBS seguidos de três lavagens e ressuspensos em meio RPMI. Os RNAs totais foram extraídos utilizando Trizol (Invitrogen), precipitados com isopropanol e posteriormente lavados com etanol 70%, ressuspensos em água e estocados a -80°C até o momento do uso. As concentrações de RNA foram estimadas a partir da medida de absorbância a 260 nm, utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop*. Uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde aproximadamente a 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA. Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1 μg de RNA total, os quais foram tratados 3 vezes com DNase (Fermentas) e, posteriormente submetidos a transcrição reversa utilizando a enzima *MuLV-Reverse transcriptase* (Fermentas). Os ensaios de PCR quantitativo foram realizados utilizando o *mix SYBR Green* (Biotools) na máquina de PCR modelo *Realplex2 thermocycler* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) (58). Todas as reações foram realizadas em triplicatas e os valores das triplicatas (valores de Ct) foram praticamente idênticos. A sigla Ct vem do inglês *crossing threshold*, que significa o ciclo da PCR onde a reação ainda está em fase exponencial, onde o *amplicon* está começando a ser detectado. Para todas as reações foram analisadas as curvas de dissociação dos oligonucleotídeos, onde cada par de oligonucleotídeos apresenta uma temperatura específica, caracterizando a especificidade dos produtos obtidos. O

ΔCt para cada par de oligonucleotídeos foi determinado individualmente subtraindo-se o valor de Ct medido para o gene alvo menos o valor de Ct do controle *seril-tRNA synthetase*. A expressão relativa de mRNA foi então obtida pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (59). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos construídos pelo programa *Primer3* para comparação do perfil de transcrição de genes/seqüências provavelmente envolvidas nas vias de biossíntese de MQ e UQ em análises por *Real Time-PCR*.

Gene	PlasmoDB ID	Primers	Coordenadas de amplificação
3-demetilubiquinona-9 3-metiltransferase-like protein	MAL7p1.130	F: 5'-TGACGAAAAACACCTTGTTG-3' R: 5'-GTCCCCTTCTTCATCATTCG-3'	721-806
MenB	PF10_0167	F: 5'- TTCGCCTTAACAGGTCAGGT-3' R: 5'-TTCCAACTTTCATCAGATATCCA-3'	672-753
MenA	PFF0370w	F: 5'-TCTCGACAAGGTATCCTTAAACG-3' R: 5'-ACCACCTGGGAAGCCTTACT-3'	1387-1513
MenG	PF11_0284	F: 5'-CGCCATGTAAAAGAAAATATCG-3' R: 5'-TGGAAAATGTAACTCCAATCAA-3'	8-91

3.14 Provável papel de PhQ no ciclo intraeritrocitário de *P. falciparum*

3.14.1 Extração e purificação por HPLC de parasitas submetidos a estresse oxidativo

Cultivamos os parasitas em atmosfera de estresse oxidativo (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) por 48 horas. Culturas sincrônicas de *P. falciparum* no estágio de esquizonte foram cultivadas por 36 horas em condições de estresse oxidativo, posteriormente marcadas metabolicamente com [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato por 12 horas, sob cultivo de estresse oxidativo. Parasitas mantidos em condições normais de cultivo foram marcados metabolicamente como controle. Após a marcação, separamos por gradiente descontínuo de Percoll, a fração de esquizonte, cerca de $1,5 \times 10^9$ parasitas (300 µl), foi submetida à extração descrita no item 2.5.2 (Protocolo II) (55). O sobrenadante foi seco em pressão de N₂, ressuspenso em solvente metanol e, posteriormente, filtrado em membrana de 0,22µm. Extrato de parasitas controle e tratado (250 µl) foi purificado por RP-HPLC (Protocolo II) (56).

As frações foram coletadas e a radioatividade medida como descrito no item 3.6.1. As frações correspondentes aos tempos de retenção dos padrões de MQ-4 e PhQ foram analisadas. A significância estatística das possíveis alterações na biossíntese de MQ-4 e PhQ, foi determinada como descrito no item 3.7.3.

4 RESULTADOS

4.1 Cromatografia líquida de alto desempenho (RP-HPLC) para análise do perfil de biossíntese de MQ, PhQ e UQ

Foi padronizado o sistema de cromatografia líquida, sistema isocrático metano:etanol (50:50 v/v) (Protocolo I), o qual mostrou ser eficiente para a resolução e comparação de UQ, MQ e PhQ (tempo de retenção de 9min, 14min e 19min, respectivamente– **Figura 6**).

Extrato de $1,5 \times 10^9$ de esquizontes metabolicamente marcados com precursor radioativo ([1-(n)- ^3H] geranilgeranil pirofosfato) por 12 horas, separados por gradiente descontínuo de Percoll, seguida de extração com ácido perclórico e éter de petróleo (Protocolo I) foram submetidos à purificação por RP-HPLC (15). O perfil de radioatividade, das frações coletadas após o RP-HPLC, está demonstrado na **Figura 6**, onde as frações radioativas correspondentes aos tempos de retenção dos padrões UQ, MQ-4 e PhQ estão destacadas. Confirmamos por outro método cromatográfico, a presença da biossíntese de MQ-4 e PhQ nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*.

Figura 6. Perfil de biossíntese de MQ-4, PhQ e UQ no estágio de esquizonte. Extrato dos parasitas marcados metabolicamente com [1-(n)- ^3H] geranilgeranil pirofosfato submetidos à extração (Protocolo I) com ácido perclórico/éter de petróleo, foram purificados por RP-HPLC (Protocolo I). As frações foram coletadas em intervalos de 0,5 ml/min. Demonstração da presença de frações radioativas coincidentes aos padrões de UQ - fração 10; MQ - fração 14; PhQ - fração 19; não identificado - fração 24.

O segundo sistema para eluição de MQ-4 e PhQ que consistiu de sistema de gradiente linear (Protocolo II), foi posteriormente padronizado em nosso grupo, mostrando alta eficiência para separação de MQ (12min) e PhQ (27min).

4.2 Ensaio de inibição *in vitro* de culturas sincrônicas de *P. falciparum*

Iniciamos uma colaboração com o Dr. Dean Crick (*Department of Microbiology, Immunology and Pathology Colorado State University, Campus Delivery Ft. Collins, USA*) que vem desenvolvendo compostos de ação inibitória específica contra a enzima 1,4-dihidroxí-2-naftoato preniltransferase da via de biossíntese de MQ em *Mycobacterium tuberculosis* (60). Ele nos cedeu o composto denominado Ro 48-8071. A Ro 48-8071 é derivada de amino alquoxi difenilmetano, que inibe a enzima que prenila o anel naftoato para formar dimetilmenaquinona, sendo, este então, metilado por uma metiltransferase (produto do gene MenG) para formar MQ (60) (**Figura 7**).

Figura 7. Representação dos intermediários da via de biossíntese de MQ. Respectivas enzimas, mostrando o local de inibição da droga Ro 48–8071.

Utilizamos o método de *Desjardins* e colaboradores (57) para determinação da concentração inibitória da droga Ro 48-8071, a qual inibe 50% dos parasitas em uma cultura sincrônica (valor de IC₅₀ – 4,5µM), em 48 horas (**Figura 8**).

Figura 8. Determinação de IC₅₀ da droga Ro 48-8071 em culturas sincrônicas de *P. falciparum*. 48 horas de tratamento com dez das concentrações diferentes de Ro 48 - 8071 (entre 0 a 20 µM). A concentração inibitória de 50% foi de 4,5µM (valor de IC₅₀). O controle da parasitemia foi realizado por meio de verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa.

4.2.1 Recuperação *in vitro* de culturas sincrônicas de *P. falciparum* tratadas com a droga Ro 48-8071, com adição simultânea de MQ ou PhQ exógena

Inicialmente realizamos experimentos para determinar a concentração ideal (não tóxica ao parasita) de MQ-4 à cultura que não inibe o desenvolvimento dos parasitas. Concentrações de MQ-4 (Sigma-Aldrich, Brasil) que variaram entre 400 µM a 15 nM foram adicionadas à cultura em microplacas, por 96 horas com verificação diária de esfregaços corados com Giemsa. Somente as concentrações abaixo de 15 nM não se mostraram tóxicas aos parasitas.

Parasitas no estágio de anel foram tratados por 48 horas com 4,5µM (valor de IC₅₀) de Ro 48-8071, com adição simultânea de diferentes concentrações de MQ-4 que variavam entre 50 µM a 3 nM.

Quando adicionamos MQ-4 simultaneamente ao tratamento com Ro 48-8071 não observamos a esperada recuperação no desenvolvimento dos parasitas. Curiosamente, MQ-4

mostrou-se tóxica para *P. falciparum* em concentrações na ordem de nanomolar. Entretanto, quando se adicionou MQ-4, em concentrações não tóxicas ao parasita (15 nM por exemplo), simultaneamente ao tratamento com 4,5 μ M de Ro 48-8071 (valor de IC₅₀) observou-se uma inibição na parasitemia acima de 50% (**Figura 9**), ou seja, MQ-4 aparentemente potencializa a ação da droga.

Concentrações de MQ-4 que se mostravam tóxicas para o crescimento do parasita, também foram utilizadas nesse experimento, pois, as concentrações não tóxicas, não mostraram resultados satisfatórios.

Figura 9. Teste de recuperação através de adição de MQ-4 em parasitas sob tratamento com Ro 48-8071. 48 horas de tratamento de parasitas em culturas sincrônicas de *P. falciparum* com 4,5 μ M de Ro 48-8071 (valor de IC₅₀) e/ou adição de algumas das concentrações testadas de MQ-4 (1 μ M, 250 nM, 15 nM).

Tentamos realizar experimentos semelhantes, aos descritos acima, mas adicionando PhQ ao meio de cultura. Inicialmente realizamos experimentos para determinar a concentração ideal (não tóxica ao parasita) de PhQ exógena à cultura. Concentrações de PhQ que variavam entre 500 μ M a 5 μ M foram adicionadas a cultura de *P. falciparum*, por 96 horas. Nenhuma concentração de PhQ adicionada ao meio de cultura mostrou-se tóxica aos parasitas.

Parasitas em estágio anel foram tratados por 48 horas com 4,5 μ M (valor de IC₅₀) de Ro

48-8071 e simultaneamente adicionou-se diferentes concentrações de PhQ que variavam entre 500 μ M a 5 μ M.

Quando adicionamos PhQ simultaneamente ao tratamento com Ro 48-8071, também não observamos a recuperação no desenvolvimento dos parasitas (**Figura 10**), embora o parasita parece tolerar PhQ em concentrações na ordem de micromolar.

Figura 10. Teste de recuperação através de adição de PhQ em parasitas sob tratamento com Ro 48-8071. 48 horas de tratamento de parasitas em culturas sincrônicas de *P. falciparum* com 4,5 μ M de Ro 48-8071 (valor de IC₅₀) e/ou adição de algumas das concentrações testadas de PhQ (500 μ M, 50 μ M e 5 μ M).

4.2.2 Efeito da droga Ro 48-8071 na biossíntese de MQ, PhQ e UQ em parasitas de *P. falciparum*

A fim de observarmos o efeito na biossíntese de MQ-4 em parasitas tratados com a Ro 48-8071, $1,5 \times 10^9$ de esquizontes, separados por gradiente descontínuo de Percoll, tratados por 48 horas com 4,5 μ M de Ro 48-8071 metabolicamente marcados com precursor radioativo ([1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato) por 12 horas, foram extraídos com ácido perclórico e éter de petróleo (Protocolo I) (15), seguidos de purificação por RP-HPLC (Protocolo I).

Os perfis cromatográficos obtidos, após a contagem radioativa das frações purificadas por RP-HPLC, apresentaram uma inibição de $88.2 \pm 11\%$ na biossíntese de MQ-4 em relação aos parasitas controle (não tratados). Também foi observado um aumento de $30 \pm 5\%$ na biossíntese de

UQ nos parasitas tratados em relação ao controle, enquanto que não houve diferença significativa no perfil de biossíntese de PhQ (**Figura 11**). Esses dados mostram que a droga aparentemente inibe uma enzima específica da via de biossíntese de MQ-4, uma vez que a biossíntese de PhQ não se mostrou alterada. Também podemos observar que existe um aumento na biossíntese de UQ quando a biossíntese de MQ-4 está diminuída.

Figura 11. Efeito de Ro 48-8071 sobre a biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Parasitas marcados metabolicamente com [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato, submetidos à extração com ácido perclórico/éter de petróleo e purificados por *RP-HPLC* na coluna *C₁₈* em sistema isocrático: metanol:etanol 50:50 por 35 min. As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min. As frações analisadas correspondem aos tempos de retenção dos padrões: ubiquinona – 10min; menaquinona – 14min; e filoquinona – 19min.

4.3 Condição de anaerobiose no cultivo *in vitro* de *P. falciparum*

Para verificar se a biossíntese de MQ-4 está aumentada em anaerobiose, assim como é descrito em *E. coli* e *A. sunn*, cultivamos os parasitas em anaerobiose (5% CO₂, 95% N₂) durante 10 dias a fim de avaliar o desenvolvimento dos parasitas comparados aos parasitas controle (5% O₂) para posterior análise do perfil de biossíntese de MQ-4/UQ em parasitas mantidos nessas condições de aeração.

Ao final deste período de teste, observamos crescimento normal dos parasitas em anaerobiose comparados aos parasitas controle (mantidos a 5%O₂), evidenciando provável adaptação do parasita a condição de anaerobiose.

4.3.1 Perfil da biossíntese de MQ, PhQ e UQ em parasitas mantidos em anaerobiose comparados aos parasitas mantidos em condições normais

1,5 x 10⁹ de esquizontes, separados por gradiente descontínuo de Percoll, mantidos em condições de anaerobiose por 24, 48 e 72 horas, metabolicamente marcados com precursor radioativo ([1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato) por 12 horas, extraídos com ácido perclórico e éter de petróleo (Protocolo I) (15), foram submetidos à purificação por RP-HPLC (Protocolo I).

Através das análises dos perfis cromatográficos obtidos, após a contagem radioativa das frações obtidas purificadas por RP-HPLC, conseguimos mostrar que a diferença na biossíntese de MQ-4 foi mais significativa após 48 horas em condições de anaerobiose (**Figura 12**), a biossíntese de MQ-4 aumentou 50 ± 5% comparado aos parasitas controle, enquanto que a biossíntese de UQ diminuiu 15 ± 3% e, não houve diferenças na biossíntese de PhQ. Parasitas cultivados por 24 horas em anaerobiose, observamos um aumento de 33 ± 4% na biossíntese de MQ-4 e queda de 24 ± 2% na biossíntese de UQ, não ocorrendo, novamente, nenhuma diferença na biossíntese de PhQ comparando-se aos parasitas controle. Em parasitas mantidos 72 horas em anaerobiose, observamos somente diferença na biossíntese de MQ-4, com um aumento de 21 ± 3% comparado aos parasitas em condições normais de cultivo.

Figura 12. Efeito da condição de anaerobiose na biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*: Parasitas marcados metabolicamente com [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato, submetidos à extração com ácido perclórico/éter de petróleo e purificados por *RP-HPLC* em sistema isocrático: metanol:etanol 50:50. As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min. As frações analisadas correspondem aos tempos de retenção dos padrões: ubiquinona – 10min; menaquinona – 14min; e filoquinona – 19min. A) 24 horas em condições anaeróbicas; B) 48 horas em condições anaeróbicas; C) 72 horas em condições anaeróbicas.

4.3.2 Perfil de biossíntese de MQ, PhQ e UQ após restabelecimento da condição normal de cultura

Com o objetivo de observar se os parasitas cultivados por 48 horas em condições de anaerobiose, quando retornados à condição normal de cultivo, mudariam novamente o perfil de biossíntese de UQ e MQ-4, $1,5 \times 10^9$ de esquizontes, separados por gradiente descontínuo de

Percoll, cultivados 48 horas em anaerobiose e retornados ao cultivo normal (5% O₂) por mais 48 horas (**Figura 13**), metabolicamente marcados com precursor radioativo ([1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato) por 12 horas, extraídos com ácido perclórico e éter de petróleo (Protocolo I) (15), foram submetidos à purificação por RP-HPLC (Protocolo I).

Através das análises dos perfis cromatográficos obtidos, após a contagem radioativa das frações purificadas por RP-HPLC, observamos que os parasitas após serem mantidos em condições de anaerobiose por 48 horas e retornados ao cultivo normal (5% O₂) por mais 48 horas, apresentaram restabelecimento na biossíntese de UQ e MQ-4 comparando-se aos parasitas mantidos em condições normais de cultivo.

Figura 13. Efeito do restabelecimento das condições de oxigenação normais pós-manutenção em anaerobiose na biossíntese de UQ, MQ-4 e PhQ. Os parasitas foram mantidos em condições de anaerobiose por 48 horas, posteriormente retornados às condições normais de cultivo (5% O₂) por mais 48 horas, marcados metabolicamente com [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato, submetidos à extração com ácido perclórico/éter de petróleo e purificados por RP-HPLC em sistema isocrático:metanol:etanol v:v. As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min. As frações analisadas correspondem aos padrões: ubiquinona – 10min; menaquinona – 14min; e filoquinona – 19min.

4.3.3 Determinação de IC₅₀ da droga Ro 48-8071 em culturas sincrônicas de *P. falciparum* cultivados sob condições anaeróbicas

Uma vez que observamos um aumento de 50% na biossíntese de MQ em parasitas cultivados em anaerobiose, fomos avaliar se havia uma mudança no valor da IC₅₀ da droga nestas condições. Tratamos os parasitas cultivados em condições anaeróbicas com diferentes concentrações da droga Ro 48-8071 que variaram entre 500 nM a 20 µM.

Obtivemos os mesmos resultados de inibição, promovidos pela droga, no crescimento dos parasitas, comparados aos parasitas cultivados em condições normais de cultivo (**Figura 14**). O valor de IC₅₀ (4,5µM) não variou daquela encontrada para parasitas cultivados em condições normais.

Figura 14. Microteste com Ro 48-8071 em parasitas mantidos em condições normais de cultivo comparado aos parasitas mantidos em anaerobiose. 48 horas de tratamento de culturas sincrônicas de *P. falciparum* com dez das concentrações de Ro 48 – 8071 (0 a 20 µM). A concentração inibitória de 50% foi de 4,5µM (valor de IC₅₀). O controle da parasitemia foi feito com a verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa.

4.4 Reação enzimática para verificar a provável função da MQ como transportadora de elétrons na cadeia respiratória de *P. falciparum*

Através dos ensaios de NADH:ubiquinona oxidoreductase descritos na literatura (48), tentamos demonstrar uma provável participação da MQ-4 na cadeia respiratória de *P. falciparum*, como aceptora de elétrons,.

Cerca de 8×10^9 de parasitas, foram utilizados nos ensaios para determinarmos a reação de oxidação do NADH tendo a MQ como aceptora de elétrons no complexo II da cadeia respiratória em extrato de *P. falciparum*. A reação foi funcionalmente isolada de outros complexos respiratórios pela ação de atovaquona e cianeto, inibidores dos complexos III e IV respectivamente. A reação utilizando a MQ-4 como aceptora de elétrons demonstrou o valor de K_m 74 μ M, demonstrando uma menor afinidade ao substrato comparada à reação tendo como acceptor de elétrons a UQ (K_m 15 μ M) (48). O mesmo valor de K_m para MQ-4 como aceptora de elétrons na cadeia respiratória de *P. falciparum* foi obtido utilizando parasitas mantidos em anaerobiose. A atividade foi sensível ao difenileno-iodônio (DPI) inibidor da enzima NADH tipo II:quinona oxidoreductase (PfNDH2) do complexo I alternativo presente na cadeia de *P. falciparum* (61-64). Observou-se inibição dose-dependente com a adição de difenileno-iodônio (DPI) tendo a MQ como aceptora de elétrons.

4.5 Avaliação do perfil de transcrição dos genes provavelmente envolvidos na via de biossíntese de MQ/UQ em parasitas mantidos em anaerobiose

Investigamos se o perfil de transcrição, dos genes que supostamente codificam as enzimas da via de biossíntese de MQ/UQ, seria influenciado pela concentração de oxigênio durante o cultivo.

Cultivamos parasitas altamente sincrônicos em condições de anaerobiose por 48 horas, obtendo frações de anéis, trofozoítas e esquizontes com cerca de 80% de sincronização em cada estágio, posteriormente retornamos os parasitas às condições normais de cultivo por mais 48 horas como controle da especificidade fenotípica dos resultados obtidos. Os RNAs totais foram extraídos e por meio das análises de PCR quantitativo não observamos diferença na transcrição dos prováveis genes envolvidos na via de UQ/MQ em condições de anaerobiose (**Figura 15**).

Nossos resultados mostram também que a transcrição da maioria desses prováveis genes da via de UQ/MQ se mantém estáveis no decorrer do ciclo intraeritrocitário.

Figura 15. Perfil de transcrição dos genes provavelmente envolvidos na via de biossíntese de MQ e UQ em parasitas mantidos sob condições de anaerobiose. Tempo inicial pré-tratamento (primeira linha); 48 horas em anaerobiose (segunda linha); 48 horas retornados ao cultivo normal após 48 horas em cultivo anaeróbico (terceira linha). Primeira coluna: Anel; Segunda coluna: Trofozoíta; Terceira coluna: Esquizonte. Os respectivos RNAs foram extraídos pelo método de Trizol (Invitrogen). Os ensaios foram realizados no *Realplex2thermocycler* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Todas as reações foram realizadas em triplicata. A:UQ; B:MenB; C:MenA; D:MenG.

4.6 Perfil da biossíntese de PhQ e MQ em parasitas de *P. falciparum* cultivados em condições de estresse oxidativo

Quando mantidos em uma atmosfera com 20%O₂ por 48 horas, considerada uma condição de estresse oxidativo, os parasitas de *P. falciparum* apresentam crescimento normal, através da verificação diária de esfregaços corados com Giemsa. Entretanto, nestas condições foram observadas alterações na biossíntese de produtos que podem ter ação antioxidante no parasita, como os carotenóides (32)

Para a avaliação de uma possível alteração na biossíntese de PhQ em condições de estresse oxidativo, 1,5 x 10⁹ de esquizontes, separados por gradiente descontínuo de Percoll, mantidos numa atmosfera de estresse oxidativo (20% O₂) por 48 horas metabolicamente marcados com precursor radioativo ([1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato) por 12 horas, extraídos com 2 mL de n-hexano-0,01% BHT (Protocolo II) (55), foram submetidos à purificação por RP-HPLC (Protocolo II).

Através das análises dos perfis cromatográficos obtidos, após a contagem radioativa das frações purificadas por RP-HPLC, os experimentos demonstraram que a biossíntese de PhQ em parasitas mantidos 48 horas sob condições de estresse oxidativo, aumentou em 41±5% se comparada a biossíntese em parasitas sob condições normais de cultivo (**Figura 16**) e, não houve diferença significativa em relação à biossíntese de MQ-4 nessas condições, comparada aos parasitas controle.

Figura 16. Efeito da condição de estresse oxidativo (20% O₂) na biossíntese MQ-4 e PhQ nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*: Parasitas marcados metabolicamente com [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato, submetidos à extração com n-hexano e purificados por *RP-HPLC* em sistema gradiente: fase móvel solvente A metanol e solvente B acetonitrila. As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min. As frações analisadas correspondem aos tempos de retenção dos padrões: menaquinona – 12min e filoquinona – 27min.

5 DISCUSSÃO

A malária continua sendo uma das principais doenças infecciosas. Os danos econômicos atribuídos à malária classificam esta doença como uma das quatro principais causas da pobreza no mundo, acarretando problemas sócio-econômicos e contribuindo para menor desenvolvimento dos países afetados. A falta de uma vacina eficaz, o problema da resistência aos fármacos e a falta de investimento na procura e aplicação de novos compostos, contribuem para o adiamento da solução do controle desta infecção (8,9). A busca de novos alvos biológicos para o desenvolvimento de antimaláricos eficazes tem se concentrado, em parte, na pesquisa e compreensão de vias metabólicas exclusivas do parasita. Essas vias, como a via -metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) e a via do Chiquimato, não são compartilhadas com os animais e, portanto, excelentes alvos para a produção de novas drogas.

Na última década, nosso grupo caracterizou diversos produtos da biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum*, como dolicois, ubiquinonas e carotenóides (24,25,27-32). A presente dissertação soma-se aos trabalhos anteriormente realizados por nosso grupo, descrevendo, pela primeira vez, a biossíntese, nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*, de ambas formas de vitamina K: filoquinona (PhQ) e menaquinona (MQ-4).

A MQ e a PhQ são biossintetizadas por diferentes organismos. A estrutura básica, entre elas é o anel naftoquinona, proveniente da via do Chiquimato, metilado na posição 2 e uma cadeia lateral, proveniente da via MEP, situada na posição 3.

A biossíntese de vitamina K nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum* foi inicialmente caracterizada por meio de marcações metabólicas com precursor direto [1-(n)-³H] geranilgeranil pirofosfato, da via de biossíntese de PhQ e MQ, seguida dos métodos de extração, purificação por sistemas cromatográficos (TLC, RP-HPLC), adequados para a identificação destes tipos de moléculas e, confirmação por ESI-MS/MS.

Nesse trabalho, como consequência da padronização de metodologia de RP-HPLC que eluísse UQ, PhQ e MQ em um mesmo sistema, confirmamos por mais um sistema cromatográfico a presença das duas formas de vitamina K em *P. falciparum*.

Determinamos o valor de IC₅₀ (4,5 µM) do composto denominado Ro 48-8071 (inibidor da enzima 1,4-dihidroxi-2-naftoato preniltransferase), utilizada inicialmente por Dhiman e colaboradores (2009) para inibir a biossíntese de menaquinona em *Mycobacterium tuberculosis* (60). Observamos que esse composto exerce inibição dose-dependente sobre os estágios intraeritrocitários do parasita. E, essa inibição no crescimento do parasita foi devida a inibição na

biossíntese de MQ-4, embora essa droga também pode inibir outras vias, como a biossíntese de lipídios neutros (65).

Realizamos ensaios de recuperação para avaliar se a adição de MQ-4 ao meio de cultura promoveria o restabelecimento no crescimento dos parasitas inibidos pela ação de Ro 48-8071. A inibição do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium smegmatis* promovida por Ro 48-8071 pôde ser revertida pela adição de MQ ao meio de cultura na concentração de 400 μM (60). Os resultados dos ensaios de recuperação, em *P. falciparum*, não foram satisfatórios, visto que o crescimento dos parasitas não foi restabelecido. Curiosamente, MQ-4 mostrou-se tóxica para o desenvolvimento *in vitro* de *P. falciparum* em concentrações na ordem de nanomolar enquanto *Mycobacterium ssp.* tolera concentrações na ordem de micromolar (60). Quando se adicionou MQ-4, em concentrações não tóxicas ao parasita, simultaneamente ao tratamento com 4,5 μM de Ro 48-8071 (valor de IC_{50}), observou-se uma inibição na parasitemia acima de 50%, provavelmente, MQ-4 pode estar potencializando a ação da droga, embora não haja nenhum relato dessa atividade de MQ em qualquer outro organismo.

Entretanto, quando tratamos os parasitas com Ro 48-8071 em cultivo anaeróbico (condição em que ocorre aumento na biossíntese de MQ-4 em *P. falciparum*), esperávamos que devido ao aumento na biossíntese de MQ-4 pelo parasita, nessas condições, teríamos um aumento no valor de IC_{50} , o que também não ocorreu.

Como em *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium smegmatis* a ação de inibição promovida por Ro 48-8071 pôde ser revertida, também, pela adição de PhQ ao meio de cultura na concentração de 400 μM (60), assim, tentamos obter o resultado desejado adicionando PhQ ao meio de cultura.

Quando adicionamos PhQ simultaneamente ao tratamento com Ro 48-8071, também não observamos a recuperação no crescimento dos parasitas, embora o parasita tolere PhQ em concentrações na ordem de micromolar.

Contrariamente aos resultados descritos para MQ-4, nenhum efeito sobre a biossíntese de PhQ foi observado nos parasitas tratados com Ro 48-8071, indicando que, possivelmente, esse composto não interage com enzimas envolvidas na via de biossíntese de PhQ, embora nossas análises bioquímicas sugerem a presença da via metabólica para a biossíntese de PhQ, semelhante à descrita em bactérias, apesar de pouco ainda ser o conhecimento dessa via de biossíntese em plantas (38).

Como também em condições de anaerobiose não encontramos nenhuma diferença significativa na biossíntese de PhQ se comparados aos parasitas em condições normais de cultivo, inicialmente, especulamos que a PhQ seria um resquício evolutivo, pois como *P. falciparum* tem a organela, apicoplasto, resultante de endossimbiose secundária dos eucariotos fotossintéticos, a biossíntese de PhQ poderia ser um vestígio deste evento (66).

O genoma do parasita poderia ter preservado vestígios de alguns genes (HGT-transferência horizontal de genes) que ocorreram entre a transição de vida livre endosimbionte em cianobactéria (66). Porém, recentemente, realizamos ensaios que acenam para uma provável função fisiológica de PhQ em *P. falciparum* que vai além de mero resquício evolutivo.

Outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo tem caracterizado α -tocoferol (vitamina E) nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*, molécula que possui a cadeia isôprenica denominada fitil pirofosfato proveniente da via MEP, e o anel de chromanol proveniente da via metabólica do Chiquimato (67). Um dos sistemas de cromatografia líquida de alto desempenho (RP-HPLC), padronizado para a caracterização de α -tocoferol, mostrou-se satisfatório para a eluição de PhQ e MQ-4, sendo que, os tempos de retenção dessas moléculas, nesse sistema, não corresponderam aos tempos de retenção de nenhum outro produto proveniente da via de MEP e/ou via do Chiquimato, previamente caracterizados em *P. falciparum*.

Como os compostos conhecidos como vitamina E são potentes antioxidantes que protegem ácidos graxos poliinsaturados da peroxidação lipídica (68,69) e baseando-se na hipótese de que, em *P. falciparum*, α -tocoferol poderia ter essa função antioxidante, parasitas foram mantidos sob condições de estresse oxidativo (20% O₂) para posterior análise do perfil de α -tocoferol. Nessas análises, observamos um aumento considerável na biossíntese de PhQ, em parasitas mantidos sob estresse oxidativo. Estes resultados preliminares sugerem que, essa molécula, não seja apenas um resquício evolutivo, mas, possa desempenhar alguma atividade antioxidante no parasita pois, responde a essa condição de tratamento a qual o parasita foi submetido.

Como ambos, PhQ e α -tocoferol, são produtos provenientes das mesmas vias metabólicas, sendo as únicas moléculas, até o momento, derivadas de fitil-PP, caracterizadas em *P. falciparum*, é muito provável que possa haver alguma relação entre as funções que ambas desempenham nos estágios intraeritrocitários do parasita. Além disso, alguns trabalhos indicam

que a vitamina K, em sua forma reduzida (hidroquinona), pode atuar como antioxidante por sua característica hidrofóbica (70,71).

Estudos realizados em *Arabidopsis* indicaram a presença de duas vias para a biossíntese de clorofila, filoquinona e tocoferol. O fitol livre, proveniente da degradação dessas moléculas, seria fosforilado em fitil-P e fitil-PP para posteriormente ser utilizado na síntese de clorofila, filoquinona e principalmente tocoferol, como uma via de reciclagem, ou ser depositado sob a forma de ácidos graxos no metabolismo de lipídeos (72). Especulamos que, como uma terceira hipótese, *P. falciparum* possa apresentar esta via alternativa na utilização do fitol onde, PhQ atuaria na reciclagem de fitol livre.

Diferentemente do que ocorre com a biossíntese de PhQ, em condições de anaerobiose, observamos um aumento considerável na biossíntese de MQ-4, em diferentes períodos de cultivo anaeróbico. A literatura descreve que *P. falciparum* utiliza a ubiquinona (UQ) como transportadora de elétrons na cadeia respiratória. Sabe-se que durante o ciclo no hospedeiro vertebrado (homem), as formas maduras de *P. falciparum*, podem permanecer em ambiente com baixa concentração de O₂ (fenômeno de citoaderência e formação de rosetas nos capilares profundos) (73,74), portanto, nessas condições de anaerobiose, poderia ocorrer um aumento na biossíntese de MQ-4, visto que, essa molécula, assim como UQ, exerce papel de transportadora de elétrons na cadeia respiratória. Nossa hipótese, então, propõe que a MQ-4, assim como ocorre em *E. coli* (46-47), possa estar envolvida no transporte de elétrons, em *P. falciparum*, sob condições de anaerobiose.

Em *P. falciparum*, dados bioquímicos indicam que o papel da mitocôndria não é o de ser uma fonte de ATP, mas fundamentalmente de manter a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial metabolicamente ativa para a regeneração da UQ. Esta é exigida como aceptora de elétrons (43), onde, UQ funciona como um elo entre o complexo I alternativo (tipo II NADH:quinona oxidoreductase -PfNDH2) e o complexo III, tendo a função de coletar equivalentes de redução (elétrons), doados por PfNDH2, transportando ao citocromo (complexo III), funcionando assim, como aceptora de elétrons do complexo II.

Na maioria dos organismos anaeróbicos e nas bactérias anaeróbicas gram-positivas, a MQ é a única transportadora de elétrons na cadeia respiratória, sendo essencial para a sobrevivência desses organismos, por outro lado, muitas enzimas respiratórias de bactérias anaeróbicas facultativas, como *E. coli*, podem usar ambas MQ/UQ como substrato na transferência de

elétrons; UQ em condições aeróbicas e MQ em condições anaeróbicas (46,47). Shestopalov e colaboradores (59) mostraram que, em *E. coli*, mudanças na composição do *pool* de quinonas, depende das condições de aeração do meio e apresentou provas de regulação pós-transcricional na biossíntese das quinonas (59). Para demonstrar uma provável participação da MQ na cadeia respiratória de *P. falciparum*, como receptora de elétrons, partimos dos ensaios de NADH:ubiquinona oxidoreductase descritos na literatura (48) e assim, determinamos que flavoenzimas do complexo I alternativo obtidas a partir de extrato de *P. falciparum* podem usar, além de UQ, também MQ-4 para oxidar NADH. A reação foi funcionalmente isolada de outros complexos respiratórios pela ação de inibidores dos complexos III e IV. A diferença nos parâmetros cinéticos observada entre os substratos UQ e MQ-4, provavelmente se deve a afinidade com a enzima ou devida à estrutura dos padrões utilizados na reação, pois MQ-4 apresenta uma cadeia lateral com quatro unidades isoprênicas. A UQ utilizada como substrato foi decilubiquinona, sem unidades isoprênicas, assim, a cadeia isoprênica poderia influenciar na reação por ser hidrofóbica ou prejudicar na conformação assumida pelo substrato ao se ligar à enzima (44, 46)

Demonstramos por meio dos ensaios de marcações metabólicas e cromatografias, que *P. falciparum* altera o conteúdo de seu *pool* de quinonas dependendo das condições de aeração a qual está submetido. No entanto, enquanto em *E. coli*, mudanças nas relações MQ/UQ variam em questão de segundos (15), em *P. falciparum*, observamos diferenças maiores apenas após os parasitas serem mantidos por 48 horas em condições de anaerobiose, sendo que, os níveis de MQ-4 aumentam 50% em relação aos parasitas controle e a biossíntese de UQ sofre queda de 15%.

O papel de MQ-4 como aceptora de elétrons em *P. falciparum*, também pode ser apoiado pelo aumento de 30% que ocorre na biossíntese de UQ decorrente do tratamento com Ro 48-8071. Provavelmente ocorra esse aumento na biossíntese de UQ para suprir a diminuição da biossíntese de MQ-4, inibida pela droga, sugerindo similaridade no papel que ambas as moléculas desempenham no ciclo intraeritrocitário do parasita.

Devemos ressaltar que, sendo o precursor radioativo comum na via de MQ e UQ, não podemos descartar a hipótese de que o aumento na biossíntese de UQ poderia ser devido ao deslocamento do precursor radioativo para UQ uma vez que a biossíntese de MQ-4 estava inibida por Ro 48-8071. Entretanto, esta hipótese não seria válida para a biossíntese de PhQ, uma vez que também tem o mesmo precursor comum, porém não detectamos aumento na biossíntese da

mesma.

Em *E. coli*, a abundância de MQ/UQ na membrana é estritamente regulada em resposta à disponibilidade de oxigênio ao nível de atividade enzimática (59) e ao nível transcricional (75,76). Como já dito anteriormente, há provas de regulação pós-transcricional na biossíntese de quinonas em *E. coli* (59). Para isso, investigamos, por *Real-Time PCR*, se o perfil de transcrição, dos genes que supostamente codificam as enzimas da via de biossíntese de MQ/UQ, seria influenciado pela concentração de oxigênio durante o cultivo.

Não observamos diferenças na transcrição dos genes supostamente envolvidos na via de UQ/MQ em condições de anaerobiose. Acreditamos que a diferença vista na abundância dos produtos (UQ/MQ-4) em anaerobiose, pode ser, devida a modificações pós-transcricionais, como descrito em *E. coli*.

Em bactérias, diversos relatos indicam que o conteúdo de quinonas pode ser controlado pelo potencial redox das próprias quinonas estando diretamente relacionado com a disponibilidade de O₂ no meio e com processos de regulação da transcrição (15,77,78). Desta forma, em bactérias foi caracterizado um sistema sensor do potencial redox, denominado ArcA/B, onde o complexo ArcB é ativado em condições anaeróbicas, seguido da fosforilação de ArcA. Provavelmente, a regulação transcricional, do complexo ArcB/A ocorre por meio da fosforilação de ArcA pelo domínio histidina quinase de ArcB, onde posteriormente o complexo ArcA fosforilado se liga ao DNA, mediando o controle transcricional no promotor aumentando o *pool* de quinonas disponíveis (76). Em *P. falciparum*, ainda não se tem nenhum relato sobre um controle da expressão gênica dependente de O₂ mediado por essas proteínas, mas, em nossas análises *in silico*, no banco de dados *PlasmoDB*, encontramos um gene depositado que poderia codificar ArcB (PFC1050w). Assim, eventos de fosforilação e desfosforilação através de quinases como ArcB e fosfatases, poderiam atuar como transmissores de sinais do meio externo internalizando esses sinais para o parasita, mediando o controle pós-transcricional de genes da via de biossíntese de MQ (75,76).

Nossos resultados mostram, também, que a transcrição da maioria desses prováveis genes da via de UQ/MQ se mantém estável no decorrer do ciclo intraeritrocitário. Embora a transcrição, durante o ciclo intraeritrocitário de *P. falciparum*, por ser relativamente rápida, pode ocorrer alterações, onde muitos genes são transcritos temporalmente de maneira estágio-específica (79). Nas análises de transcrição nos estágios intraeritrocitários observa-se que, os genes que codificam

proteínas relacionadas a maioria das vias metabólicas, como a glicólise, por exemplo, são expressos em trofozoítos, já nos parasitas em estágio esquizontes, observa-se expressão de genes da maquinaria de degradação protéica e invasão para o início de um novo ciclo (79).

Essa dissertação somou-se aos resultados previamente obtidos por nosso grupo, descrevendo pela primeira vez, a biossíntese de ambas as formas de vitamina K pelos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Foi demonstrando, também, o papel da MQ-4 no transporte de elétrons (80) e dados preliminares apontaram para a provável ação antioxidante desempenhada pela PhQ.

O conhecimento sobre a bioquímica, biologia e fisiologia dos parasitas abre novas alternativas no estudo contra a malária. As duas formas de vitamina K (MQ e PhQ) são produtos, provenientes da via MEP e da via do Chiquimato, vias que encontram-se ausentes no hospedeiro humano e são comuns a vários patógenos humanos, como o *Plasmodium* e *Mycobacterium*. Portanto são considerados potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho objetivou-se complementar os estudos em andamento em nosso laboratório sobre a biossíntese das duas formas de vitamina K (MQ-4 e PhQ) nas formas intraeritrocitárias de *P. falciparum*, visando o entendimento mais profundo do metabolismo de *P. falciparum* através do conhecimento sobre o papel desempenhado por essas moléculas na fisiologia do parasita. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 6.1 A droga, Ro 48-8071, inibe a biossíntese de MQ-4, aumenta a biossíntese de UQ e a biossíntese de PhQ permanece inalterada, nos parasitas de *P. falciparum*. A inibição não é revertida com a adição de MQ-4 ou PhQ e o valor de IC₅₀ de Ro 48-8071 permanece inalterado nas condições de anaerobiose;
- 6.2 Há aumento na biossíntese de MQ-4 e queda na biossíntese de UQ em parasitas de *P. falciparum* cultivados em condições de anaerobiose e restabelecimento desses níveis quando os parasitas retornam a condição normal de cultivo (5%O₂);
- 6.3 Em *P. falciparum*, MQ-4 atua como transportadora de elétrons na cadeia respiratória assim como UQ;
- 6.4 Não há alterações nos possíveis transcritos da via de UQ/MQ dependente das condições de aeração no cultivo dos parasitas de *P. falciparum*;
- 6.5 Há aumento na biossíntese de PhQ nos parasitas de *P. falciparum* cultivados em condições de estresse oxidativo (20% O₂);

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- 1 Sherman IW. Malaria. Parasite biology, Pathogenesis and protection. Washington, DC: ASM; 1998.
- 2 Bruce-Chwatt LJ. Essential Malariology. London: William Heinemann Medical Books; 1980.
- 3 Toler S. The plasmodial apicoplast was retained under evolutionary selective pressure to assuage blood stage oxidative stress. *Med Hypotheses*. 2005;65(4):683-90.
- 4 Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, Chotivanich K, Krettli AU, et al. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2003 Apr 11;300(5617):318-21.
- 5 Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):564-94.
- 6 Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):214-7.
- 7 Rey L. Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- 8 Snow RW, Guerra CA, Mutheu JJ, Hay SI. International funding for malaria control in relation to populations at risk of stable *Plasmodium falciparum* transmission. *PLoS Med*. 2008 Jul 22;5(7):e142.
- 9 Buabeng KO, Duwiejua M, Matowe LK, Smith F, Enlund H. Availability and choice of antimalarials at medicine outlets in Ghana: the question of access to effective medicines for malaria control. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Nov;84(5):613-9.
- 10 Phillips RS. Current status of malaria and potential for control. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jan;14(1):208-26.
- 11 Trigg PI, Kondrachine AV. Commentary: malaria control in the 1990s. *Bull World Health Organ*. 1998;76(1):11-6.

* De acordo com: Internacional Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available form: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- 12 White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*. 2004 Apr;113(8):1084-92.
- 13 Dorn A, Stoffel R, Matile H, Bubendorf A, Ridley RG. Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature*. 1995 Mar 16;374(6519):269-71.
- 14 Ginsburg H, Ward SA, Bray PG. An integrated model of chloroquine action. *Parasitol Today*. 1999 Sep;15(9):357-60.
- 15 Bekker M, Kramer G, Hartog AF, Wagner MJ, de Koster CG, Hellingwerf KJ, et al. Changes in the redox state and composition of the quinone pool of *Escherichia coli* during aerobic batch-culture growth. *Microbiology*. 2007 Jun;153(Pt 6):1974-80.
- 16 Slater AF, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*. 1992 Jan 9;355(6356):167-9.
- 17 Warhurst DC. The quinine-haemin interaction and its relationship to antimalarial activity. *Biochem Pharmacol*. 1981 Dec 15;30(24):3323-7.
- 18 Macreadie I, Ginsburg H, Sirawaraporn W, Tilley L. Antimalarial drug development and new targets. *Parasitol Today*. 2000 Oct;16(10):438-44.
- 19 Fast NM, Kissinger JC, Roos DS, Keeling PJ. Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol*. 2001 Mar;18(3):418-26.
- 20 Wilson RJ. Progress with parasite plastids. *J Mol Biol*. 2002 May 31;319(2):257-74.
- 21 Flesch G, Rohmer M. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur J Biochem*. 1988 Aug 1;175(2):405-11.
- 22 Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Jun;61(12):1401-26.

- 23 Mbaya B, Rigomier D, Edoth GG, Karst F, Schrevel J. Isoprenoid metabolism in *Plasmodium falciparum* during the intraerythrocytic phase of malaria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Dec 31;173(3):849-54.
- 24 Couto AS, Kimura EA, Peres VJ, Uhrig ML, Katzin AM. Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units. *Biochem J*. 1999 Aug 1;341(Pt 3):629-37.
- 25 Moura IC, Wunderlich G, Uhrig ML, Couto AS, Peres VJ, Katzin AM, et al. Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Sep;45(9):2553-8.
- 26 Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, et al. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*. 1999 Sep 3;285(5433):1573-6.
- 27 de Macedo CS, Uhrig ML, Kimura EA, Katzin AM. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Jan 22;207(1):13-20.
- 28 Cassera MB, Gozzo FC, D'Alexandri FL, Merino EF, del Portillo HA, Peres VJ, et al. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):51749-59.
- 29 Cassera MB, Merino EF, Peres VJ, Kimura EA, Wunderlich G, Katzin AM. Effect of fosmidomycin on metabolic and transcript profiles of the methylerythritol phosphate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(3):377-83.
- 30 Rodrigues Goulart H, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Aquino Duarte FA, Katzin AM. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul;48(7):2502-9.
- 31 Tonhosolo R, D'Alexandri FL, Genta FA, Wunderlich G, Gozzo FC, Eberlin MN, et al. Identification, molecular cloning and functional characterization of an octaprenyl pyrophosphate synthase in intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2005 Nov 15;392(Pt 1):117-26.
- 32 Tonhosolo R, D'Alexandri FL, de Rosso VV, Gazarini ML, Matsumura MY, Peres VJ, et al. Carotenoid Biosynthesis in Intraerythrocytic Stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2009 Apr 10;284(15):9974-85.

- 33 Levander OA, Ager AL, Jr. Malarial parasites and antioxidant nutrients. *Parasitology*. 1993;107(Suppl):S95-106.
- 34 Herrmann KM, Weaver LM. The Shikimate Pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1999 Jun;50:473-503.
- 35 McConkey GA. Targeting the shikimate pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jan;43(1):175-7.
- 36 McConkey GA, Ittarat I, Meshnick SR, McCutchan TF. Auxotrophs of *Plasmodium falciparum* dependent on p-aminobenzoic acid for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4244-8.
- 37 Olson RE. The function and metabolism of vitamin K. *Annu Rev Nutr*. 1984;4:281-337.
- 38 Johnson TW, Shen G, Zybaïlov B, Kolling D, Reategui R, Beauparlant S, et al. Recruitment of a foreign quinone into the A(1) site of photosystem I. I. Genetic and physiological characterization of phylloquinone biosynthetic pathway mutants in *Synechocystis* sp. pcc 6803. *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275(12):8523-30.
- 39 Price PA. Vitamin K-dependent formation of bone Gla protein (osteocalcin) and its function. *Vitam Horm*. 1985;42:65-108.
- 40 Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost*. 2008 Oct;100(4):530-47.
- 41 Gross J, Cho WK, Lezhneva L, Falk J, Krupinska K, Shinozaki K, et al. A plant locus essential for phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. *J Biol Chem*. 2006 Jun 23;281(25):17189-96.
- 42 Iverson TM, Luna-Chavez C, Cecchini G, Rees DC. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*. 1999 Jun 18;284(5422):1961-6.
- 43 Roberts F, Roberts CW, Johnson JJ, Kyle DE, Krell T, Coggins JR, et al. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature*. 1998 Jun 25;393(6687):801-5.

- 44 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 Jan 17;1553(1-2):123-39.
- 45 Kita K, Takamiya S. Electron-transfer complexes in *Ascaris* mitochondria. *Adv Parasitol*. 2002;51:95-131.
- 46 Maklashina E, Hellwig P, Rothery RA, Kotlyar V, Sher Y, Weiner JH, et al. Differences in protonation of ubiquinone and menaquinone in fumarate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26655-64.
- 47 Soballe B, Poole RK. Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2000 Apr;146(Pt 4):787-96.
- 48 Fisher N, Warman AJ, Ward SA, Biagini GA. Chapter 17 Type II NADH: quinone oxidoreductases of *Plasmodium falciparum* and *Mycobacterium tuberculosis* kinetic and high-throughput assays. *Methods Enzymol*. 2009;456:303-20.
- 49 Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976 Aug 20;193(4254):673-5.
- 50 Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979 Jun;65(3):418-20.
- 51 Goodyer ID, Johnson J, Eisenthal R, Hayes DJ. Purification of mature-stage *Plasmodium falciparum* by gelatine flotation. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994 Apr;88(2):209-11.
- 52 Solomon VR, Haq W, Smilkstein M, Srivastava K, Rajakumar S, Puri SK, et al. Synthesis and antimalarial activity of novel side chain modified antimalarial agents derived from 4-aminoquinoline. *Med Chem*. 2008 Sep;4(5):446-56.
- 53 Braun-Breton C, Jendoubi M, Brunet E, Perrin L, Scaife J, Pereira da Silva L. In vivo time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1986 Jul;20(1):33-43.
- 54 D'Aleandri FL, Kimura EA, Peres VJ, Katzin AM. Protein dolichylation in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. 2006 Nov 27;580(27):6343-8.

- 55 Gueguen S, Herbeth B, Siest G, Leroy P. An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. *J Chromatogr Sci*. 2002 Feb;40(2):69-76.
- 56 Chatzimichalakis PF, Samanidou VF, Papadoyannis IN. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004 Jun 15;805(2):289-96.
- 57 Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979 Dec;16(6):710-8.
- 58 Golnitz U, Albrecht L, Wunderlich G. Var transcription profiling of *Plasmodium falciparum* 3D7: assignment of cytoadherent phenotypes to dominant transcripts. *Malar J*. 2008;7:14.
- 59 Shestopalov AI, Bogachev AV, Murtazina RA, Viryasov MB, Skulachev VP. Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*. Evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis. *FEBS Lett*. 1997 Mar 10;404(2-3):272-4.
- 60 Dhiman RK, Mahapatra S, Slayden RA, Boyne ME, Lenaerts A, Hinshaw JC, et al. Menaquinone synthesis is critical for maintaining mycobacterial viability during exponential growth and recovery from non-replicating persistence. *Mol Microbiol*. 2009 Apr;72(1):85-97.
- 61 Fang J, Beattie DS. Identification of a gene encoding a 54 kDa alternative NADH dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Mar;127(1):73-7.
- 62 Fang J, Beattie DS. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic Biol Med*. 2003 Feb 15;34(4):478-88.
- 63 Fang J, Beattie DS. Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Aug 28;123(2):135-42.
- 64 Fang J, Beattie DS. Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: isolation and characterization. *Biochemistry*. 2002 Mar 5;41(9):3065-72.

- 65 Morand OH, Aebi JD, Dehmlow H, Ji YH, Gains N, Lengsfeld H, et al. Ro 48-8.071, a new 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase inhibitor lowering plasma cholesterol in hamsters, squirrel monkeys, and minipigs: comparison to simvastatin. *J Lipid Res.* 1997 Feb;38(2):373-90.
- 66 Gross J, Meurer J, Bhattacharya D. Evidence of a chimeric genome in the cyanobacterial ancestor of plastids. *BMC Evol Biol.* 2008;8:117.
- 67 Michal G. *Biochemical Pathways, An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology.* New York: John Wiley & Sons; 1999.
- 68 Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res.* 2005 Jan;49(1):7-30.
- 69 Wolf G. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *J Nutr.* 2005 Mar;135(3):363-6.
- 70 Vervoort LM, Ronden JE, Thijssen HH. The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 1997 Oct 15;54(8):871-6.
- 71 Fiorentini D, Cipollone M, Galli MC, Landi L. Antioxidant activity of reduced menadione in solvent solution and in model membranes. *Free Radic Res.* 1997 May;26(5):419-29.
- 72 Ischebeck T, Zbierzak AM, Kanwischer M, Dormann P. A salvage pathway for phytol metabolism in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2006 Feb 3;281(5):2470-7.
- 73 Oliveira PL, Oliveira MF. Vampires, Pasteur and reactive oxygen species. Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites? *FEBS Lett.* 2002 Aug 14;525(1-3):3-6.
- 74 Wahlgren M, Fernandez V, Scholander C, Carlson J. Rosetting. *Parasitol Today.* 1994 Feb;10(2):73-9.
- 75 Alexeeva S, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ. Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol.* 2003 Jan;185(1):204-9.

- 76 Bekker M, Alexeeva S, Laan W, Sawers G, Teixeira de Mattos J, Hellingwerf K. The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *J Bacteriol.* 2010 Feb;192(3):746-54.
- 77 Georgellis D, Lynch AS, Lin EC. In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1997 Sep;179(17):5429-35.
- 78 Georgellis D, Kwon O, Lin EC. Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science.* 2001 Jun 22;292(5525):2314-6.
- 79 Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 2003 Oct;1(1):E5.
- 80 Tonhosolo R, Gabriel HB, Matsumura MY, Cabral FJ, Yamamoto MM, D'Aleixandri FL, et al. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize menaquinone. *FEBS Lett.* 2010 Oct 29. In press

ANEXO:
Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize menaquinone - Artigo no prelo

Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize menaquinone

Renata Tonhosolo^{a,1}, Heloisa B. Gabriel^{a,1}, Miriam Y. Matsumura^a, Fernanda J. Cabral^a, Márcio M. Yamamoto^a, Fábio L. D'Aleandri^a, Rodrigo A.C. Sussmann^a, Rodrigo Belmonte^a, Valnice J. Peres^a, Dean C. Crick^b, Gerhard Wunderlich^a, Emília A. Kimura^a, Alejandro M. Katzin^{a,*}

^aDepartment of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, 1682 Campus Delivery Ft., Collins, CO 80523-1677, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2010

Revised 21 October 2010

Accepted 25 October 2010

Available online xxxx

Edited by Miguel De la Rosa

Keywords:

Malaria

Menaquinone

Apicomplexa

Ubiquinone

Vitamin K

Plasmodium falciparum

ABSTRACT

Herein, we show that intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* have an active pathway for biosynthesis of menaquinone. Kinetic assays confirmed that plasmodial menaquinone acts at least in the electron transport. Similarly to *Escherichia coli*, we observed increased levels of menaquinone in parasites kept under anaerobic conditions. Additionally, the mycobacterial inhibitor of menaquinone synthesis Ro 48-8071 also suppressed menaquinone biosynthesis and growth of parasites, although off-targets may play a role in this growth-inhibitory effect. Due to its absence in humans, the menaquinone biosynthesis can be considered an important drug target for malaria.

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Plasmodium falciparum resistance to current drugs used in the treatment of malaria has led researchers to seek new drug targets, and the study of pathways localized in an apicoplast is particularly important in this context. The shikimate pathway and methylerythritol phosphate pathway (MEP) are localized in this organelle of *P. falciparum* [1]. In plants and cyanobacteria these pathways are the precursors for biosynthesis of phyloquinone (PhQ) while in bacteria biosynthesizes menaquinone (MQ) [2,3].

Our group demonstrated that the pathway of isoprenoid biosynthesis is functionally active in the intraerythrocytic stages of *P. falciparum* [4] and that final products of this pathway like dolichol of 11–12 isoprenic units [5], ubiquinones [6], isoprenylated/dolichylated proteins [7,8] and carotenoids [9] are biosynthesized by this parasite when [1-(n)-³H]geranylgeranyl pyrophosphate was used as a metabolic precursor.

During its intraerythrocytic development in the human host, the malaria parasite *P. falciparum* is submitted to considerable

changes in the oxygen concentration due to intermittent cytoadherence in the deep vasculature [10], with consequences for the energy metabolism of the parasite. Facultative anaerobic organisms such as *Escherichia coli* employ two types of electron carriers, ubiquinone and menaquinone which are tightly regulated depending on the oxygen supply in the environment [11].

The present study shows an active pathway for the biosynthesis of MQ in *P. falciparum* and shows that MQ could replace the physiological function of ubiquinone (UQ) under anaerobic conditions. This discovery sheds a new light on the *P. falciparum* metabolism and due to its absence in humans; the MQ biosynthesis can be considered an important drug target against malaria.

2. Methods

2.1. *P. falciparum* culture

The *P. falciparum* clone 3D7 was cultured *in vitro* according to protocol described by Trager and Jensen [12] where human sera was substituted by Albumax I (0.5%) [13]. Parasites were grown in a 40 ml volume under an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ (normal culture). In some experiments parasites were cultured in anaerobic condition in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% N₂. Parasite development and multiplication were monitored by microscopic evaluation of Giemsa-stained thin smears. We

* Corresponding author. Address: Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes 1374, CEP 05508-000 São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 3091 7417.

E-mail address: amkatzin@icb.usp.br (A.M. Katzin).

¹ These authors contributed equally to this work.

conducted the PCR for mycoplasma detection to assure that parasite cultures are not contaminated [14].

2.2. Metabolic labelling

Synchronous cultures of *P. falciparum* were labelled with [1-(n)-³H]GGPP (3.125 µCi/ml) (Fig. 1) in normal RPMI 1640 medium in ring, trophozoite or schizont stages (20% parasitemia) for 12 h and were then recovered in trophozoite, schizont and ring stages, respectively. After labelling, ring (1–20 h after reinvasion), trophozoite (20–30 h after reinvasion) and schizont (30–48 h after reinvasion) forms were purified on a 40%/70%/80% discontinuous Percoll[®] gradient [15] and stored in liquid nitrogen until analysis. Protein biosynthesis in synchronous cultures of *P. falciparum* was monitored as described previously [16].

2.3. MQ extraction

Parasites were submitted to MQ extraction following the protocol described by Hirauchi et al. [17] or following the protocol described by Bekker et al. [18].

2.4. Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

For both protocols described below the extracts of each parasite stage obtained from metabolically labelled parasites were analyzed with a Phenomenex Luna C18 column (250 mm × 4.6 mm × 5 µm), maintained at 28 °C. The UV detector was set at 267 nm, and fractions were collected in Gilson HPLC 322 pump (Gilson, Villiers-le-Bel, France) and also a gradient module connected to a 152 UV-visible detector, an 831 temperature regulator and an FC203B fraction collector:

Protocol I – Fractions were collected at 1 min intervals in an isocratic system with methanol:ethanol (95:5, v/v), following the protocol described by Kamao et al. [19] and extraction protocols described by Hirauchi et al. [17].

Protocol II – Fractions were collected at 0.5 min intervals in an isocratic system with methanol:ethanol (50:50, v/v), following the HPLC and extraction protocols described by Bekker et al. [18].

In all HPLC analysis with samples radioactively labelled we co-injected with MQ-4 standard. The resulting fractions were dried

Fig. 1. Menaquinone biosynthesis pathway. MQs are biosynthesized by the shikimate and methylerythritol phosphate pathway (MEP). The 4-dihydroxy-2-naphthoate is derived from chorismate formed via the shikimate pathway. The geranylgeranyl-PP is biosynthesized by the MEP pathway. The structure of menaquinone-4 (MQ-4) found in intraerythrocytic stages of *P. falciparum* was indicated. Labelled MQ-4 was characterized in intraerythrocytic stages of *P. falciparum* when exogenous [1-(n)-³H]geranylgeranyl pyrophosphate was added in culture medium. The [³H] is indicated in bold.

using a Speed Vac, resuspended in liquid scintillation cocktail (Perkin Elmer, Turku, Finland) and monitored with a Beckman LS 5000 TB β -counter.

2.5. Mass spectrometry analysis

ESI-MS (electrospray ionization-mass spectrometry) and ESI-MS/MS (electrospray ionization-tandem mass spectrometry) analysis were performed using a LCQ-Duo ion-trap mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). For this analysis, 1.0×10^{10} unlabelled schizont extract were purified by RP-HPLC (Protocol I) and the fraction with retention times coincident to the MQ-4 standard was collected in 2.0 ml plastic tubes, dried in a Speed Vac and resuspended in 30 μ l of chloroform/methanol (1:1, v/v), 2 mM lithium iodide. The MS spectra were acquired in full ion mode and other parameters were the same as described [20].

2.6. Inhibition tests with Ro 48-8071

Ro 48-8071 was dissolved in 100% DMSO resulting in 10 mM stock solutions [21]. We applied the method proposed by Desjardins et al. and Moneriz et al. [22,23] to determine the 50% inhibitory concentrations (IC_{50} values). The IC_{50} values for growth inhibition were calculated by Probit Analysis (Minitab Statistical Software 13.30 TM; Minitab Inc.). The parasites in schizont stage were treated with IC_{50} value of the drug for a total of 48 h and labelling with [1-(n)- 3H]GGPP took place during the last 12 h. MQ was then extracted [17] and analyzed by HPLC (Protocol II) [18] to compare the pattern of MQ-4 synthesized by the treated and untreated parasites.

2.7. MQ biosynthesis in parasites cultivated in anaerobic conditions

The synchronized parasites were maintained in anaerobic conditions for a total time of 48 h. During the last 12 h, parasites were labelled with [1-(n)- 3H]GGPP and then harvested. MQ extraction and HPLC purification techniques were conducted as described above (Protocol II). The pattern of MQ-4 and UQ biosynthesis from the parasites submitted to anaerobic conditions was analyzed and compared to patterns of parasites maintained in normal condition.

Parasites exposed to 48 h in anaerobic conditions were returned to normal conditions and cultivated for additional 48 h. During the last 12 h, labelling as before was done and the metabolic profiles of UQ and MQ-4 were analyzed by HPLC (Protocol II) and compared to control.

2.8. Determination of menaquinone function as a substrate for electron-carrier in respiratory chain

Free parasites were prepared from aliquots of infected erythrocytes (approximately 8×10^9 cells/ml) by adding 5 volumes of 0.15% (w/v) saponin in phosphate-buffered saline (1.76 mM K_2HPO_4 , 8.0 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.5 mM D-glucose) for 5 min, followed by three washes by centrifugation and resuspension in HEPES (25 mM)-buffered RPMI and restored in distilled water containing a protease inhibitor cocktail (Complete Mini; Roche). Cell extracts were prepared by repeated freeze-thawing in liquid N_2 , followed by sonication (4 pulses of 15 s at 35 W, on ice). Enzyme activity was measured in a buffered solution containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM KCN, variant concentration of NADH (0–1000 μ M) and 10 μ M atovaquone with MQ-4 (200 μ M). KCN and atovaquone were added to avoid the electron flow through the cytochrome system (complexes III and IV). The reaction was initiated by the addition of cell free *P. falciparum* extract (approximately 500 μ g protein, according to Fisher et al. [24]), and activity was monitored

spectrophotometrically by the decrease in absorbance at 340 nm (NADH $\Sigma = 6.22$ mM). Enzyme kinetic parameters were calculated using Enzfitter software (Elsevier-Biosoft, Cambridge, UK).

3. Results

3.1. Biosynthesis of MQ-4 by the intraerythrocytic stages of *P. falciparum*

A radioactive fraction with a retention time coincident with the MQ-4 standard (11 min) and other non-characterized were detected in all intraerythrocytic stages (Fig. 2A). Higher quantities of MQ-4 was detected in schizont stages when compared to ring and trophozoite stages, similarly to what was found for the carotenoid synthesis [9].

Other method of extraction [18] and HPLC (Protocol II) analysis was used to confirm the presence of MQ-4 biosynthesis in schizont stages of *P. falciparum* metabolically labelled. Radioactive fraction with retention time coincident with MQ-4 (14 min) was detected (Fig. 2B). Other different HPLC methodologies were performed to confirm the presence of MQ-4 biosynthesis in the parasites (see Supplementary data). Importantly, no radioactive fractions coinciding with the MQ-4 standard were found in the extracts from uninfected erythrocytes labelled with [1-(n)- 3H]GGPP in all chromatographic conditions used (data not shown). Under the above chromatographic conditions, polyisoprenoids, ubiquinone and carotenoids have different retention times from the MQ.

The fraction with retention time of 11 min. (HPLC-Protocol I) corresponding to MQ-4 was collected and analyzed by positive ion ESI-MS and ESI-MS/MS (Fig. 3). Only the schizont stages were submitted to mass spectrometry analysis because this stage exhibited the highest levels of MQ-4. In this analysis, identical ionization profiles were observed in the parasite samples and in the standard, with MQ-4 identified as $[M+Li]^+$ pseudomolecular ions at m/z ratios of 451.40. The molecular structure was confirmed by obtaining matching dissociation patterns when comparing the ESI-MS/MS spectra of the parental ions with m/z 451.28 from *P. falciparum* with the MQ-4 standard, (Fig. 3). Importantly, this compound was biosynthesized by the parasites since it was not detected by mass spectrometry either in RPMI or in normal red blood cells used in the parasite culture (data not shown).

3.2. Ro 48-8071 treatment inhibits the MQ-4 biosynthesis of *P. falciparum* cultivated in vitro

The growth of parasites was inhibited in a concentration-dependent manner (Fig. 4A) with an IC_{50} value of 4.5 ± 0.3 μ M at 48 h of treatment (calculations done as described by Moneriz et al. [23]). At this IC_{50} , no inhibition of protein biosynthesis was observed (data not shown). The effect of Ro 48-8071 on MQ-4 biosynthesis in the schizont stages was further investigated. The treatment of parasites with Ro 48-8071 significantly diminished MQ-4 biosynthesis in $88.2 \pm 11\%$, while UQ increased $30 \pm 5\%$ (Fig. 4B). The inhibition assays were performed in three independent experiments. The inhibitory effect of Ro 48-8071 was not reversed by the addition of MQ from 1 nM to 1 μ M (data not shown).

3.3. Biological function of MQ-4 in *P. falciparum*

After 10 days under anaerobic conditions, the parasitemia did not change when compared to control conditions indicating that the parasite is adapted to growth in anaerobic conditions (data not shown). Parasites showed an increase of $50 \pm 5\%$ in the biosynthesis MQ-4, whereas UQ decreased $15 \pm 3\%$ after 48 h in anaerobic conditions when compared to the controls (Fig. 5A). We then

Fig. 2. Biochemical evidence for the biosynthesis of menaquinone in intraerythrocytic stages of *P. falciparum*. (A) Profile of RP-HPLC analysis (C_{18} column, Protocol I) of *P. falciparum* extracts [17] from ring, trophozoite and schizont stages (1×10^9 parasites per stage) metabolically labelled with $[1-(n)-^3H]GGPP$. UNIPONT™ Software (Gilson Inc.) was used as the operational and analytical system. Samples were co-injected with MQ-4 standard. (B) The radioactive peaks corresponding to the retention time of UQ and MQ-4 were plotted from extracts (according to Bekker et al. [18]) of 1×10^9 schizont stages metabolically labelled with $[1-(n)-^3H]GGPP$, followed by RP-HPLC analysis (Protocol II). Sample was co-injected with UQ and MQ-4 standards. MQ-4: Menaquinone; UQ: ubiquinone.

tested if the previously observed changes in MQ-4 and UQ contents could be reversed in parasites upon reestablishment of normal conditions. As expected, parasites cultivated for 48 h under anaerobic conditions and then shifted to normal conditions for 48 h, showed the same MQ-4 and UQ levels profile as parasites maintained under normal conditions (Fig. 5B).

3.4. *P. falciparum* menaquinone functions as electron-carrier

The previous assays confirmed the kinetic parameters observed with decylubiquinone (K_m for NADH of $5.1 \mu M$ with a V_{max} of $0.12 \mu mol \min^{-1} mg^{-1}$) [24,25]. Menaquinone-dependent NADH oxidation was measured, and the apparent K_m for NADH oxidation was $72 \pm 15 \mu M$ with a V_{max} of $3 \pm 0.8 \mu mol \min^{-1} mg^{-1}$. Without MQ-4 or decylubiquinone addition no NADH oxidation was ob-

served. The activity was shown to be insensitive to rotenone ($50 \mu M$), the inhibitor of mammalian complex I, but sensitive to diphenylene iodonium chloride (DPI), a classical Type II NADH:dehydrogenase inhibitor [26]. Accordingly, DPI inhibited MQ-4 reduction (data not shown).

4. Discussion

The intraerythrocytic stages of *P. falciparum* biosynthesizes MQ-4, and this fact was showed by metabolic labelling with the direct precursor $[1-(n)-^3H]GGPP$. MQ-4 biosynthesized by *P. falciparum* was identified by five different chromatographic methods reported for this type of molecule, and confirmed also by ESI-MS/MS analysis, excluding any uncertainty about the molecular nature of the detected compound by metabolic labelling. The difference of

Fig. 3. Molecular identification of menaquinone biosynthesis in schizont stages of *P. falciparum* by positive ion ESI-MS and ESI-MS/MS. (A) ESI-MS and ESI-MS/MS analyses of the MQ-4 standard and unlabelled schizont parasites (1.0×10^{10}) without standard co-injection, both previously purified by HPLC (Protocol I). The analysis of parasites sample shows the presence of the m/z^+ 451.28 ion, coincident with the predicted molecular mass of MQ-4 standard. The molecular structure was confirmed by comparing the ESI-MS/MS spectra of the parental ions at m/z^+ 451.28 from *P. falciparum* with the standard.

Fig. 4. Menaquinone and Ubiquinone levels change in response to Ro 48-8071 treatment. (A) Ro 48-8071 inhibited parasite growth in a concentration-dependent manner ($IC_{50} = 4.5 \pm 0.3 \mu M$; mean $\pm$ S.D., $n = 3$ experiments), calculated according to Moneriz et al. [23]. (B) Decrease of MQ-4 contents in the schizont stages after the treatment with $4.5 \mu M$ of Ro 48-8071. The effect of Ro 48-8071 on MQ biosynthesis was analyzed (by RP-HPLC, Protocol II, with the extraction methodology described by Bekker et al. [18]) as the relationship between control and Ro 48-8071 treated parasites (2.7×10^9) metabolically labelled with $[1-(n-^3H)]GGPP$ (mean $\pm$ S.D., $n = 3$ experiments). Significant differences comparing control parasites and parasites treated with Ro 48-8071 (One-way ANOVA, P values indicated). UQ: Ubiquinone; MQ-4: menaquinone.

profile observed for MQ-4 (Fig. 2A and B) probably was due to the extraction methods. The recovery of MQ in the extraction following the protocol described by Hirauchi et al. [17] is higher when compared the protocol described by Bekker et al. [18].

The inhibition of parasite growth by Ro 48-8071, an inhibitor of 1,4-dihydroxy-2-naphthoate prenyltransferase, was possibly due to the inhibition of MQ biosynthesis, although it may be also active against other targets such as neutral lipid biosynthesis [27]. Also,

Fig. 5. Menaquinone and ubiquinone levels change in response to oxygen supply. (A) The MQ and UQ extracted by the methodology described by Bekker et al. [18] from 1×10^9 [1-(n)- ^3H]GGPP labelled schizonts stages cultivated for 48 h in anaerobic or normal conditions were analyzed by HPLC (Protocol II). The radioactive peaks corresponding to the retention time of UQ and MQ-4 were plotted. (B) Levels of MQ-4 and UQ from parasites upon reestablishment of normal conditions for 48 h after 48 h under anaerobic conditions, compared to parasites maintained in normal conditions ($n = 3$ experiments). Significant differences in different oxygen-containing atmospheres (One-way ANOVA test P values indicated). Control: (5% O_2 , 5% CO_2 and 90% N_2); anaerobic: (5% CO_2 and 95% N_2). UQ: Ubiquinone; MQ-4: menaquinone.

when MQ-4 was added to the medium, restoration of the parasite growth in the presence of Ro 48-8071 could not be observed. This may point to either a non-competitive type of inhibition in *Plasmodium* (contrasting to results obtained in *Mycobacterium tuberculosis* [28]) or an insufficient uptake of external MQ.

In *P. falciparum*, biochemical data indicate that the mitochondrion is not a source of ATP, but instead maintains an active mito-

chondrial electron transport chain to serve just one metabolic function: regeneration of UQ required as the electron acceptor [29]. Nonetheless, inhibition of *cyt bc1* complex electron transport is lethal to the parasite, presumably by interruption of essential links to the *de novo* pyrimidine biosynthesis, dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) pathway, and to the maintenance of the mitochondrial membrane potential. However, Smilkstein et al. [30]

showed that the conventional electron transport became non-essential in a drug-selected parasite clone (SB1-A6). They showed that this clone is pan-resistant to *cyt bc1* inhibitors and no mutations were identified to account for this. One possible explanation is that DHODH utilizes an alternative readily-available electron acceptor other than UQ. MQ-4 characterized in this work may serve as electron acceptor in *P. falciparum*.

Many respiratory enzymes from *E. coli* can use both MQ and UQ as substrate. Different components of the system can be substituted in the membrane in addition to, or in place of, other components as needed: substrate-specific dehydrogenases; lipoquinones; and terminal oxidoreductases – all of the dehydrogenases are lipoquinone reductases and all of the terminal oxidoreductases are lipoquinol oxidases. The lipoquinones involved in the respiratory chains of bacteria consist of MQs and UQs, while mammals have only UQ. MQs are the predominant lipoquinones of mycobacteria and other gram-positive bacteria, whereas gram-negative bacteria such as *E. coli* typically utilize both MQ and UQ or solely UQ [31]. Shestopalov et al. showed that *E. coli* changes the composition of its quinone pool depending on the aeration conditions and presented evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis [11]. We showed that Type II NADH dehydrogenase obtained from extracts of *P. falciparum* can use MQ-4 to oxidize NADH, and the reaction was functionally isolated from other respiratory complexes by the action of inhibitors of complexes III and IV. The NADH oxidation by MQ-4 is specific since without MQ-4 addition no oxidation is observed. The difference observed in the kinetic parameters from UQ and MQ may be due to that MQ-4 used in the reaction has a lateral chain with four isoprenic units while UQ used as a substrate was decylubiquinone, without isoprenic unit.

P. falciparum can be regarded as microaerophilic [32] during its asexual intraerythrocytic life cycle. However, living inside a large body of haemoglobin, it is difficult to predict the exact O₂ pressure to which the parasite is exposed. We showed data that parasites of *P. falciparum* change the content of the quinone pools depending on the aeration condition. However, while the changes in the MQ/UQ ratios vary in a matter of seconds in *E. coli* [18] highest differences were observed only after the parasites were submitted to 48 h in anaerobic conditions where the levels of MQ increase up to 50% compared to control parasites. At the same time, UQ production is decreased by 15% in parasites cultivated in anaerobic conditions. This difference in UQ and MQ contents occurs predominantly in schizont stages probably because at this time, the parasite usually resides in an oxygen-depleted environment, sequestered in deep capillaries. A role for MQ as an electron receptor is also supported by the observation that through inhibition of MQ synthesis by Ro 48-8071 a significant increase of UQ was observed. This may be interpreted as an attempt to compensate for an electron acceptor loss.

In conclusion, we have shown for the first time that *P. falciparum* has an active biosynthesis of MQ-4. Its absence in the human host makes both pathways (MEP and shikimate) very attractive as potential new target against malaria.

Acknowledgements

The authors would like to thank S. Wendel (Sírío Libanês Hospital, NESTA) for the gift of erythrocytes and Maria Belen Cassera for suggestions and critical reading of manuscript. R.T., F.L.D., H.G.B., M.Y.M., R.A.C.S., and R.B. are fellows from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This research was supported by grants from FAPESP, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and

grant number A1049151 from the National Institutes of Health, NIAID, USA (D.C.C.).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2010.10.055.

References

- [1] Kalanon, M. and McFadden, G.I. (2010) Malaria, *Plasmodium falciparum* and its apicoplast. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 775–782.
- [2] Shearer, M.J. and Newman, P. (2008) Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb. Haemost.* 100, 530–547.
- [3] Mustafa, G., Migita, C.T., Ishikawa, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S. and Yamada, M. (2008) Menaquinone as well as ubiquinone as a bound quinone crucial for catalytic activity and intramolecular electron transfer in *Escherichia coli* membrane-bound glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 283, 28169–28175.
- [4] Cassera, M.B. et al. (2004) The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 279, 51749–51759.
- [5] Couto, A.S., Kimura, E.A., Peres, V.J., Uhrig, M.L. and Katzin, A.M. (1999) Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units. *Biochem. J.* 341 (Pt 3), 629–637.
- [6] de Macedo, C.S., Uhrig, M.L., Kimura, E.A. and Katzin, A.M. (2002) Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 13–20.
- [7] D'Aleandri, F.L., Kimura, E.A., Peres, V.J. and Katzin, A.M. (2006) Protein dolichylation in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett.* 580, 6343–6348.
- [8] Moura, I.C., Wunderlich, G., Uhrig, M.L., Couto, A.S., Peres, V.J., Katzin, A.M. and Kimura, E.A. (2001) Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2553–2558.
- [9] Tonhosolo, R. et al. (2009) Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 284, 9974–9985.
- [10] Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K. and Doumbo, O.K. (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673–679.
- [11] Shestopalov, A.I., Bogachev, A.V., Murtazina, R.A., Viryasov, M.B. and Skulachev, V.P. (1997) Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*. Evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis. *FEBS Lett.* 404, 272–274.
- [12] Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673–675.
- [13] Radfar, A., Mendez, D., Moneriz, C., Linares, M., Marin-Garcia, P., Puyet, A., Diez, A. and Bautista, J.M. (2009) Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nat. Protoc.* 4, 1828–1844.
- [14] Rowe, J.A., Scragg, I.G., Kwiatkowski, D., Ferguson, D.J., Carucci, D.J. and Newbold, C.I. (1998) Implications of mycoplasma contamination in *Plasmodium falciparum* cultures and methods for its detection and eradication. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 177–180.
- [15] Braun-Breton, C., Jendoubi, M., Brunet, E., Perrin, L., Scaife, J. and Pereira da Silva, L. (1986) In vivo time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 33–43.
- [16] Rodrigues Goulart, H., Kimura, E.A., Peres, V.J., Couto, A.S., Aquino Duarte, F.A. and Katzin, A.M. (2004) Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2502–2509.
- [17] Hirauchi, K., Sakano, T., Notsunoto, S., Nagaoka, T., Morimoto, A., Fujimoto, K., Masuda, S. and Suzuki, Y. (1989) Measurement of K vitamins in animal tissues by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* 497, 131–137.
- [18] Bekker, M., Kramer, G., Hartog, A.F., Wagner, M.J., de Koster, C.G., Hellingwerf, K.J. and de Mattos, M.J. (2007) Changes in the redox state and composition of the quinone pool of *Escherichia coli* during aerobic batch-culture growth. *Microbiology* 153, 1974–1980.
- [19] Kamao, M., Suhara, Y., Tsugawa, N. and Okano, T. (2005) Determination of plasma Vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using Vitamin K analogs as internal standards. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 816, 41–48.
- [20] D'Aleandri, F.L., Tonhosolo, R., Kimura, E.A. and Katzin, A.M. (2009) Mass spectrometry analysis of polyisoprenoids alcohols and carotenoids via ES(Li(+))-MS/MS. *Methods Mol. Biol.* 580, 109–128.
- [21] Kurosu, M., Narayanasamy, P., Biswas, K., Dhiman, R. and Crick, D.C. (2007) Discovery of 1, 4-dihydroxy-2-naphthoate [corrected] prenyltransferase inhibitors: new drug leads for multidrug-resistant gram-positive pathogens. *J. Med. Chem.* 50, 3973–3975.
- [22] Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D. (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 710–718.
- [23] Moneriz, C., Marin-Garcia, P., Bautista, J.M., Diez, A. and Puyet, A. (2009) Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for

- quantification of low-parasitaemia *Plasmodium* infected erythrocytes. *Malar J.* 8, 279.
- [24] Fisher, N., Warman, A.J., Ward, S.A. and Biagini, G.A. (2009) Chapter 17 Type II NADH: quinone oxidoreductases of *Plasmodium falciparum* and *Mycobacterium tuberculosis* kinetic and high-throughput assays. *Methods Enzymol.* 456, 303–320.
- [25] Biagini, G.A., Viriyavejakul, P., O'Neill, P.M., Bray, P.G. and Ward, S.A. (2006) Functional characterization and target validation of alternative complex I of *Plasmodium falciparum* mitochondria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1841–1851.
- [26] Fang, J. and Beattie, D.S. (2002) Rotenone-insensitive NADH dehydrogenase is a potential source of superoxide in procyclic *Trypanosoma brucei* mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 123, 135–142.
- [27] Morand, O.H., Aebi, J.D., Dehmlow, H., Ji, Y.H., Gains, N., Lengsfeld, H. and Himber, J. (1997) Ro 48-8.071, a new 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase inhibitor lowering plasma cholesterol in hamsters, squirrel monkeys, and minipigs: comparison to simvastatin. *J. Lipid Res.* 38, 373–390.
- [28] Dhiman, R.K. et al. (2009) Menaquinone synthesis is critical for maintaining mycobacterial viability during exponential growth and recovery from non-replicating persistence. *Mol. Microbiol.* 72, 85–97.
- [29] Painter, H.J., Morrissey, J.M., Mather, M.W. and Vaidya, A.B. (2007) Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* 446, 88–91.
- [30] Smilkstein, M.J., Forquer, I., Kanazawa, A., Kelly, J.X., Winter, R.W., Hinrichs, D.J., Kramer, D.M. and Riscoe, M.K. (2008) A drug-selected *Plasmodium falciparum* lacking the need for conventional electron transport. *Mol. Biochem. Parasitol.* 159, 64–68.
- [31] Pandya, K.P. and King, H.K. (1966) Ubiquinone and menaquinone in bacteria: a comparative study of some bacterial respiratory systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 114, 154–157.
- [32] Trager, W. (1994) Cultivation of malaria parasites. *Methods Cell Biol.* 45, 7–26.