Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann

Biossíntese de Vitamina E nos estágios intraeritrocitários de *P. 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

Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann

Biossíntese de Vitamina E nos estágios intraeritrocitários de *P. 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 não autorizada pelo autor

Sussmann, Rodrigo Antonio Ceschini.

Biossíntese de Vitamina E nos estágios intraeritrocitários de *Plasmodium falciparum* / Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann. -- 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: Bioquímica de protozoários

Versão do título para o inglês: Vitamin E biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*.

Descritores: 1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. Biossíntese de isoprenóides 4. Antimaláricos 5.Ácido Úsnico 6. Tocoferol 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/SBIB0205/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann.			
Título da Dissertaçã	io: Biossíntese de Vitamina E nos estágios intraeritrocitários de <i>Plasmodium falciparum</i> .			
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: <u>ccp@icb.usp.br</u>

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 299, referente ao projeto intitulado:"*Caracterização bioquímica de vitamina e nos estágios intra-eritrocitários de plasmodium falciparum*" sob a responsabilidade de Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann, 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, 23 de abril de 2009.

Num

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 queridos pais Stezel e Sandra, ao meu filho Gabriel, a minha amada esposa Tânia, a minha irmã Tatiana e aos meus sobrinhos Isabele, Enzo e Artur por fazerem parte da minha vida e por me apoiarem em minhas decisões.

OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

Ao Alejandro pela orientação exemplar nesse trabalho. Por ter transmitido sua paixão pela ciência e pelo conhecimento, o que me incentivou todos os momentos para desenvolver esse projeto.

A Emília por suas observações com precisão cirúrgica, pela sua paciência em revisar textos e pela sua sinceridade.

A Valnice pela sua competência em manter o laboratório operante e pela pessoa maravilhosa que é.

Aos colegas de laboratório Renata, Fabiana, Heloísa, Alexandre e Márcia pela amizade e companheirismo nas discussões e experimentos realizados nesses últimos dois anos.

Aos professores do Departamento de Parasitologia que abriram as portas de seus laboratórios e não mediram esforços para solucionar problemas.

Aos colegas do Departamento de Parasitologia, alunos e funcionários, pela amizade.

A Tânia, a minha alma gêmea, por estar ao meu lado em todos os momentos e me mostrar o verdadeiro amor.

Aos meus familiares Gabriel, Tatiana, Isabele, Enzo e Artur por fazerem parte de minha vida, pelo amor e pelo companheirismo.

Aos meus pais, Stezel e Sandra, pela criação e educação que me transmitiram, pelas oportunidades que me deram, pela amizade e pelo apoio em minhas decisões.

"É na mudança que encontramos propósito" Heráclito de Éfeso

RESUMO

Sussmann RAC. Biossíntese de Vitamina E nos estágios intra-eritrocíticos de *Plasmodium falciparum* [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O estudo da biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* por meio da via 2C-metil-Deritritol-4-fosfato (MEP) é apontado como possível alvo terapêutico, visto a via ser ausente em humanos. Foi descrito que nos estágios intraeritrocitários de P. falciparum a via essencial de biossíntese de isoprenóides é a via MEP. As vias do Chiquimato e MEP são precursoras da biossíntese de vitamina E e ambas já foram descritas em *P. falciparum*. É sugerido que a biossíntese de vitamina E possa ocorrer no parasita, representando um possível alvo para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas. Empregando marcações metabólicas com precursores radioativos, três diferentes métodos de RP-HPLC e análises por espectrometria de massas confirmamos a biossíntese de vitamina E nos três estágios intraeritrocíticos do parasita. O tratamento com ácido úsnico, mostrou inibição dessa biossíntese no estágio esquizonte e do crescimento do parasita. Demonstramos por meio de uma sonda fluorescente, ácido Parinárico, que a vitamina E atua como antioxidante lipofílico, protegendo a lipoperoxidação. Esses resultados não só contribuem para a compreensão da biologia de *P. falciparum*, mas também elucidam partes das vias MEP e do Chiquimato que podem servir como alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Plasmodium falciparum. Vitamina E. Biossíntese de isoprenóides.

ABSTRACT

Sussmann RAC. Vitamin E biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* [Master thesis (Parasithology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The study of isoprenoid biosynthesis in *Plasmodium falciparum* by 2C-methyl-D-erythritol-4phosphate pathway (MEP) it is presented as a therapeutic target once that it is absent in humans. It was found in intraerythrocytic stages of *P. falciparum* the biosynthesis of isoprenoids by the MEP pathway. The shikimate and MEP pathways are the precursors of biosynthesis of vitamin E and both pathways have already been described in *P. falciparum*. It is suggested that the biosynthesis of vitamin E might occur in the parasite, representing a possible target for developing new antimalarial drugs. Using metabolic labelling with radiolabelled precursors, three different methods of RP-HPLC and mass spectrometry analyses confirmed the biosynthesis of vitamin E in the three intraerythrocytic stages of parasite. The treatment with usnic acid showed an inhibition of this biosynthesis and of the growth of parasite. We demonstrated by means of a fluorescent probe, the acid Parinaric, that vitamin E acts as a lipophilic antioxidant protecting the membrane of lipoperoxidation. These findings not only contribute to the current understanding of *P. falciparum* biology but shed light on a pathway that could serve as a chemotherapeutic target.

Keywords: Plasmodium falciparum. Vitamin E. Biosynthesis of isoprenoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP20
Figura 2. Via MEP
Figura 3. Classificação da vitamina E
Figura 4. Via do Chiquimato
Figura 5. Início, propagação e término da reação em cadeia de autooxidação28
Figura 6. Esquema de detivatização da molécula de α -tocoferol com solução de BSTFA-10%
TMCS
Figura 7. Perfil de incorporação radioativa do estágio esquizontes e hemácias não infectadas I
Figura 8. Perfil de incorporação radioativa do estágio esquizontes e hemácias não infectadas
II
Figura 9. Perfil de incorporação radioativa dos três estágios de <i>P. falciparum</i>
Figura 10. Confirmação da estrutura química por <i>ESI-MS</i> de α-tocoferol em <i>P. falciparum</i> . 45
Figura 11. Confirmação da estrutura química por GC/MS do α -tocoferol biossintetizadas
pelas formas intraeritrocitárias de <i>P. falciparum</i> 47
Figura 12. Adutos da quebra do α -tocoferol + TMS
Figura 13. Microteste com ácido úsnico
Figura 14. Teste de recuperação48
Figura 15. Efeito do ácido úsnico sobre a biossíntese de α -tocoferol nos estágios
intraeritrocitários de <i>P. falciparum</i>
Figura 16. Efeito do aumento da tensão de O_2 sobre a biossíntese de α -tocoferol nos estágios
intraeritrocitários de <i>P. falciparum</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Ensaio de lipoperoxidação I.	. 52
Tabela 2-	Ensaio de lipoperoxidação II	. 52

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
ACN	Acetonitrila
ATP	Trifosfato de adenosina
BHT	Hidroxitolueno butilado
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
BSTFA	Trifluoroacetamida
CDP-ME	4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol
CDP-MEP	4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato
Ci	Curie (1 Ci = 3.7×10^{10} desintegrações/segundo)
СМК	4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase
cpm	Contagens por minuto
cPnA	Ácido cis-parinárico (ácido 9, 11, 13, 15-cis-octadecatetraenoico)
СТР	Citidina trifosfato
CumOOH	Hidroperóxido de Cumeno
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodo
DAHP	3-desoxi-arabinoheptulsonato-7-fosfato
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOXP	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato
DXR	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase
DXS	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização por eletrospray
FOX	Medida da oxidação do ferro em xilenol laranja
FPP	Farnesil pirofosfato
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massas
GcpE	Hidroximetilbutenil difosfato sintase
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico
HMBPP	1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato
HMG	3-hidroxi-metil-glutaril
HMG-CoA	3-hidroxi-metil-glutaril-CoA
HMG-R	3-hidroxi-metil-glutaril-CoA-redutase
HMM	"Hidden Markov model"
HPP	Hidroxifenilpiruvato
HPPD	Hidroxifenilpiruvato dioxigenase
HPT	Homogentisato fitil transferase
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% de crescimento
IC ₉₀	Concentração inibitória de 90% de crescimento
IPP	Isopentenil pirofosfato
kDa	Kilo Dalton
Li	Lítio
LOD	Limite de detecção

LSD	Dietilamina ácido lisérgico
LytB	Hidroximetilbutenil difosfato redutase
MCS	2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase
МСТ	2C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidina transferase
MEcPP	2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato
MEP	2C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MVA	Mevalonato
NAD(P)H	Fosfato de dinucleotido de nicotinamida e adenina
NCBI	"Natoinal Center for Biotechnology Information"
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PEP	Fosfoenilpiruvato
PSI-BLAST	"Position-Specific Interated BLAST"
PTFE	Politetrafluoroetileno
Q-TOF	"Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer"
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa
RPMI	"Roswell Park Memorial Institute" (meio de cultura)
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilil
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-eficiência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO16
1.1 Histórico
1.2 Malária
1.3 Isoprenóides
1.3.1 Biossíntese de isoprenóides20
1.3.2 Biossíntese secundária de isoprenóides
1.4 Biossíntese de isoprenóides em Plasmodium falciparum
1.5 Vitamina E
1.6 Justificativas e Objetivos
2 METODOLOGIA
2.1 Cultura de <i>P. falciparum</i>
2.2 Marcações metabólicas
2.3 Extração de vitamina E32
2.4 Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC)32
2.5 Espectrometria de massas
2.6 Ensaios de inibição <i>in vitro</i> de culturas sincrônicas de <i>P. falciparum</i> com ácido
úsnico35
2.7 Ensaios de lipoperoxidação
2.8 Análise <i>in silico</i> para a busca de possíveis genes/seqüências codificadores de enzimas
das vias metabólicas da vitamina E
3 RESULTADOS
3.1 Marcação metabólica dos parasitas cultivados <i>in vitro</i> com precursores radioativos.40
3.1.1 Sistema I de RP-HPLC
3.1.2 Sistema II de RP-HPLC41
3.1.3 Sistema III de RP-HPLC42
3.2 Confirmação da estrutura molecular de α-tocoferol por espectrometria de massas44
3.3 Determinação do valor de IC ₅₀ do ácido úsnico e ensaios de recuperação48
3.4 Resposta da biossíntese de vitamina E ao tratamento com ácido úsnico49
3.5 Resposta da biossíntese de vitamina E ao aumento da tensão de O_2 no cultivo dos
parasitas
3.6 Função da vitamina E no metabolismo de <i>P. falciparum</i>

3.7 Análise in silico para busca de possíveis genes/seqüências codificadores de enzim	ias
das vias metabólicas da vitamina E	53
4 DISCUSSÃO	54
4.1 A biossíntese de vitamina E	55
4.1.1 Marcações metabólicas com precursores radioativos	55
4.1.2 Confirmação da presença da estrutura molecular por espectrometria de massas	56
4.1.3 Resposta da biossíntese de vitamina E dos estágios intraeritrocitários de P. falcip	arum
a diferentes tratamentos e condições de cultivo	57
4.2 Função da vitamina E no metabolismo de <i>P. falciparum</i>	59
5 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico¹

A malária é uma doença parasitária que acomete o homem e pode ser chamada de maleita, paludismo, impaludismo, febre terçã ou quartã. Apesar de a associação com malária ser incerta, existe referências a febres sazonais e intermitentes em textos religiosos e médicos que datam de 4000 a.C. entre os babilônicos, chineses e indianos que relacionavam a doença à punição de deuses e presença de maus espíritos (1).

No século V a.C., o grego Hipócrates foi o primeiro a descartar a superstição e a relacionar a doença às estações do ano ou ao local freqüentado pelos doentes. Também foi o primeiro a descrever detalhadamente o quadro clínico da malária e algumas de suas complicações, diferenciando-a das demais enfermidades febris.

Durante mais de 1500 anos pouco foi acrescentado ao conhecimento sobre a doença e seu tratamento. A partir do século XVII aumentou a preocupação com a doença, pois aumentavam também o número de casos. Até 1900, mais de 80% da população mundial era afligida pela malária, exceto as regiões polares e subpolares (1).

Em 1880, o médico do exército francês, Charles Louis Alphonse Laveran, observou formas ovaladas as quais possuíam o pigmento presente no sangue de 148 de 192 pacientes com malária e considerou que havia encontrado o parasito causador da malária. Em 1897, o médico britânico Ronald Ross elucidou o modo de transmissão, ao encontrar formas do parasito da malária no interior de um mosquito que havia se alimentado de um portador da doença. O quadro completo do ciclo de desenvolvimento do parasito, no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles*, foi obtido posteriormente por pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi em estudos realizados entre 1898 e 1899.

Na primeira metade do século XX muitas pesquisas eram dedicadas ao controle da malária, especialmente no sentido de reduzir ou eliminar a presença de criadouros do inseto transmissor, o que se mostrou bastante eficiente em algumas situações. Concomitantemente, pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas que combatessem o parasito propriamente dito começaram a ser desenvolvidas.

Com base nos conhecimentos adquiridos sobre o inseto transmissor, nas características de inseticida residual do DDT e na existência de drogas efetivas para o tratamento da malária, muitos foram levados a crer na possibilidade de erradicação da doença no mundo,

¹ Todas as informações apresentadas no histórico foram obtidas dos sites www.sucen.sp.gov.br; www.rph.wa.gov.au; www.who.int; www.malaria.org; do artigo Camargo, E.P. Malária, maleita, paludismo. Ciência e Cultura, 2003. 55(1): p. 26-29 (1).

impulsionando a elaboração da campanha de erradicação da malária na Itália (1946-1950) e, depois, para a grande campanha de erradicação da malária em escala mundial, coordenada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no período de 1957-1969. A proposta da campanha era de erradicação da transmissão em curto prazo baseada em 4 fases: 1) preparatória, com reconhecimento das áreas afetadas e do problema epidemiológico, e treinamento de pessoal; 2) ataque, com controle do vetor por meio de aplicação da inseticidas nas casas e tratamento das pessoas; 3) de consolidação, com suspensão das medidas de controle e vigilância para possíveis surtos; 4) de manutenção e vigilância.

Nos Estados Unidos e na maior parte da Europa, essa campanha, juntamente com novas práticas de agricultura e construção de casas, resultou na erradicação da malária. Na Índia, onde o programa de erradicação foi considerado um exemplo, houve uma redução de 75 milhões de casos em 1958 para 50 mil em 1964.

Segundo a OMS, após 15 anos de campanhas de erradicação, a população mundial em risco foi reduzida de 70% para 41%. Entretanto, após a década de 1970, o sucesso do programa não foi mantido devido ao alto custo, sendo desativado. A partir de 1970, começaram a ocorrer mais de 300 milhões de casos anualmente da doença e mais de 1 milhão de mortes eram atribuídas diretamente à malária. Esse quadro epidemiológico se mantém até os dias de hoje.

1.2 Malária

Existem quatro espécies que podem causar malária no homem, *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale.* A primeira é a espécie responsável pela forma mais grave da doença que pode levar ao óbito. Ocorre apenas em regiões tropicais e subtropicais e afeta principalmente países subdesenvolvidos.

Atualmente, segundo a OMS são relatados em regiões endêmicas de 400 a 500 milhões de casos e que morrem de 0,7 a 2,7 milhões de pessoas com malária a cada ano. Dessas mortes, 90% estão concentradas na África afetando principalmente crianças menores de 5 anos e gestantes (2-4). Porém, Breman (5) acredita que tais números não condizem com a realidade e estima que 20% dos casos reais de malária são relatados e que os outros 80% ficam no anonimato.

Compostos contra a malária são conhecidos na China há 3000 anos. Os incas, no século XVI, e depois deles o mundo todo, já usavam o extrato da casca da quina para o tratamento da malária. Já no século XVII, jesuítas encontraram o mesmo princípio ativo

utilizado pelos indígenas do Brasil. O quinino é o princípio ativo da quina de uso contemporâneo. Entre os principais compostos antimaláricos utilizados na terapêutica da doença encontram-se os aminoquinolinos (cloroquina, amodiaquina, primaquina, quinina, quindina e mefloquina), os antifolatos (sulfadoxina), as diaminopirimidinas (pirimetamina), os sesquiterpenos lactonas (artemisinina, artemeter, artesunato) e alguns antibióticos (6). A artemisinina e seus derivados são hoje usados em combinação com as demais drogas no tratamento da malária por não ter apresentado uma resistência disseminada. Entretanto, o que vem se observando é o aumento da resistência aos antimaláricos e acreditam que é só questão de tempo para o aparecimento de resistência à artemisinina, o que agrava a situação de saúde pública.

Essa resistência se intensifica devido ao uso inadequado de novas drogas, aos recursos financeiros limitados, aos movimentos populacionais, aos serviços de saúde inadequados e à falta de medidas de controle eficientes, levando ao aumento dos casos de morbidade e mortalidade. O *Plasmodium falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença e sua crescente resistência às drogas utilizadas na terapêutica levam à necessidade de estudos sobre novos antimaláricos (7-10).

As linhas de pesquisa para o desenvolvimento de antimaláricos seguem áreas como: inativação da biossíntese de membranas (11-13); vias metabólicas localizadas no apicoplasto (14-17); quinases envolvidas no ciclo celular (18-19); biossíntese de isoprenóides (20-29) e vias metabólicas localizadas na mitocôndria do parasito (30). Nosso grupo tem trabalhado, nos últimos anos, com a caracterização de produtos da biossíntese de isoprenóides em *P*. *falciparum* (21-29) resultantes da via alternativa 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (20).

Nesse contexto, a biossíntese de isoprenóides nas formas intraeritrocitárias do parasito tem ocupado um lugar de destaque como potencial alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o combate dessa doença. Isso se deve ao fato de que os compostos produzidos por essa via são de suma importância para a sobrevivência de qualquer célula e ao fato de que a via de biossíntese presente no parasito é diferente da via de biossíntese de isoprenóides presente em humanos (10, 20).

1.3 Isoprenóides

Os prenóis, também chamados de isoprenóides, constituem a mais divergente e grande família de compostos naturais, estando presente em todos os organismos vivos. Até o momento, são conhecidos mais de 30.000 compostos isoprênicos na natureza, sendo

metabólitos essenciais para diversas funções celulares, incluindo compostos como ubiquinonas, dolicóis, compostos isoprênicos ligados às proteínas e RNA, hormônios em animais e plantas, carotenóides, vitaminas e óleos essenciais (31).

Eles desempenham funções como manutenção da fluidez de membrana e agem como hormônios ou sais biliares. São necessários para organismos fotossintéticos e possuem atividades antioxidantes (carotenóides e vitaminas). Ubiquinona, menaquinona e plastoquinona estão envolvidas no transporte de elétrons. Dolicóis, além de estarem envolvidos na glicosilação de proteínas, podem servir para ancoragem de proteínas a membranas. Muitas proteínas estão ancoradas a membranas via âncoras isoprênicas.

Em plantas, hormônios de baixo peso molecular como giberilinas, ácido abscísico e brasinolides são fundamentais para o desenvolvimento desses organismos. O mesmo ocorre com hormônios sexuais esteróides e corticosteróides em animais, todos derivados de isoprenóides. Muitos antibióticos, fitoalexinas, repelentes e até drogas alucinógenas (LSD) possuem estruturas derivadas de compostos isoprênicos.

A unidade básica de todo isoprenóide é uma molécula de cinco carbonos de fórmula C_5H_8 isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Figura 1). Assim, todo composto isoprênico possui um esqueleto carbônico básico com fórmula $(C_5H_8)_n$. Dependendo da classe de composto isoprênico, essa fórmula pode apresentar variações pela adição de hidroxilas, ciclização da molécula ou outras modificações.



Figura 1. Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP.

1.3.1 Biossíntese de isoprenóides

A via do Mevalonato (MVA), também conhecida como "via clássica", desde sua descoberta, acreditou-se que era a responsável pela produção de poliisoprenóides em todos os organismos vivos. A via MVA começa com a conversão de duas moléculas de acetil-CoA a 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA. Esta molécula sofre então, em seqüência, redução, fosforilação e decarboxilação, gerando IPP, que é transformado em seu isômero DMAPP pela enzima IPP isomerase. Após a descoberta de que a enzima 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA-redutase (HMG-R), que catalisa a reação de 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonato, é o

ponto principal de regulação dessa via (32), e que o mevalonato é o primeiro composto único dessa via, ela começou a ser chamada de "via do mevalonato". Vários inibidores para a HMG-R foram encontrados e são chamados de estatinas, usadas para a redução dos níveis de colesterol em humanos. As estatinas são moléculas que apresentam uma semelhança estrutural com HMG e atuam como inibidores competitivos da enzima HMG-R (33). As enzimas que atuam nas etapas de biossíntese dessa via foram isoladas em uma grande variedade de organismos, incluindo animais e plantas, e, em todos esses organismos, essas enzimas estão localizadas no citosol da célula.

Porém, começaram a surgir resultados inconsistentes com a via do mevalonato em bactérias. Estudos com [¹³C]acetato (um precursor da via do mevalonato) mostraram que essa molécula não era incorporada em ubiquinonas de *Echerichia coli* (34). Tais dados somados ao fato de que mevinoline, um inibidor específico da enzima HMG-CoA redutase, não inibia o crescimento de *Escherichia coli* (34), levaram a acreditar na existência de uma nova via de biossíntese de isoprenóides em alguns organismos. Cinco anos mais tarde, em 1996, essa outra via de biossíntese de isoprenóides seria descrita.

Essa segunda via descrita foi a do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) ou "via alternativa". A via comeca com a condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato, pela enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS) formando 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DOXP) (35), enzima esta que é dependente de tiamina (vitamina B₁) (36). A DOXP é o primeiro intermediário da via, mas não é exclusivo, sendo utilizado também para a biossíntese de piridoxal (vitamina B₆) (37-38) e tiamina (vitamina B_1) (39). Na etapa seguinte, a enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR) catalisa simultaneamente o rearranjo intramolecular e redução da DOXP em MEP (40). A enzima que catalisa essa etapa da via é inibida por um composto utilizado inicialmente como herbicida, chamado fosmidomicina (ácido fosfônico) (41). Posteriormente, o MEP é ligado a uma molécula de citidina trifosfato (CTP) para produzir 4-(citidina-5difosfo)-2C-metil-D-eritritol (CDP-ME), em uma reação catalisada pela enzima 2C-metil-Deritritol-4-fosfato citidina transferase (MCT) (42). A enzima 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase (CMK) (uma enzima dependente de ATP) fosforila o CDP-ME, produzindo 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP). No passo seguinte, o CDP-MEP é convertido em 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP) pela ação da enzima 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (MCS) (43-44). O produto MEcPP é reduzido a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) pela enzima hidroximetilbutenil difosfato sintase (GcpE) (45-46). Posteriormente, o HMBPP é convertido em IPP e DMAPP pela hidroximetilbutenil difosfato redutase (LytB) (46-48) (Figura 2).



Via MEP

Figura 2. Via MEP. À esquerda estão as estruturas moleculares dos intermediários da via e à direita entre os nomes dos intermediários estão as enzimas. O símbolo ^S está represento o local de atuação da fosmidomicina (DXR). Intermediários: GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DOXP, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato; MEP, 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato; CDP-ME, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol; CDP-MEP, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato; MEcPP, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato; HMBPP, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato. Enzimas: DXS, 1-deoxi-D-xilulose 5- fosfato sintase; DXR, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase; MCT, 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidina-transferase; CMK, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase; MCS, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase; GcpE, hidrometilbutenil pirofosfato sintase; Lyt B, hidrometilbutenil pirofosfato redutase; IPP isomerase, isopentenil pirofosfato isomerase.

1.3.2 Biossíntese secundária de isoprenóides

Após a síntese do isopentenil pirofosfato (IPP) e do dimetilalil pirofosfato (DMAPP), esses intermediários passam para o metabolismo secundário de isoprenóides, que consiste basicamente no alongamento inicial da cadeia isoprênica, passando posteriormente por diferentes modificações para a formação dos diferentes produtos derivados da biossíntese de isoprenóides.

Inicialmente, uma molécula de IPP é ligada com uma molécula DMAPP, por meio de enzimas chamadas preniltransferases, dando origem ao geranil pirofosfato (GPP, 10 carbonos). O GPP é ligado a um IPP, originando o farnesil pirofosfato (FPP, 15 carbonos) que, por sua vez, é ligado a mais uma molécula de IPP, dando origem ao geranilgeranil pirofosfato (GGPP, 20 carbonos). A partir desse ponto, a cadeia isoprênica pode continuar a ser aumentada pela adição de moléculas de IPP e serem ligadas a proteínas, RNA ou a anéis aromáticos formando ubiquinonas e vitaminas, ou duas moléculas de GGPP podem ser ligadas e dar origem ao fitoeno, molécula-base para a biossíntese de carotenóides.

Em fungos, mamíferos, alguns protozoários e arqueobactérias os isoprenóides derivam da via clássica do MVA. Enquanto que em algas, eubactérias, cianobactérias e protozoários do filo apicomplexa a via MEP é essencial para a biossíntese desses compostos. As plantas superiores apresentam ambas as vias, no entanto em locais diferentes. A via MVA ocorre no citoplasma e a via MEP ocorre nos plastídeos (49-52).

A organela presente em alguns organismos do filo Apicomplexa - Apicoplasto - se assemelha aos plastídeos de plantas (14, 17). Estudos mostram indícios da existência de uma endosimbiose de um plastídeo que ocorreu nos organismos do filo. Essa organela manteve algumas características de organismos fotossintetizantes (53).

1.4 Biossíntese de isoprenóides em Plasmodium falciparum

Em 1999, Jomaa et al. (54) identificaram em *P. falciparum* os genes que codificam as enzimas-chave da via MEP, 1-Deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DOXP-sintase) e 1-Deoxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase (DOXP-redutoisomerase). A primeira catalisa a condensação do D-gliceraldeido 3-fosfato e do piruvato formando o 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato, enquanto a segunda catalisa o rearranjo molecular e reduz esse produto nas formas isoprênicas básicas (31). Estudos foram realizados pelo mesmo grupo utilizando fosmidomicina e um análogo a este antibiótico o FR900098, os quais inibem a enzima DOXP-redutoisomerase. A administração dos dois compostos em ensaios *in vitro* inibiu o crescimento da cultura; já nos estudos em camundongos houve uma queda na parasitemia chegando a <1% e depois de 8 dias estavam curados. Porém, quando o tratamento foi feito em 4 dias observou-se recrudescência (54), indicando que a simples monoterapia com fosmidomicina ou seu análogo pode não ser suficiente para os casos clínicos de malária (55-

57). Em 2004, Cassera et al. (23) demonstraram que a via MEP era funcionalmente ativa em *P. falciparum* isolando e caracterizando os produtos intermediários. O estudo, além de confirmar a presença da via no parasito, apresentou pela primeira vez a biossíntese de piridoxina 5-fosfato em um protozoário do filo Apicomplexa.

Foi demonstrado em nosso laboratório que, os três estágios intraeritrocitários de *P*. *falciparum*, biossintetizam isoprenóides que se ligam a proteínas. O estudo foi realizado por meio de marcações metabólicas com [³H]geranilgeranil-PP ([³H]GGPP) as quais apresentaram bandas de proteínas com pesos moleculares aproximados de 6-7 kDa, 21-28 kDa nos três estágios parasitários. Quando o precursor utilizado foi o [³H]farnesil-PP ([³H]FPP), além das bandas com peso molecular igual às marcadas com [³H]GGPP, uma nova banda de peptídeo com peso molecular aproximado de 50 kDa foi detectada. Já, Moura et al. (25) fizeram experimentos de imunoprecipitação com anticorpos monoclonais anti-Ras e anti-Rap que reconhecem as proteínas p21^{ras} e p21^{rap} do parasito, marcados metabolicamente com os mesmos precursores radioativos para demonstrar a isoprenilação de proteínas. Foi demonstrado também que poliisoprenódes como os dolicóis se ligam às proteínas (11).

O parasito biossintetiza cadeias isoprênicas ligadas ao anel benzoquinona da coenzima Q de 8 e 9 unidades e a síntese dessas são inibidas pelo nerolidol, cujo efeito é interferir no alongamento das cadeias isoprênicas (22). Em 2005, Tonhosolo et al. (27) clonaram e expressaram uma octaprenil pirofosfato sintase de *P. falciparum* cuja função é o alongamento da cadeia isoprênica que se liga ao anel benzoquinona. Rodrigues Goulart et al. (26) testaram diferentes terpenos que apresentaram ação inibitória na biossíntese de dolicóis e da cadeia isoprênica ligada ao anel de benzoquinona das ubiquinonas.

Nosso grupo identificou, por marcação metabólica com $[1-^{14}C]$ acetato de sódio em culturas assincrônicas, a presença de moléculas que eluíam em tempos de retenção diferentes às dos isoprenóides anteriormente caracterizados através do método de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC). Recentemente, confirmou-se que esses compostos realmente eram carotenóides biossintetizados por *P. falciparum*, compostos pela primeira vez caracterizados em parasitos (28).

A presença da via ativa para a biossíntese de carotenóides em *P. falciparum* nos remete a dar atenção ao apicoplasto. Por ser uma organela muito similar aos plastídios de plantas, acredita-se que possa apresentar o mesmo perfil metabólico (14, 17), em que a via MEP é utilizada para a biossíntese de carotenóides e vitaminas A, E e K, entre outros produtos, até então, considerados de biossíntese exclusiva em organismos fotossintéticos.

1.5 Vitamina E

A vitamina E é representada pelo grupo dos tocoferóis e tocotrienóis que compreendem oito compostos lipossolúveis formados por um anel de cromanol ligado a uma cadeia isoprênica (Figura 3). Eles se diferenciam no número e posição dos grupos metila do anel e nas insaturações da cadeia isoprênica (31). Entretanto, o α -tocoferol (5,7,8-trimetiltocoferol) é a forma que apresenta maior bioatividade. Sua principal função é a de proteção das membranas contra a peroxidação (31, 58).



Figura 3. Classificação da vitamina E. (A) Tocoferóis. (B) Tocotrienóis.

Dos componentes do α-tocoferol, a cadeia isôprenica denominada Fitil pirofosfato é proveniente da via MEP, já o anel de cromanol é proveniente da via do Chiquimato (Figura 4) sendo homogentisato o precursor (31).

Via do Chiquimato



Figura 4. Via do Chiquimato. À direita estão representados os nomes de intermediários da via e o nome da respectiva enzima. À esquerda estão as formas moleculares. Os símbolos ^S e as setas tracejadas representam o local de inibição do glifosato, ácido úsnico e os intermediários omitidos, respectivamente. <u>Intermediário</u>: PEP, Fosfoenilpiruvato. <u>Enzima</u>: HFT, homogentisato fitil transferase.

Essa via inicia-se da condensação do fosfoenilpiruvato (PEP) e D-eritrose 4-P formando 3-desoxi-arabinoheptulsonato-7-fosfato (DAHP), numa reação catalisada pela enzima DAHP sintase. Essa molécula sofre uma desidratação e redução para formar o ácido chiquímico (chiquimato). O chiquimato é fosforilado e é agregado a ele uma molécula de PEP formando o 5-O-(1-carboxivinil)-3-P chiquimato. A enzima 3-P chiquimato 1- carboxiviniltransferase é responsável por essa reação e alvo de inibição do glifosato. Depois de uma desfosforilação pela corismato sintase é formado o corismato (59). Essa molécula é um ponto de ramificação importante da via onde podem ser originados diversos compostos como fenilalanina, tirosina, 4-hidroxifenilpiruvato, triptofano, ubiquinonas, entre outros (31). Para a formação de α -tocoferol é necessário que a partir do corismato seja formado tirosina e

hidroxifenilpiruvato (HPP). O HPP é descarboxilado pela hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD) e forma o homogentisato (60) o qual pode ser ligado à cadeia isoprênica fitil (tocoferóis) pela enzima homogentisato fitil transferase (HPT) ou cadeia isoprênica GGPP (tocotrienóis) pela enzima preniltransferase. A descarboxilação do HPP pode ser inibida pelo ácido úsnico.

O glifosato não se liga à enzima 3-P chiquimato 1-carboxiviniltransferase sozinha, mas sim ao complexo enzima-chiquimato 3-P. A ligação do glifosato é competitiva com o PEP. Por algum tempo, o complexo enzima-chiquimato 3-P-glifosato foi considerado um estado de transição análogo no qual o glifosato substitui o PEP. O interessante é que outras enzimas que possuem o PEP como substrato, não são inibidas pelo glifosato (61). As distâncias das ligações no complexo enzima-chiquimato 3-P-glifosato foram medidas por ressonância magnética nuclear (RMN) (62) e outros dados indicam que o complexo pode não ser um estado de transição análogo (63), pois aparentemente, o PEP e o glifosato se ligam à enzima de maneiras diferentes (64).

Já o ácido úsnico é um inibidor por competição tempo-dependente que se liga fortemente à enzima HPPD. Existem dois enantiomeros, (-)-ácido ùsnico e (+)-ácido úsnico, os quais se diferenciam pela posição de um grupo metila. O primeiro é apresentado como melhor inibidor que o segundo. A base dessa diferença de atividade pode ser associada com o efeito que o grupo metila tem na configuração das estruturas. Essa diferença estequiométrica pode afetar a ligação do ácido úsnico na enzima HPPD (65).

Estudos mostram que compostos conhecidos como vitamina E são potentes antioxidantes que protegem ácidos graxos poliinsaturados da peroxidação lipídica. Essa atividade resulta da capacidade de reagir diretamente com compostos reativos como radicais livres lipídicos, espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Entretanto a principal função da vitamina E é evitar a autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados (66-67). Para o esclarecimento da atividade antioxidante da vitamina E, uma sucinta explicação do mecanismo de autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados será dada posteriormente.

A autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados é um processo de reações com radicais. Uma vez que um radical lipídico é formado, ele reage rapidamente com oxigênio; o radical peroxila resultante retira um hidrogênio de outro ácido graxo tendo como produtos o hidroperóxido e um novo radical lipídico, causando assim, uma reação em cadeia. A tarefa e capacidade de um antioxidante é interromper eficientemente essa reação em cadeia (Figura 5) (66).

Início (retirada de hidrogênio)

L-H + X

------ L• + XH

Propagação (reação em cadeia de autoxidação)



Figura 5. Início, propagação e término da reação em cadeia de autooxidação. A retirada de um hidrogênio de um metileno bis-alílico de um ácido graxo poliinsaturado (L-H) pode ser realizada por vários agentes (X), incluindo íons metálicos, radiações UV, superóxido, radicais sintéticos iniciadores. A reação com o radical lipídico (L^{*}) com uma molécula de oxigênio (O₂) é muito rápida e forma o radical peroxila (LOO^{*}). A propagação da reação em cadeia é a retirada de hidrogênio pelo radical peroxila de outro ácido graxo. Esta é a mais lenta das reações e radical peroxila é o principal alvo para a reação do antioxidante. O término se dá quando α-tocoferol (TH) doa um hidrogênio do grupo hidroxila do anel de cromanol para um radical peroxila. São formados radicais mais estáveis, o hidroperoxido (LOOH) e o tocoferoxila (T^{*}). A taxa de transferência de hidrogênio do α-tocoferol para o radical peroxila é por volta de 4 vezes mais rápida do que o radical peroxila retira hidrogênio de outro ácido graxo. Outras reações resultam no término da reação em cadeia são a reação do radical tocoferoxila com um radical peroxila do que o radicai peroxila. Ambas reações resultam em produtos estáveis. Modificado de [66].

A eficiência antioxidante da vitamina E é otimizada através da reciclagem dos seus produtos oxidados. Esse processo, também chamado ciclos redox do α -tocoferol, é importante na função antioxidante da vitamina E (68). A reciclagem *in vitro* do α -tocoferol, a partir de seu radical tocoferoxila, pode ser mediada pela vitamina A (69-71), vitamina C (72-74) e coenzima Q (75, 76). Entretanto, existem dúvidas sobre a significância da reciclagem pelas vitaminas A e C *in vivo* (77).

1.6 Justificativas e Objetivos

Para verificar a existência da via do Chiquimato em *P. falciparum*, Roberts et al. (16) testaram em representantes do filo apicomplexa, inclusive em *P. falciparum*, o herbicida glifosato, o qual inibe, por competição com o PEP, a formação do precursor do Corismato, um composto que pode servir em plantas e cianobactérias para a formação de inúmeros compostos como fenilalanina, tirosina, 4-hidroxifenilpiruvato, triptofano, ubiquinonas, entre outros (31). Os resultados mostraram que o herbicida inibiu o crescimento de culturas de *P. falciparum* e *Criptosporidium parvum* em concentrações na ordem de 1 mM. No mesmo

trabalho, o grupo caracterizou os genes responsáveis pela síntese de Corismato em *P*. *falciparum* demonstrando geneticamente que existe a via do Chiquimato no parasito.

A relação entre a parasitemia em malária e nutrientes antioxidantes, em particular a vitamina E, pode ser entendida do princípio de que o parasito é sensível ao estresse oxidativo e sendo os tocoferóis antioxidantes, poderiam atuar como promotores ou inibidores do desenvolvimento de *P. falciparum*. Para testar essa hipótese, um estudo testou diferentes concentrações de vitamina E *in vitro*. Observou-se um aumento na parasitemia quando se utilizava concentrações séricas normais de vitamina E, comparadas à concentrações sub fisiológicas. Quando a concentração do antioxidante atinge níveis supra fisiológicos, ela atuou como um inibidor de crescimento (78).

Outras evidências *in vivo* mostram que o tratamento com antimaláricos como Qinghaosu (79) ou óleo de *Brevoortia tyrannus* (80) somados a dieta sem tocoferóis e selênio, mostraram-se mais eficientes no combate aos níveis de infecção por *P. yoeli* em camundongos tratados.

A questão é que se a vitamina E apresenta um papel importante no crescimento e desenvolvimento de formas intraeritrocitárias do parasito e temos, em potencial, as duas vias responsáveis por sua biossíntese, será que *P. falciparum* biossintetizaria tocoferóis?

Com base nas informações acima os objetivos dessa dissertação foram:

• Caracterizar bioquimicamente a via metabólica de vitamina E nas formas intraeritrocitárias de *P. falciparum;*

• Observar o efeito do ácido úsnico na biossíntese de vitamina E e no crescimento de *P. falciparum;*

• Determinar a possível função biológica/fisiológica da vitamina E nos estágios intraeritrocitários do parasita.

• Identificar em *P. falciparum* genes/seqüências candidatos a codificadores de enzimas responsáveis da biossíntese de vitamina E.

2 METODOLOGIA

2.1 Cultura de P. falciparum

O cultivo da cepa 3D7 de *P. falciparum* foi realizado em garrafas de cultivo em meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de Hepes, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 mM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 g/ml de gentamicina e 0,5% (v/v) de AlbuMAX. Eritrócitos foram adicionados à cultura obtendo um hematócrito de 1 a 3%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C com trocas diárias de meio e injeção de uma mistura gasosa composta por 5% CO2, 5% O₂ (ou 20%) e 90% N₂ (ou 75%). O controle da parasitemia foi feito com a verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa (81).

A sincronização da cultura de *P. falciparum* foi feita com Sorbitol (5%). Este açúcar quando em solução lisa hemácias infectadas com as formas maduras do parasita (trofozoíta e esquizonte) deixando íntegras apenas hemácias com as formas mais jovens (anel) que são devolvidas à cultura. As culturas com mais de 10% de parasitemia, a maioria no estágio anel jovem, foram centrifugadas a 800 x g por 10 minutos. Após retirar o sobrenadante é adicionado o Sorbitol na proporção 1:25 (v/v, *pellet*:solução a 37 °C). Após incubar em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, a solução é centrifugada a 800 x g por 10 minutos. O *pellet* que corresponde a um concentrado de parasitos sincronizados no estágio anel é introduzido novamente na cultura (82).

Para a separação das formas intraeritrocitárias de cada estágio parasitário de *P*. *falciparum* anel (trofozoíto jovem), trofozoíto maduro e esquizonte, foi empregado um gradiente descontínuo de Percoll. Um mililitro de cultura foi adicionado em tubos de vidro Corex (Du PontTM, USA) de 18 ml contendo 3, 4 e 2 ml das soluções de Percoll de 80, 70 e 40%, respectivamente, e centrifugados a 10.000 *x g* por 30 minutos a 25 °C. Nessas condições as formas esquizontes ficam na fração 40%, trofozoítas entre 70 e 80% e anéis e hemácias não infectadas na fração de 80%. Os parasitos foram coletados e lavados três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) (30 mM Na₂HPO₄, 6 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 120 mM NaCl). Após essa lavagem os parasitas no estágio anel foram liberados das hemácias por lise com saponina 0,1% (p/v). O volume do precipitado de cada estágio foi medido e congelado em nitrogênio líquido para posterior análise (83). Essa técnica nos possibilitou avaliar separadamente se a biossíntese da vitamina E ocorreria nos três estágios intraeritrocitários e em que quantidade.

2.2 Marcações metabólicas

Culturas de *P. falciparum* com pelo menos 10% de parasitemia e sincronizadas no estágio anel foram marcadas com Geranilgeranil pirofosfato tritiado ([³H]GGPP) (14 Ci/mmol, 1 mCi/ml; Amersham, Buckinghamshire, UK) ou Farnesil pirofosfato tritiado [³H]FPP (16 Ci/mmol, 200 μ Ci/ml; Amersham) por 10 a 14 horas. Após o tratamento, as formas intraeritrocitárias foram separadas por gradiente descontínuo de Percoll de 80, 70 e 40% e congeladas em nitrogênio líquido N₂ (-170 °C) para posterior extração (11).

2.3 Extração de vitamina E

A cada $1,5.x10^9$ parasitas (300µL) foi adicionado 1 mL de água deionizada em tubos de vidro Corex de 18 ml. A lise das células foi feita por utrassom em um disruptor de células e as proteínas foram precipitadas adicionando 200µL etanol-0,01% hidroxitolueno butilado (BHT). Depois de misturar por 1 min em um vortex foram adicionados 2 mL de n-hexano-0,01% BHT. A amostra foi misturada por mais 1 minuto em um Vortex e centrifugada a 2700 *x g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e evaporado em uma corrente de nitrogênio a temperatura ambiente. O resíduo foi ressuspenso em 500 µL da fase móvel - depende do sistema utilizado - e submetido à purificação por RP-HPLC (84-86) e/ou às técnicas de espectrometria de massas (87, 88).

2.4 Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC)

Padronizamos vários sistemas de RP-HPLC. Em três sistemas foi possível separar a vitamina E dos demais compostos isoprênicos existentes em *P. falciparum*. Precisávamos de sistemas que separassem o α-tocoferol dos outros isoprenóides já descritos no organismo e que utilizam isopentenil pirofosfato tritiado ([³H]IPP), [³H]GGPP ou [³H]FPP como precursor. Em todos os sistemas de RP-HPLC ensaiados, foram determinados os tempos de retenção de compostos isoprênicos como poliisoprenóides, carotenóides, ubiquinonas, entre outros.

Dos três sistemas de RP-HPLC utilizados, dois são isocráticos e um é gradiente. Em todos os casos foi empregada como fase estacionária a coluna Phenomenex Luna C_{18} (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) (Phenomenex, CA, USA) acoplada a pré-coluna C_{18} (Phenomenex, CA, USA), um detector UV Gilson 152/UV-vis ou um detector de arranjo de diodo (DAD)

Gilson 170 e um coletor de frações FC203B. O software utilizado para o processamento de dados foi o Unipoint[™] LC 3.0 System Software.

Protocolo I. Sistema isocrático com fase móvel metanol:acetonitrila:tetrahidrofurano (75:20:5)-0,01% BHT, um fluxo de 0,6 mL/min. O comprimento de onda monitorado foi de 290 nm (84). A fase móvel foi filtrada em uma membrana de PTFE de 0,20 µm. O padrão de α -tocoferol foi analisado sob essas condições e seu tempo de retenção é de 18,5 minutos. As frações radioativas provenientes de esquizontes e hemácias não infectadas marcados metabolicamente foram secas por evaporação em uma capela a temperatura ambiente e ressupensas em líquido de cintilação. A quantificação da radioatividade (c.p.m) foi realizada no aparelho *Beckman 5000* β*-radiation scintillation counter (Beackman, CA, USA)*.

Protocolo II. Sistema isocrático com fase móvel metanol:etanol (50:50)-0,01% BHT, um fluxo de 1 mL/min. O comprimento de onda monitorado foi de 290nm (86). A fase móvel foi filtrada em uma membrana de PTFE de 0,20 µm. O padrão de α-tocoferol foi analisado sob essas condições e seu tempo de retenção é de 12 minutos. As frações radioativas provenientes de esquizontes e hemácias não infectadas marcados metabolicamente foram secas por evaporação em uma capela a temperatura ambiente e ressupensas em líquido de cintilação. A quantificação da radioatividade (c.p.m) foi realizada no aparelho *Beckman 5000 β-radiation scintillation counter (Beackman, CA, USA)*.

Protocolo III. Um sistema de gradiente linear, com fase móvel solvente A metanol e solvente B acetonitrila começando com 50/50% (A/B) e terminando em 28 minutos a 30/70% (A/B) a um fluxo de 1 mL/min. O comprimento de onda monitorado foi de 290nm (85). A fase móvel foi filtrada em uma membrana de PTFE (solvente A) e NYLON (solvente B) de 0,20 µm. O padrão de α-tocoferol foi analisado sob essas condições e seu tempo de retenção é de 16,5 minutos. As frações radioativas provenientes dos estágios esquizonte, trofozoíto e anel marcados metabolicamente foram secas por evaporação em uma capela a temperatura ambiente e ressupensas em líquido de cintilação. A quantificação da radioatividade (c.p.m) foi realizada no aparelho *Beckman 5000* β*-radiation scintillation counter (Beackman, CA, USA)*.

2.5 Espectrometria de massas

Submetemos as frações, de amostras de 10^{10} parasitas nos estágios de esquizonte e trofozoíto (2 mL), referentes ao tempo de retenção do padrão de α -tocoferol, à análise de espectrometria de massas no modelo LCQ DuoTM (ThermoFinnigan, EUA), acoplado a um Nano HPLC (LC-Packings, modelo Ultimate) ajustado para o fluxo de 250 µL/min. O

solvente utilizado foi acetonitrila (ACN) 80%-0,2% de Ácido Fórmico. Foi utilizada uma nano-fonte de ionização tipo *eletrospray* (ESI) do espectrômetro de massas, operada em modo positivo, com potencial ajustado para 4.5kV e temperatura do capilar aquecido ajustada para 180 °C. Os espectros foram processados com o software Xcalibur® 2.0 (Copyright © Thermo Electron Corporation, USA) (87).

A segunda técnica de espectrometria de massas foi feita em colaboração com o Professor Doutor Fábio Cesar Gozzo (Instituto de Química, Universidade de Campinas - UNICAMP, São Paulo). Foi utilizado um *Ion Trap Time-of-flyght* (Q-TOF). A extração da vitamina E foi feita em 2.10^{10} de parasitas nos estágios esquizonte e trofozoíto (4 mL). Metade da amostra foi processada pelo sistema I de RP-HPLC para infusão direta, enquanto que a outra metade foi analisada pela coluna C18 de cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC). Esse último sistema consistiu em eluir a amostra aumentando a concentração de ACN de 60% até 95% em 15 minutos permanecendo em 95% por 10 minutos e voltando a 60% com um fluxo de 4 μ L/min. Os espectros foram adquiridos no modo positivo, com janela de *m*/z50 – 1000, durante 30 minutos.

A terceira técnica de espectrometria de massas consistiu em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS) (88). Utilizamos um espectrômetro de massa de impacto de elétrons GC-MS (Gas chromatography – Mass spectrometry) Y2K ion trap mass spectrometer (MS) PolarisQ System (Finnigan, ThermoQUEST Inc., San Jose, CA), composto por PolarisQ MS, TRACE GC e um programa de análise de dados Xcalibur versão 1.3. Para o experimento foi empregada uma coluna de 30 m por 0,25 mm OV-5ms 0,25 micron (Ohio Valley, USA). Os parâmetros para o GC foram: a temperatura do injetor foi de 230 °C equipado com um liner splitless, o forno começou com uma temperatura de 70 °C por 4 minutos e seguiu-se um aumento gradativo de 15 °C/min até atingir 320 °C. Essa temperatura foi mantida por 3 minutos e depois retornada às condições iniciais. A linha de transferência foi mantida a 295 °C. O fluxo foi de 1mL/min de hélio. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com a fonte de íons a uma temperatura de 200 °C onde foram realizados dois segmentos de aquisição. O primeiro foi monitorada uma janela de m/z50 a 650 (*Full-ms*) e o segundo foi monitorado o íon 502 m/z que corresponde ao α -tocoferol + trimetilsilil (TMS) e feita a sua quebra (Ms2). A energia de excitação foi 0.30 e amplitude 1.30 V. Os ions resultantes da quebra monitorados foram o m/z 236, 237 e 277.

Para essa última técnica foi necessário derivatizar a molécula de α-tocoferol com N,O-(bistrimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) comercializados pela Sigma-Aldrich, Brasil (Figura 6). Para tanto, foram adquiridos os reagentes de derivatização, BSTFA e TMCS (88). A derivatização baseia-se na reação da molécula TMCS com o grupo hidroxila do anel de cromanol da vitamina E (Figura 6).



Figura 6. Esquema de detivatização da molécula de α-tocoferol com solução de BSTFA-10% TMCS. A. Trimetilclorosilano (TMCS). B. α-tocoferol. C. α-tocoferol + trimetilsilil (TMS).

Primeiramente foi feita uma solução de BSTFA com 10% de TMCS. Em seguida misturamos 200 μ L dessa solução a cada 4 μ g de α -tocoferol ou ao extrato de parasitas. A reação foi realizada a temperatura ambiente durante toda noite. Depois, evaporamos a solução derivatizante sob uma corrente de nitrogênio e ressuspendemos no solvente de injeção, no caso hexano.

Nos três experimentos ensaiados foram analisadas quantidades equivalentes de hemácias e meio de cultura com os mesmos procedimentos descritos para as amostras de parasitas.

2.6 Ensaios de inibição in vitro de culturas sincrônicas de P. falciparum com ácido úsnico

O ácido úsnico é um pigmento amarelado resultante do metabolismo secundário de fungos que vivem em simbiose com organismos fotossintéticos - os liquens. Foi primeiramente descrito como um antibiótico (89) e depois foram descritas algumas atividades como bactericida (90), inseticida (91), antiprotozoário (92-94), analgésica e antipirética (95), antiviral (96-97), entre outras. Nosso objetivo foi avaliar se essa droga afeta a biossíntese de α -tocoferol em *P. falciparum*, pois Meazza (98) mostrou que o ácido úsnico inibe a enzima HPPD a qual é responsável pela formação do homogentisato, um precursor direto da vitamina E.
Utilizamos o método de Desjardins (99) para determinação da concentração inibitória de 50 e 90% (valores de IC₅₀ e IC₉₀) dos parasitas. Esse experimento foi feito em placas de cultura de células com 96 poços (Eppendorf). Foram usadas sete concentrações diferentes de ácido úsnico que variavam de 90, 75, 60, 45, 30, 15, 1 μ M mais dois controles, um onde não foi colocada a droga e outro somente com o solvente. A droga foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois diluída seriadamente em meio de cultura até alcançar as concentrações desejadas. Realizamos um teste para avaliar se a inibição do crescimento do parasita causado pelo ácido úsnico era reversível. Primeiramente, diluímos α -tocoferol em DMSO e depois diluições seriadas em meio de cultura nas concentrações 75, 25, 10 e 1 μ M. Essas concentrações foram adicionadas à culturas de parasitas tratados com a IC₅₀ do ácido úsnico. Foram feitos esfregaços diários para o controle da parasitemia.

Com a IC_{50} determinada fizemos o tratamento nas culturas de parasitas com a droga e posteriormente os parasitos foram marcados com o precursor radioativo [³H]GGPP em presença de ácido úsnico a fim de verificar se existia alteração na biossíntese da vitamina E.

2.7 Ensaios de lipoperoxidação

Como já foi citado, o α -tocoferol é um potente antioxidante que protege contra a lipoperoxidação das membranas. Para medir o grau de peroxidação lipídica em eritrócitos infectados por *P. falciparum* empregamos uma sonda fluorescente, o ácido *cis*-parinárico (ácido 9, 11, 13, 15-*cis*-octadecatetraenoico,(cPnA)). É um ácido graxo que se incorpora às membranas lipídicas, emitindo fluorescência. Na presença de radicais livres, o cPnA perde um elétron sofrendo rearranjo do tetraeno o que resulta na diminuição da intensidade da fluorescência, o que é uma medida direta de peroxidação lipídica (100).

As determinações fluorimétricas do cPnA foram realizadas em espectrofluorômetro – modelo F4500, *HITACHI* – a 25 °C sob agitação constante. A incorporação da sonda cPnA foi iniciada pela adição de uma solução etanólica de cPnA a uma suspensão de eritrócitos infectados ou não infectados por *P. falciparum* em PBS. A intensidade de fluorescência foi registrada ao longo de 20 minutos, utilizando-se os comprimentos de onda de excitação 312 nm e de emissão 455 nm, com uma janela de 5 e 20 nm, respectivamente. Foram utilizadas cubetas de polimetacrilato de 3 mL com os quatro lados translúcidos (1,27 x 1,27 x 4,45 cm) com agitação constante. Para a indução da oxidação do cPnA foi usado hidroperóxido de Cumeno (CumOOH). A solução estoque de cPnA foi preparada a 224 mmol.L⁻¹ em etanol e

conservada a -20 °C. A solução estoque de CumOOH foi preparada a 200 mmol.L⁻¹ em etanol e conservada a temperatura ambiente.

No ensaio, começamos a leitura em uma suspensão de 2 mL de PBS com um hematócrito de 2% de hemácias infectadas ou não infectadas para obtermos o sinal base da solução. Após 1 minuto e 30 segundos adicionamos 20 μ L da solução etanólica de cPnA alcançando uma concentração de 2,24 μ M. Em menos de 1 minuto a fluorescência atinge o seu máximo e é calculada a média. Esperamos mais 1 minuto e 30 segundos adicionamos 5 μ L da solução estoque de CumOOH em uma concentração final de 500 nM. A adição do pró-oxidante é o nosso tempo zero e a partir dele calculamos, descontando o sinal base do inicio da leitura, o decréscimo de fluorescência em relação ao máximo atingido.

O sistema de cultura *in vitro* acarreta conseqüências na composição de micro nutrientes nos eritrócitos. Ao fazer a separação do soro e plasma de hemácias e posteriores lavagens com meio de cultura, depletamos grande parte de micro nutrientes como o próprio α -tocoferol. Por esse motivo, como controle para hemácias infectadas, utilizamos hemácias submetidas à cultura na ausência de parasitas.

2.8 Análise *in silico* para a busca de possíveis genes/seqüências codificadores de enzimas das vias metabólicas da vitamina E

Foi utilizada seqüência do genoma de *P. falciparum*, publicado no site www.plasmoDB.org, para a procura de genes e/ou seqüências candidatos(as) a codificadores de enzimas envolvidas na biossíntese de α-tocoferol. A procura foi feita por alinhamentos empregando o *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* e o *Hidden Markov model (HMM) (HHpred)*. A procura por *Position-Specific Interated BLAST* (PSI-BLAST) foi realizada por meio da página do *Natoinal Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<u>http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</u>) e o *HHpred* (101) na página do *Max-Plank Institute for Developmental Biology* (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred).

Os alinhamentos considerados significantes foram submetidos ao *InterProScan* (<u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/</u>) para a identificação de motivos compartilhados entre as seqüências encontradas no parasita com as de *Arabidopsis thaliana* e *Synechosystis sp*. Finalmente, os candidatos genes foram alinhados com *CLUSTAL* v1.8 e os melhores foram escolhidos baseando-se na conservação dos motivos e no alinhamento da seqüência.

As seqüências de aminoácidos de enzimas utilizadas nos alinhamentos estão relacionadas na biossíntese da vitamina E em *Arabidopsis thaliana* e *Synechosystis sp.* Todas as seqüências de aminoácidos foram encontradas no *GenBank* (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>). Foram alinhadas as seqüências das enzimas HPPD, HPT (item 1.5) e a Geranilgeranil redutase. Esta última é responsável pela redução do GGPP em fitil-PP (102).

3 RESULTADOS

3.1 Marcação metabólica dos parasitas cultivados in vitro com precursores radioativos

3.1.1 Sistema I de RP-HPLC

Padronizamos o sistema de cromatografia líquida com fase móvel metanol: acetonitrila: tetrahidrofurano (75:20:5)-0,01% BHT (Protocolo I), o qual mostrou ser eficiente para a resolução do padrão de α -tocoferol (tempo de retenção de 18,5 minutos).

Extrato de 1,5x10⁹ esquizontes e uma quantidade correspondente de eritrócitos não infectados metabolicamente marcados com precursores radioativos [³H]GGPP e/ou [³H]FPP por 12 horas, separados com gradiente descontínuo de Percoll seguido de extração, foram submetidos à purificação por RP-HPLC. As frações foram coletadas e a radioatividade medida (Figura 7).





Figura 7. Perfil de incorporação radioativa do estágio esquizontes e hemácias não infectadas I. As amostras marcadas metabolicamente com [³H]FPP ou [³H]GGPP que foram submetidas à extração com hexano. Os extratos foram purificados por RP-HPLC em coluna C18. As frações foram coletadas em intervalos de 0,6 ml/min. Demonstração da presença de picos radioativos coincidentes com os padrões de 1. menaquinona; 2. α-tocoferol; 3. não identificado; 4. filoquinona; 5. α-caroteno e 6. β-caroteno. A – incorporação de [³H]GGPP no estágio esquizonte e hemácias não infectadas; B – incorporação de [³H]FPP no estágio esquizonte e hemácias não infectadas; C – comparação do perfil de incorporação entre os precursores radioativos [³H]GGPP e [³H]FPP no estágio esquizonte.

Com esse sistema conseguimos detectar uma fração com incorporação radioativa no tempo de retenção do α -tocoferol (fração 2) com os dois precursores radioativos testados. O experimento corroborou os resultados anteriores do nosso grupo em que feita a caracterização bioquímica da biossíntese de menaquinona (fração 1) (29), filoquinona (fração 4) [dados não publicados] e carotenóides (frações 5 e 6) (28). Houve diferença de incorporação radioativa entre os dois precursores usados, [³H]FPP mostrou ter uma maior incorporação quando comparado com o [³H]GGPP.

3.1.2 Sistema II de RP-HPLC

Padronizamos segundo método cromatográfico para confirmação de biossíntese de α tocoferol nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Utilizamos sistema isocrático com fase móvel metanol:etanol (50:50)-0,01% BHT (Protocolo II), o qual mostrou-se satisfatório para a resolução do padrão α -tocoferol (tempo de retenção de 12 minutos).

Extrato de 1.10⁹ esquizontes e quantidade correspondente de eritrócitos não infectados metabolicamente marcados com precursor radioativo [³H]FPP por 12 horas, separados com gradiente descontínuo de Percoll seguido de extração, foram submetidos à purificação por RP-HPLC. As frações foram coletadas e a radioatividade medida (Figura 8).



Figura 8. Perfil de incorporação radioativa do estágio esquizontes e hemácias não infectadas II. As amostras marcadas metabolicamente com [³H]FPP foram submetidas à extração com hexano. Os extratos foram purificados por *RP-HPLC* em coluna C18. As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min. Demonstração da presença de frações radioativas em extratos de esquizonte e hemácias não infectadas coincidentes com os padrões de 1. Ubiquinona; 2. menaquinona; 3. α-tocoferol; 4. filoquinona.

Com esse sistema conseguimos detectar uma fração com incorporação radioativa no tempo de retenção correspondente ao do α -tocoferol (fração 3). O experimento corroborou resultados anteriores do nosso grupo onde foi feita a caracterização bioquímica da biossíntese de menaquinona (fração 1) (29), filoquinona (fração 4) [dados não publicados] e Ubiquinonas (fração 1) (27).

3.1.3 Sistema III de RP-HPLC

Terceiro método cromatográfico foi padronizado para confirmação da biossíntese de α -tocoferol nos três estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Utilizamos sistema de gradiente linear, com fase móvel solvente A metanol e solvente B acetonitrila começando com 50/50% (A/B) e terminando em 28 minutos a 30/70% (A/B) (Protocolo III), novamente a metodologia cromatográfica foi eficiente para a resolução do padrão α -tocoferol (tempo de retenção de 16,5 minutos).

Extrato de 1.10⁹ esquizontes trofozoítas e anéis metabolicamente marcados com precursores radioativos [³H]GGPP ou [³H]FPP por 12 horas, separados com gradiente descontínuo de Percoll seguido de extração, foram submetidos à purificação por RP-HPLC. As frações foram coletadas e a radioatividade medida (Figura 9).



Figura 9. Perfil de incorporação radioativa dos três estágios de *P. falciparum*. Parasitas marcados metabolicamente com [³H]FPP ou [³H]GGPP foram submetidos à extração com hexano. Os extratos foram purificados por RP-HPLC em coluna C18. As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min. Demonstração da presença de frações radioativas coincidentes com os padrões de 1. menaquinona; 2. α-tocoferol; 3. não identificado; 4. filoquinona. A – incorporação de [³H]FPP nos estágios esquizonte, trofozoíta e anel; B – incorporação de [³H]GGPP nos estágios esquizonte, trofozoíta e anel.

Com esse sistema conseguimos detectar uma fração com incorporação radioativa no tempo de retenção correspondente ao do padrão de α -tocoferol (fração 2). O experimento corroborou resultados anteriores do nosso grupo em que foi feita a caracterização bioquímica da biossíntese de menaquinona (fração 1) (29) e filoquinona (fração 4) [dados não publicados]. Como pode ser observado na Figura 9, houve diferenças na incorporação radioativa entre os três estágios intraeritrocitários do parasito e entre os precursores utilizados. A maior incorporação ocorreu no estágio esquizonte com a marcação feita com [³H]FPP.

3.2 Confirmação da estrutura molecular de α-tocoferol por espectrometria de massas

Depois de termos detectado produto radioativo empregando análises de incorporação radioativa, seguidas de purificação por sistemas cromatográficos, partimos para a confirmação da estrutura química do α -tocoferol por espectrometria de massas em extratos não radioativos de *P. falciparum*. Foi feita a extração de 10¹⁰ de esquizontes e trofozoítos (2 mL) não marcados radioativamente e, o extrato foi purificado de acordo com os sistemas I e III de RP-HPLC. Como controle, fizemos o mesmo procedimento com quantidades equivalentes de hemácias não infectadas e meio de cultura (Figura 10). As frações correspondentes ao tempo de retenção do α -tocoferol, coletadas no RP-HPLC, foram analisadas por infusão direta em um espectrômetro de massas modelo LCQ DuoTM (87).





Figura 10. Confirmação da estrutura química por ESI-MS de α-tocoferol em P. falciparum. A – Espectro do padrão; B – Espectro de esquizontes; C- Espectro de hemácias e D - Espectro do meio de cultura. Ions: m/z 431, α-tocoferol; m/z 165, anel de cromanol; m/z 205, cadeia isoprênica lateral sem três grupos metila.

Na Figura 10A o íon m/z 431 corresponde à molécula de α -tocoferol ionizada. Ao fazer a quebra desse íon, obtivemos dois adutos principais: o m/z 165 e 205. O primeiro corresponde ao anel de cromanol (87) enquanto o segundo à cadeia isoprênica lateral sem três grupos metila.

Em colaboração com o Professor Doutor Fábio Cesar Gozzo (Instituto de Química, Universidade de Campinas - UNICAMP, São Paulo) tentamos analisar o extrato de *P. falciparum* em espectrometro de massas *Ion Trap Time-of-flyght* (Q-TOF) modelo Waters Synapt HDMS (Waters Corp., Manchester, UK); porém, não conseguimos detectar o íon por falta de sensibilidade.

Adaptamos uma técnica que realiza a análise de α -tocopherol por GC/MS e possui alta sensibilidade (88). Foi feita uma curva de calibração para estabelecer o limite de detecção (LOD) da vitamina E. Em nosso sistema conseguimos detectar até 800 pM (1,72 pg) de α -tocoferol. Van Pelt (88) atingiu um limite de detecção abaixo do qual atingimos na ordem de fento molar (fM).

Adicionamos 600μ L de BSTFA - 10% TMCS ao extrato proveniente de 2.10¹⁰ esquizontes e trofozoítos, ao extrato de hemácias não infectadas e ao extrato de meio de cultura correspondentes a essa quantidade de parasitas. Submetemos essas amostras à análise por GC/MS (Figura 11).





Figura 11. Confirmação da estrutura química por GC/MS do α-tocoferol biossintetizadas pelas formas intraeritrocitárias de *P. falciparum*. Cromatogramas e espectros de A - padrão de α-tocoferol; B - esquizontes; C - hemácias D - meio de cultura. Íons: *m/z* 502, α-tocoferol + TMS; *m/z* 236 e 237, anel de cromanol + TMS; *m/z* 277, anel de cromanol com a porção ciclizada da cadeia.

O tempo de retenção do padrão derivatizado de α -tocoferol foi de 30,13 minutos (Figura 11A). Nas amostras obtidas de parasitas, o tempo de retenção foi de 29,90 minutos, de hemácias foi de 30,28 minutos e de meio de cultura foi de 30,15 minutos.

Observamos que o íon m/z 502, o qual corresponde à molécula de α -tocoferol derivatizada, está presente em todos os espectros. Conseguimos detectar os íons adutos da quebra desse íon, os m/z 236, 237 e 277, com a mesma abundância encontrada no padrão (Figura 11A). Exceto no espectro da Figura 11C, extrato de hemácias não infectadas, onde o íon m/z 237 foi mais abundante que o íon m/z 236. Conseguimos identificar os três adutos da quebra do íons 502 (Figura 12).



Figura 12. Adutos da quebra do α-tocoferol + TMS. (A) *m/z* 236, (B) *m/z* 237 e (C) *m/z* 277.

Com o *software* empregado foi possível quantificar a concentração de α-tocoferol por meio da ferramenta *Quan Browser*. O programa calcula a concentração da molécula alvo a partir da integração da área do pico cromatográfico da amostra com as áreas dos picos provenientes da curva de calibração. A concentração de vitamina E no extrato de parasitas foi de 400 nM, no de hemácias foi de 20 nM e no de meio de cultura foi de 80 nM.

3.3 Determinação do valor de IC₅₀ do ácido úsnico e ensaios de recuperação

Utilizamos o método de Desjardins et al. (99) para determinar a IC_{50} do ácido úsnico em culturas sincrônicas de *P. falciparum* (Figura 13).



Figura 13. Microteste com ácido úsnico. 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de ácido úsnico. $IC_{50} = 24,6 \pm 7 \ \mu M \ (n=3).$

A Figura 13 mostra a parasitemia em função da concentração de ácido úsnico, ou seja, o ácido úsnico exerce inibição em culturas de *P. falciparum* de maneira dose-dependente. Esse experimento foi repetido três vezes e a IC₅₀ ficou na ordem de 24,6 ± 7 μ M. Com a IC₅₀ determinada, fizemos experimentos de recuperação a fim de avaliar a reversibilidade do tratamento da cultura com ácido úsnico. A estratégia foi o tratamento dos parasitas de *P. falciparum*, cultivados *in vitro* com a IC₅₀ da droga (25 μ M) adicionando, simultaneamente, diferentes concentrações de α-tocoferol. Como controle para avaliar o efeito da adição de αtocoferol nos parasitas, um lote foi tratado apenas com a maior concentração de vitamina E testada, outro apenas com a droga e o último sem ambos (Figura 14).



Figura 14. Teste de recuperação. Tratamento por 48 horas.

A inibição do crescimento do parasita pelo ácido úsnico (43,8 ± 7%) foi parcialmente revertida a 15,3 ± 6% pela adição simultânea de 75 μ M da vitamina E (p < 0,01) (Figura 14). Essa reversibilidade do efeito do ácido úsnico mostrou-se dose dependente, a parasitemia elevou-se gradualmente com o aumento da concentração da vitamina E; porém, após 96 horas do mesmo tratamento, os parasitas foram afetados pela droga, atingindo os 52,6 ± 1% de inibição de crescimento não havendo diferença em relação aos parasitas tratados apenas com a droga (p > 0,01) (dados não apresentados). Ao adicionarmos o α -tocoferol após 48 horas de tratamento com a droga, não foi observado a reversibilidade do efeito inibitório do ácido úsnico.

3.4 Resposta da biossíntese de vitamina E ao tratamento com ácido úsnico

Avaliamos o efeito do ácido úsnico sobre a biossíntese de α -tocoferol em parasitas marcados metabolicamente. O teste de inibição consistiu em começar o tratamento com 25 μ M de ácido úsnico nas formas sincrônicas de parasitas no estágio trofozoíto (24-26 horas) com 5% de parasitemia. Foi feita a marcação metabólica com 15 μ Ci do precursor radioativo [³H]GGPP. Decorridas 10-14 horas, as formas do parasita foram separadas pelo gradiente de Percoll para posterior extração, purificação por RP-HPLC com o sistema III e análise do perfil de incorporação radioativa (Figura 15).



Figura 15. Efeito do ácido úsnico sobre a biossíntese de α-tocoferol nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Parasitas marcados metabolicamente com [³H]GGPP foram submetidos à extração com hexano. Os extratos foram purificados por *RP-HPLC* em coluna C18. As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min (n=3). Demonstração da presença de frações radioativas coincidentes com os padrões de 1. menaquinona; 2. α-tocoferol; 3. não identificado; 4. filoquinona.

Na fração correspondente ao tempo de retenção do padrão de α -tocoferol (fração 2) houve uma redução significativa de 53,5 ± 7% (p < 0,01) na biossíntese de α -tocoferol nos parasitas tratados com 25 µM de ácido úsnico em relação aos não tratados (Figura 15). Outros produtos como menaquinona (fração 1) e a molécula desconhecida (fração 3) também apresentaram a biossíntese diminuída. Já a biossíntese de filoquinona (fração 4) apresentou aumento discreto.

3.5 Resposta da biossíntese de vitamina E ao aumento da tensão de O₂ no cultivo dos parasitas

Além da resposta ao ácido úsnico, especulamos outras formas de interferir na biossíntese de vitamina E do parasita. Tonhosolo et al. (28), mostrou um aumento na biossíntese de carotenóides quando os parasitas foram cultivados em tensão de 20% oxigênio ou tratados com cloroquina (droga que sabidamente promove estresse oxidativo). Essas duas abordagens mostraram que a biossíntese respondia ao estresse oxidativo causado pela cloroquina ou pelo aumento da tensão de O_2 . Além do mais, quando tratados com norflurazon (droga que bloqueia a biossíntese de carotenóides) combinado com 20% de O_2 , houve a potencialização do efeito da droga no crescimento do parasita. O grupo inferiu que ao tratar os parasitas em cultura com um inibidor da fitoeno sintase, o norflurazon, com a cloroquina ou aumentar a tensão de O_2 provavelmente o aumento da biossíntese de carotenóides seja para atuar contra o estresse oxidativo.

Como já descrito na literatura que a vitamina E é um potente antioxidante, decidimos avaliar se a biossíntese respondia a diferentes tensões de oxigênio. Para tanto, começamos o cultivo com 20% de O_2 em culturas contendo formas sincrônicas no estágio trofozoíto (24-26 horas) com 5% de parasitemia. Foi feita a marcação metabólica com 15 µCi do precursor radioativo [³H]GGPP no estágio trofozoíto (24-26 horas). Decorridas 10-14 horas, as formas do parasita eram separadas pelo gradiente de Percoll para posterior extração, purificação por RP-HPLC com o sistema III e análise do perfil de incorporação radioativa (Figura 16).



Figura 16. Efeito do aumento da tensão de O₂ sobre a biossíntese de α-tocoferol nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Parasitas marcados metabolicamente com [³H]GGPP foram submetidos à extração com hexano. Os extratos foram purificados por *RP-HPLC* em coluna C18. As frações foram coletadas em intervalos de 1 ml/min (n=3). Demonstração da presença de frações radioativas coincidentes com os padrões de 1. menaquinona; 2. α-tocoferol; 3. não identificado; 4. filoquinona.

Como pode ser observado na fração correspondente ao tempo de retenção do padrão de α -tocoferol (fração 2) houve um aumento significativo de 40,3 ± 12% (p < 0,01) na biossíntese nos parasitas cultivados em uma tensão de O₂ de 20% em relação aos cultivados em 5% de O₂ (Figura 16). Outros produtos como menaquinona (fração 1) e a molécula desconhecida (fração 3) não se alteraram. Já a filoquinona (fração 4) apresentou um aumento.

3.6 Função da vitamina E no metabolismo de P. falciparum

O sistema de cultura *in vitro* dos parasitas de *P. falciparum* acarreta conseqüências na composição dos micro nutrientes nos eritrócitos. Ao fazer a separação do soro e plasma das hemácias com posteriores lavagens, depletamos grande parte de moléculas como o próprio α -tocoferol. Por esse motivo, primeiramente padronizamos dois tipos de hemácias não infectadas; as que passaram pela cultura na ausência de parasitas e as hemácias que não passaram por esse processo. Não foi encontrada diferença no decréscimo da fluorescência entre esses dois grupos (dados não apresentados).

Nosso próximo passo foi avaliar se o aumento da biossíntese da vitamina E observado em parasitas cultivados com 20% de O_2 , acarretaria no aumento de proteção contra a peroxidação lipídica. O experimento consistiu em cultivar parasitas em condições normais e sob 20% de O_2 por 48 horas e, posteriormente, submetê-los ao ensaio com o cPnA. O mesmo foi feito com parasitas cultivados sob 5% de O_2 e hemácias não infectadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Ensaio de lipoperoxidação I. Hemácias infectadas e não infectadas cultivadas em 5% (controle) e 20% de O₂ foram desafiadas com hidroperóxido de cumeno. A peroxidação lipídica foi estimada pelo decréscimo de fluorescência do ácido *cis*-parinárico (n=3).

	% decréscimo na fluorescência depois de			
Hemácias não infectadas	6 min	9 min	12 min	
Controle	$30,05 \pm 2,49$	$11,62 \pm 1,15$	$4,65 \pm 3,36$	
20% O ₂	$32,60 \pm 1,75$	$14,00 \pm 4,15$	$2,90 \pm 2,89$	
Hemácias infectadas				
Controle	$35,00 \pm 1,63$	$9,93 \pm 1,37$	$2,41 \pm 1,03$	
20% O ₂	$45,50 \pm 1,90*$	$18,\!48 \pm 1,\!68*$	$4,\!48 \pm 0,\!68$	

* *p*<0,05 difere significativamente do controle (ANOVA).

A perda de fluorescência do cPnA em resposta ao desafio com CumOOH de hemácias não infectadas cultivadas sob 20% de O_2 não foi diferente ao do controle (*p*>0,05, ANOVA). Entretanto, ao compararmos hemácias infectadas, observamos uma menor peroxidação do cPnA nas cultivadas com 20% de O_2 do que nas cultivadas com 5% de O_2 (*p*<0,05, ANOVA).

Outra variável que influenciou na biossíntese de vitamina E pelo parasita foi o tratamento com ácido úsnico. Essa droga inibiu cerca de 40% da biossíntese e conseqüentemente, diminuiu a proteção contra a peroxidação do cPnA (Tabela 2).

Tabela 2 - Ensaio de lipoperoxidação II. Hemácias infectadas e não infectadas submetidas a tratamentos com a presença ou ausência de 25 μM de ácido úsnico combinados com a presença ou ausência de α-tocoferol / ácido ascórbico desafiadas pelo hidroperóxido de cumeno. A peroxidação lipídica foi estimada pelo decréscimo de fluorescência do ácido *cis*-parinárico (n=3).

	% decréscimo na fluorescência depois de		
Hemácias não infectadas	6 min	9 min	12 min
Controle	$46,70 \pm 3,91$	$31,20 \pm 4,40$	$9,00 \pm 2,65$
25 μM ácido úsnico	$50,53 \pm 3,60$	$27,80 \pm 2,00$	$11,13 \pm 3,78$
750 Nm α-tocoferol	73,16 ± 3,41*	$49,80 \pm 1,47*$	25,16 ± 2,22*
750 Nm ácido ascórbico	$59,65 \pm 6,00$	$29,40 \pm 1,27$	$8,60 \pm 0,42$
Hemácias infectadas			
Controle	$71,85 \pm 3,11$	$42,90 \pm 1,96$	$14,42 \pm 0,97$
25 μM ácido úsnico	$61,00 \pm 2,68*$	$27,57 \pm 1,51*$	$7,00 \pm 1,86*$
25 μM ácido úsnico + 750 nM α-tocoferol	$70,83 \pm 1,50*$	$56,16 \pm 3,71*$	$43,10 \pm 4,41*$
25 μM ácido úsnico + 750 nM ácido ascórbico	$64,33 \pm 1,97$	$28,33 \pm 2,81$	$10,16 \pm 2,17$

* *p*<0,05 difere significativamente do controle (ANOVA).

O tratamento com o ácido úsnico não afetou significativamente a liporeroxidação do cPnA de hemácias não infectados quando comparadas com as que não foram tratadas. Por outro lado, as hemácias infectadas tratadas, tiveram decréscimo de fluorescência significativamente menor do cPnA em relação as que não foram tratadas. A partir desses

resultados, analisamos o efeito que a adição exógena de α -tocoferol ou ácido ascórbico poderia acarretar. O resultado demonstrou que a adição de α -tocoferol nas hemácias infectadas tratadas com ácido úsnico, previne a peroxidação do cPnA. Quando acrescentamos ácido ascórbico às hemácias infectadas ou não infectadas, não observamos proteção da peroxidação do cPnA.

3.7 Análise *in silico* para busca de possíveis genes/seqüências codificadores de enzimas das vias metabólicas da vitamina E

Uma vez que não foram descritos genes relacionados à biossíntese de α -tocoferol em *P. falciparum*, decidimos alinhar sequências de enzimas relacionadas à biossíntese de α -tocoferol em *A. thaliana* e *Synechosystis sp.*com o banco de dados de *Plasmodium sp.* As enzimas escolhidas para o alinhamento foram a HPPD, alvo da droga ácido úsnico; HPT, responsável pela condensação do anel de cromanol com a cadeia isoprênica; e a Geranilgeranil redutase, a qual reduz o GGPP em fitil-PP.

Os alinhamentos baseados no *PSI-BLAST* e HMMs nos retornaram sequências com baixas similaridade e identidade. A maior identidade de aminoácidos conseguida foi de 23% com a GGPP redutase de *A. thaliana*, porém a enzima já está descrita como uma provável glutamato sintase NAD(P)H-dependente (PF14_0334). Algumas sequências que não tinham função alguma anotada não apresentaram os motivos necessários para considerá-las candidatas.

Análises exaustivas empregando HMMs e *BLAST* não foram capazes de apontar possíveis sequências homólogas às enzimas relacionadas com a biossíntese de vitamina E em *P. falciparum*.

4 DISCUSSÃO

4.1 A biossíntese de vitamina E

4.1.1 Marcações metabólicas com precursores radioativos

Inicialmente propusemos a caracterização bioquímica da biossíntese de α -tocoferol na cepa 3D7 de *P. falciparum*. Para tanto, utilizamos três diferentes sistemas cromatográficos que separavam o α -tocoferol dos demais isoprenóides previamente descritos nesse organismo. Em todos os sistemas de RP-HPLC ensaiados foram determinados os tempos de retenção de compostos isoprênicos como poliisoprenóides, carotenóides, ubiquinonas, entre outros; garantindo a não coeluição entre os compostos.

Ao compararmos o sistema II com os sistemas I e III observamos que o primeiro não apresentou boa separação entre o α -tocoferol e a menaquinona (Figuras 7, 8 e 9). Essa coeluição poderia dificultar a interpretação dos dados, pois estudos do nosso grupo apontam para a biossíntese de menaquinona nesse parasita (29) e tempos de retenção semelhantes poderiam propiciar falsos positivos. Entretanto, o sistema III separou o α -tocoferol dos demais padrões de forma satisfatória, pois conseguimos separá-lo da menaquinona com diferença nos tempos de retenção de 5 minutos, sendo que nos sistemas I e II essa diferença foi de 3 e 1,5 minutos, respectivamente. Hemácias não infectadas marcadas metabolicamente com [³H]FPP ou [³H]GGPP e analisadas pelos três sistemas, não apresentaram frações radioativas nos tempos de retenção da vitamina E.

Com o sistema III foram analisados os três estágios intraeritrocitários (Figura 9). Podemos observar que a maior incorporação foi no estágio esquizonte e em menor quantidade em trofozoítos e anéis. Essa diferença de incorporação nos estágios intraeritrocitários também foi descrita na caracterização da biossíntese de carotenóides (28), dolicóis (11) e ubiquinonas (22). O fenômeno pode ser atribuído ao fato de que no estágio esquizonte o parasita encontrase completamente desenvolvido. Isso indica que a biossíntese de α -tocoferol começa no estágio anel e o produto é acumulado no estágio esquizonte.

Ao disponibilizar dois precursores radioativos, o [³H]GGPP ou [³H]FPP, em meio de cultura detectamos um produto radioativo coincidente com o tempo de retenção do α -tocoferol nos três sistemas de RP-HPLC diferentes. Além disso, detectamos outros produtos radioativos provenientes da ramificação das moléculas de FPP e GGPP que já foram ou estão sendo caracterizados pelo nosso grupo (11, 22, 28-29). O *P. falciparum* possui as enzimas farnesil transferase e a geranilgeranil transferase (103) as quais utilizam as moléculas de FPP e GGPP como substratos na isoprenilação de proteínas. No entanto, ainda não foi identificada

a enzima Geranilgeranil redutase cuja função é reduzir a molécula de GGPP a Fitil-PP e nem a enzima HPT cuja função é a isoprenilação do homogentisato com a cadeia fitil. A identificação dessas enzimas no parasita confirmaria molecularmente a biossíntese de α tocoferol. A análise *in silico* dessas enzimas corroboraria a biossíntese da vitamina E pelo parasita.

Nossas abordagens bioinformáticas não foram capazes de apontar possíveis candidatos, pois os motivos nas sequências de aminoácidos que atribuem funcionalidade às enzimas relacionadas com a biossíntese de α -tocoferol, aparentemente, estão ausentes no parasita. Entretanto cabe salientar que, por exemplo, em plantas, as enzimas HPT e a Homogentisato geranilgeranil transferase são específicas para fitil-PP ou GGPP, respectivamente, enquanto que a HPT de *Synechosystis sp.* é bifuncional, capaz de utilizar ambos substratos e formar tocoferóis ou tocotrienóis (104). Por isso, acreditamos que diferentes abordagens, não só as de bioinformática, mas também ensaios enzimáticos serão necessários para demonstrar molecularmente a biossíntese de vitamina E no parasita.

4.1.2 Confirmação da presença da estrutura molecular por espectrometria de massas

Para a confirmação da estrutura química de α -tocoferol oriundas dos extratos de parasitas não marcados radioativamente empregamos a espectrometria de massas. Os espectros da primeira técnica, Figura 11, aparentemente não se tratam da mesma molécula. A abundância dos íons e os produtos da quebra não coincidem com o padrão. Porém, devemos chamar a atenção ao sinal de abundância relativa (NL, canto superior esquerdo dos espectros) que está na ordem de 10³ nas amostras provenientes de hemácias (Figura 11C) e meio de cultura (Figura 11D) e 10² na amostra proveniente de extratos de *P. falciparum* (Figura 11B). Esse é o sinal do ruído. Por esta técnica, a não detecção da molécula pode ser a ausência da mesma ou porque a concentração de vitamina E está abaixo do limite de detecção do aparelho. Para resolver esse problema tentamos a técnica de ionização com lítio (Li) que foi descrita pelo nosso laboratório que aumenta a sensibilidade na análise de poliisoprenóides como carotenóides e menaquinona (28, 29). Infelizmente, a molécula de α -tocoferol não ionizou com Li, impossibilitando assim, o emprego dessa técnica.

O mesmo aconteceu com a segunda técnica de espectrometria de massas. Acreditamos que devido às propriedades físico-químicas e a baixa concentração da molécula de tocoferol no extrato de parasitas não permitiram fazer a análise nos equipamentos.

A técnica que apresentou boa sensibilidade foi a de GC/MS. Essa sensibilidade pode ser atribuída à derivatização feita na molécula com TMCS, cujo objetivo foi aumentar a volatilidade do α-tocoferol a fim de melhorar sua resolução cromatográfica.

Na análise por GC/MS detectamos frações no tempo de retenção e com adutos referentes ao da molécula do padrão nas três amostras analisadas. Foi possível detectar a concentração da molécula em cada amostra; observamos que nos extratos de parasitas essa concentração foi vinte vezes maior que em hemácias e cinco vezes maior que em meio de cultura. O mesmo acontece com outras moléculas biossintetizadas por *P. falciparum*, como glutationa (105), que apresenta maior quantidade nos extratos de hemácias parasitadas quando comparados aos de hemácias não parasitadas. Por outro lado, Simões et al. (106) por meio de análises de RP-HPLC, determinou que a concentração de vitamina E era menor em hemácias infectadas por *P. falciparum*. Entretanto cabe salientar que esse grupo utilizou outra técnica menos sensível e ainda, 10% (v/v) de soro humano em meio de cultura, o que permitiu uma concentração de vitamina E detectável pele técnica de RP-HPLC. No nosso caso, utilizamos hemácias sem soro em um meio complementado com Albumax. Como depletamos a vitamina E, sistemas de RP-HPLC não foram sensíveis para detectarmos o α -tocoferol. Por isso empregamos a técnica de GC/MS.

Os produtos radioativos no tempo de retenção do α -tocoferol e a presença da estrutura molecular da vitamina E em maior quantidade em extratos de parasitas são dados que confirmam que a biossíntese ocorre no parasita.

4.1.3 Resposta da biossíntese de vitamina E dos estágios intraeritrocitários de P. falciparum a diferentes tratamentos e condições de cultivo

Outra forma de provar a biossíntese de vitamina E no parasita foi buscar formas de interferir na biossíntese observada por marcações metabólicas. Promovemos a inibição da biossíntese com o ácido úsnico, (inibidor da enzima HPPD), ou estimulamos a sua biossíntese com a elevação da tensão de oxigênio de 5% para 20%. Nosso grupo já havia descrito que a tensão de 20% de O_2 acarreta no aumento da biossíntese de carotenóides (28).

O ácido úsnico mostrou efeito inibitório no crescimento do parasita com a IC₅₀ de 24,6 $\pm 7 \mu$ M. A concentração observada nos nossos experimentos está na mesma ordem de grandeza encontrada por Verotta (93) que trabalhando com a cepa K1 de *P. falciparum* obteve uma IC₅₀ de 15,3 μ M. Nos ensaios de inibição de crescimento pelo ácido úsnico em outros protozoários como *Leishmania sp*, a concentração de 15 μ M é suficiente para inibir o crescimento de 90% os parasitas (92). Já em *Trypanosoma cruzi* o valor da IC₅₀ é muito próximo ao que encontramos 30 μ M. *T. cruzi* tratados com o ácido úsnico apresentaram, por microscopia eletrônica de transmissão, mudanças ultraestruturais na mitocôndria e no cinetoplasto nas formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (94). Seria interessante avaliar por microscopia eletrônica se há mudanças morfológicas nas organelas de *P. falciparum* quando tratados com o ácido úsnico.

Skinner-Adams (78) relataram que a adição de vitamina E em cultura, apresentava efeitos no crescimento nas cepas 3D7, D10 e W2MEF de *P. falciparum*. No homem, as concentrações fisiológicas normais de α -tocoferol estão entre 11 e 40 μ M, nessas concentrações o parasita cresce normalmente. Quando é adicionado níveis supra fisiológicos (acima de 100 μ M) ou sub fisiológicos (abaixo de 100 nM) o crescimento é inibido. Segundo Davis (107) e Das (108), a infecção por malária em seres humanos está relacionada com a diminuição em níveis basais de vitamina A e E. Sugere-se que a presença de níveis fisiológicos normais de α -tocoferol possa garantir que não haja um ambiente com alto estresse oxidativo, permitindo assim, um crescimento normal do parasita.

Confirmamos que o tratamento de parasitas com ácido úsnico altera a biossíntese de α tocoferol. Fato esperado, uma vez que tratamos os parasitas com uma droga que inibe a enzima HPPD responsável pela formação do precursor hidroxifenilpiruvato (98). Entretanto, em análises *in silico*, não encontramos nenhum gene/seqüência candidato(a) que possa codificar essa enzima no genoma do parasita.

A nossa estratégia de aumentar a biossíntese de α -tocoferol com o aumento da tensão de oxigênio foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo sobre a caracterização de carotenóides. Foi observado que havia um aumento da biossíntese desses antioxidantes sob tensão de 20% de O₂. Como a vitamina E também é um antioxidante, decidimos verificar se sua biossíntese também era afetada pela tensão de oxigênio. Os resultados obtidos confirmaram essa hipótese, com o aumento da biossíntese do α -tocoferol. Ainda não avaliamos se o aumento da tensão de oxigênio eleva os níveis de ROS em cultura, porém acreditamos que essa seja a razão desses compostos serem mais biossintetizados.

Em plantas, já foi descrito que a adição de uma fonte de carbono orgânico resulta no aumento da atividade mitocondrial, da concentração de ROS e da produção de α -tocoferol em cloroplastos do mutante *Euglena gracilis* W14ZUL (109). Eles também reportaram que em culturas foto-heterotróficas da cepa selvagem de *Euglena gracilis* Z existia uma correlação positiva entre a geração de ROS e produção de α -tocoferol. Os autores concluíram que a otimização da produção de vitamina E estaria atrelada à manipulação de fatores que levam à

geração de ROS. O que fica explícito é que as condições favoráveis para o crescimento celular pode não ser as melhores para a acumulação intracelular de α -tocoferol (110-111). Por exemplo, condições que inibem a fotossíntese, mas não a fotólise da água em culturas fotoautotróficas reduzem o crescimento celular, porém aumentam a geração de ROS e, dessa forma, aumentam a produção de vitamina E (109).

4.2 Função da vitamina E no metabolismo de P. falciparum

Confirmada a biossíntese de vitamina E no parasita, nosso próximo questionamento foi saber qual seria o provável papel biológico/fisiológico dessa molécula para os estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*.

A principal função da vitamina E, descrita em outros organismos é evitar a autooxidação de ácidos graxos poiinsaturados (66, 67). Escolhemos o cPnA como sonda para medir a liporeroxidação em hemácias parasitadas em diferentes condições de tratamento. Com base na oxidação do cPnA podemos inferir a oxidação nas membranas (100).

Na tabela 1 temos que com o aumento da tensão de oxigênio ocorre um aumento da biossíntese de vitamina E, o que leva a menos oxidação do cPnA, ou seja, houve uma proteção contra a lipoperoxidação. Em 1992, Simões et al. (106), utilizando o cPnA, haviam descrito que eritrócitos infectados por uma cepa nigeriana de *P. falciparum* estavam menos sujeitos à lipoperoxidação do que os não infectados. O grupo chegou a esse resultado mesmo sem o aumento da tensão de oxigênio, entretanto o sistema de cultivo era em placas de *petri* – jarra com vela (81). Em nosso sistema de cultivo (item 2.1) temos maior controle das concentrações dos gases e não observamos essa proteção, a não ser se aumentássemos a tensão de oxigênio.

A biossíntese de vitamina E em plantas também pode ser alterada por fatores que causam estresse. As mudanças dos níveis de α -tocoferol durante a resposta a estresse ambiental são divididas em duas fases. Na primeira há um aumento da biossíntese, seguido de uma perda de α -tocoferol. Esse aumento inicial dos níveis de α -tocoferol contribui para proteção contra a lipoperoxidação (fase 1). Quando o estresse é severo, a degradação do α -tocoferol excede a sua biossíntese e seus níveis são diminuídos (fase 2) (112). Munné-Bosch (113) estudando níveis de α -tocoferol em alecrim (*Rosmarinus officinalis L*), concluíram que sob estresse hídrico e luminoso, os níveis de α -tocoferol aumentam 15 vezes e de carotenóides 26%. O autor sugere que o aumento desses compostos antioxidantes pode prevenir a foto-oxidação da clorofila e possíveis danos às membranas do tilacóide. Portanto, em nosso

experimento pudermos demonstrar que a variação da biossíntese de vitamina E causada por diferentes tensões de oxigênio afeta, a princípio, o nível de proteção contra lipoperoxidação de membranas de eritrócitos infectados por *P. falciparum*.

Os resultados do ensaio de Lipoperoxidação II (Tabela 2) com hemácias infectadas tratadas com ácido úsnico confirmaram que houve a inibição da biossíntese de α-tocoferol, pois o cPnA oxidou mais nas hemácias infectadas tratadas com a droga em relação às que não foram tratadas.

Utilizando outro método para inferir a lipoperoxidação, a medida da oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX), Maeda (114) analisou os níveis de peróxidos formados em mutantes slr1737 e slr1736 de Synechocystis sp. O primeiro não biossintetiza tocoferóis, mas acumula intermediários da via; enquanto que o segundo, além de não biossintetizar tocoferóis, não acumula seus intermediários. O estudo mostrou que em relação à forma selvagem, os mutantes de Synechocystis sp ao serem desafiados com ácido linonênico (18:3) e alta luminosidade acumulavam um nível maior de peróxidos. Além disso, nas formas selvagens durante as mesmas condições, o nível de tocoferóis dobrou. Esses resultados mostraram que os tocoferóis têm um papel significante como antioxidante lipofilico em Synechocystis sp. (114). O mesmo acontece com mutantes vtel e vte2 de Arabidopsis thaliana, incapazes de biossintetizar tocoferóis, que apresentaram níveis de peróxidos 4 e 100 vezes maiores, respectivamente, em relação à forma selvagem quando em condições de estresse oxidativo. A falta de vitamina E ainda acarreta defeitos de crescimento durante a germinação da semente (115). Seria complementar aos nossos resultados fazer o ensaio FOX para avaliar se os níveis de peróxidos são aumentados quando inibimos ou diminuídos quando aumentamos a biossíntese de α-tocoferol em *P. falciparum*.

A adição exógena de α -tocoferol acarretou o decréscimo da oxidação do cPnA em hemácias infectadas e tratadas com ácido úsnico. Quando acrescentamos o ácido ascórbico, não observamos esse decréscimo. A estratégia de acrescentar vitamina E segundo Falk (116) cita em sua revisão, tem que levar em consideração a natureza lipofilica do α -tocoferol, a qual impõe limites como aplicação, absorção e transporte ao trabalhar *in vivo*, principalmente em plantas que pouco se conhece os transportadores. Entretanto, Cheng (117) mostrou que o transporte de vitamina E ocorre do plasma para as membranas de hemácias de ratos sem precisar de um transportador e preferencialmente a forma natural de α -tocoferol. Mesmo que ensaios de transporte não terem sido feitos, assumimos que o α -tocoferol adicionado foi capaz de proteger a membrana das hemácias infectadas. No entanto não podemos afirmar se a vitamina E alcançou o vacúolo parasitóforo e o parasita. Na leishmaniose visceral causada por *Leishmania donovani*, Biswas (118) descreveu um aumento na lipoperoxidação em eritrócitos de hamsters infectados, o que culminava em hemólise e anemia. Posteriormente, Sen (119) mostrou que essa susceptibilidade para lipoperoxidação das hemácias de hamsters infectados por *L. donovani* poderia ser amenizada pela administração oral de 2 mg/Kg de α -tocoferol duas vezes por semana durante três meses. O estudo mostrou o efeito de uma terapia com antioxidantes no combate à anemia associada com leishmaniose visceral.

Além do α -tocoferol, acrescentamos o ácido ascórbico para avaliarmos se ele também tinha um papel protetor na oxidação do cPnA. Utilizamos as mesmas concentrações de vitamina E e não obtivemos proteção alguma. O ácido ascórbico é um antioxidante hidro solúvel e é descrito como uma das moléculas capazes de reciclar o radical tocoferoxyl em α tocoferol (72-74). Entretanto, nosso objetivo em adicionar essa vitamina, foi mostrar que um antioxidante não relacionado diretamente com a lipoperoxidação não alteraria por si só a oxidação do cPnA. Resultado semelhante obteve Simões (106) onde a adição de ácido ascórbico não protegeu o cPnA contra a oxidação em hemácias infectadas por *P. falciparum*.

Em resumo, demonstramos por meio de uma sonda fluorescente, o cPnA, que a vitamina E atua como antioxidante lipofílico, protegendo a lipoperoxidação. Esses e os demais resultados apresentados não só contribuem para a compreensão da biologia de *P. falciparum*, mas também elucidam partes das vias MEP e do Chiquimato que podem servir como alvos terapêuticos.

5 CONCLUSÕES

• A biossíntese de α-tocoferol ocorre nos três estágios intraeritrocitários de *P*. *falciparum*;

• Foi confirmada, por espectrometria de massas, a estrutura molecular de α - tocoferol oriunda do estágio esquizonte;

- O ácido úsnico inibe a biossíntese de α -tocoferol e o crescimento do parasita, com IC_{50} de 24,6 \pm 7 $\mu M;$

• O α-tocoferol, nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*, atua como antioxidante lipofílico protegendo as membranas da lipoperoxidação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS^{*}

1 Camargo EP. Malária, maleita, paludismo. Ciência e Cultura. 2003;55(1):26-9.

2 Breman JG, Egan A, Keusch GT. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. Am J Trop Med Hyg. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):4-7.

3 Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA. Malaria. Lancet. 2005 Apr 23-29;365(9469):1487-98.

4 Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. Cmaj. 2004 May 25;170(11):1693-702.

5 Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. Am J Trop Med Hyg. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):1-11.

6 World Health Organization (WHO). WHO guidelines for the treatment of malaria [homepage on the Internet]. 2006. Available from: http://www.who.int/en/ [2009 out. 16].

7 Ekland EH, Fidock DA. *In vitro* evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. Int J Parasitol. 2008 Jun;38(7):743-7.

8 Hetzel MW, Msechu JJ, Goodman C, Lengeler C, Obrist B, Kachur SP, et al. Decreased availability of antimalarials in the private sector following the policy change from chloroquine to sulphadoxine-pyrimethamine in the Kilombero Valley, Tanzania. Malar J. 2006;5:109.

9 Yoshikawa M, Motoshima K, Fujimoto K, Tai A, Kakuta H, Sasaki K. Pyridinium cationic-dimer antimalarials, unlike chloroquine, act selectively between the schizont stage and the ring stage of *Plasmodium falciparum*. Bioorg Med Chem. 2008 Jun;16(11):6027-33.

10 Levander OA, Ager Jr. AL. Malarial parasites and antioxidant nutrients. Parasitology. 1993;107 (Suppl):S95-106.

11 D'Alexandri FL, Kimura EA, Peres VJ, Katzin AM. Protein dolichylation in *Plasmodium falciparum*. FEBS Lett. 2006 Nov 27;580(27):6343-8.

^{*} De acordo com: International Commitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedial Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22].

12 Kawazu S, Ikenoue N, Takemae H, Komaki-Yasuda K, Kano S. Roles of 1-Cys peroxiredoxin in haem detoxification in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Febs J. 2005 Apr;272(7):1784-91.

13 Kimura EA, Couto AS, Peres VJ, Casal OL, Katzin AM. N-linked glycoproteins are related to schizogony of the intraerythrocytic stage in *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem. 1996 Jun 14;271(24):14452-61.

14 Seeber F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2003 Jun;3(2):99-109.

15 Roberts CW, Roberts F, Lyons RE, Kirisits MJ, Mui EJ, Finnerty J, et al. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. J Infect Dis. 2002 Feb 15;185 (Suppl 1):S25-36.

16 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.

17 Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, et al. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. Nat Rev Microbiol. 2004 Mar;2(3):203-16.

18 Woodard CL, Li Z, Kathcart AK, Terrell J, Gerena L, Lopez-Sanchez M, et al. Oxindole-based compounds are selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* cyclin dependent protein kinases. J Med Chem. 2003 Aug 28;46(18):3877-82.

19 Go ML. Novel antiplasmodial agents. Med Res Rev. 2003 Jul;23(4):456-87.

20 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.

21 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.

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.

23 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.

24 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.

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 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.

27 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.

28 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.

29 Tonhosolo R, Gabriel HB, Matsumura MY, Cabral FJ, Yamamoto MM, D'Alexandri FL, et al. Intraerythrocytic Stages of *Plasmodium falciparum* Biosynthesize Menaquinone. FEBS Lett. 2010 Oct 28. In press.

30 van Dooren GG, Stimmler LM, McFadden GI. Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. FEMS Microbiol Rev. 2006 Jul;30(4):596-630.

31 Michal G. Biochemical Pathways, An Atlas of Biochemestry and Molecular Biology. Nova York: John Wiley & Sons; 1999.

32 Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. Nature. 1990 Feb 1;343(6257):425-30.

33 Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science. 2001 May 11;292(5519):1160-4.

34 Zhou D, White RH. Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. Biochem J. 1991 Feb 1;273(Pt 3):627-34.

Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 3;95(5):2100-4.

36 Sprenger GA, Schorken U, Wiegert T, Grolle S, de Graaf AA, Taylor SV, et al. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 25;94(24):12857-62.

37 Hill RE, Himmeldirk K, Kennedy IA, Pauloski RM, Sayer BG, Wolf E, et al. The biogenetic anatomy of vitamin B6. A 13C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 1996 Nov 29;271(48):30426-35.

38 Cane DE, Du S, Robinson JK, Hsiung Y, Spenser ID. Biosynthesis of vitamin B_6 : Enzymatic coversion of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate to pyridoxol phosphate. Journal of the Americal Chemical Society. 1999;121(33):7722-23.

White RH. Stable isotope studies on the biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*. Biochemistry. 1978 Sep 5;17(18):3833-40.

40 Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 18;95(17):9879-84.

41 Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S, Seto H. Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for perpendid biosynthesis. Tetrahedron Letters. 1998;39(43):7913-16.

42 Richard SB, Bowman ME, Kwiatkowski W, Kang I, Chow C, Lillo AM, et al. Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C- methylerythritol synthetase involved in mevalonate-independent isoprenoid biosynthesis. Nat Struct Biol. 2001 Jul;8(7):641-8.

43 Rohdich F, Wungsintaweekul J, Eisenreich W, Richter G, Schuhr CA, Hecht S, et al. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6451-6.

44 Rohdich F, Kis K, Bacher A, Eisenreich W. The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. Curr Opin Chem Biol. 2001 Oct;5(5):535-40.

45 Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK, et al. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 2001 Dec 7;509(2):317-22.

46 Hecht S, Eisenreich W, Adam P, Amslinger S, Kis K, Bacher A, et al. Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):14837-42.

47 Adam P, Hecht S, Eisenreich W, Kaiser J, Grawert T, Arigoni D, et al. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Sep 17;99(19):12108-13.

48 Cunningham Jr. FX, Lafond TP, Gantt E. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. J Bacteriol. 2000 Oct;182(20):5841-8.

49 Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. FEBS Lett. 1997 Jan 6;400(3):271-4.

50 Disch A, Schwender J, Muller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular *algae* and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. Biochem J. 1998 Jul 15;333(Pt 2):381-8.

51 Putra SR, Disch A, Bravo JM, Rohmer M. Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gramnegative bacteria and mycobacteria. FEMS Microbiol Lett. 1998 Jul 1;164(1):169-75.

52 Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. Biosci Biotechnol Biochem. 2002 Aug;66(8):1619-27.

Ralph SA, Foth BJ, Hall N, McFadden GI. Evolutionary pressures on apicoplast transit peptides. Mol Biol Evol. 2004 Dec;21(12):2183-94.

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.

55 Wiesner J, Borrmann S, Jomaa H. Fosmidomycin for the treatment of malaria. Parasitol Res. 2003 Jun;90(Suppl 2):S71-6.

56 Missinou MA, Borrmann S, Schindler A, Issifou S, Adegnika AA, Matsiegui PB, et al. Fosmidomycin for malaria. Lancet. 2002 Dec 14;360(9349):1941-2.

57 Reichenberg A, Wiesner J, Weidemeyer C, Dreiseidler E, Sanderbrand S, Altincicek B, et al. Diaryl ester prodrugs of FR900098 with improved *in vivo* antimalarial activity. Bioorg Med Chem Lett. 2001 Mar 26;11(6):833-5.

58 Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. Prog Lipid Res. 1999 Jul;38(4):309-36.

59 Morell H, Clark MJ, Knowles PF, Sprinson DB. The enzymic synthesis of chorismic and prephenic acids from 3-enolpyruvylshikimic acid 5-phosphate. J Biol Chem. 1967 Jan 10;242(1):82-90.

60 Roche PA, Moorehead TJ, Hamilton GA. Purification and properties of hog liver 4hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Arch Biochem Biophys. 1982 Jun;216(1):62-73.

61 Herrmann KM, Weaver LM. The Shikimate Pathway. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1999 Jun;50:473-503.

62 McDowell LM, Schmidt A, Cohen ER, Studelska DR, Schaefer J. Structural constraints on the ternary complex of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from rotational-echo double-resonance NMR. J Mol Biol. 1996 Feb 16;256(1):160-71.

63 Sammons RD, Gruys KJ, Anderson KS, Johnson KA, Sikorski JA. Reevaluating glyphosate as a transition-state inhibitor of EPSP synthase: identification of an EPSP synthase.EPSP.glyphosate ternary complex. Biochemistry. 1995 May 16;34(19):6433-40.

64 McDowell LM, Klug CA, Beusen DD, Schaefer J. Ligand geometry of the ternary complex of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from rotational-echo double-resonance NMR. Biochemistry. 1996 Apr 30;35(17):5395-403.

65 Romagni JG, Meazza G, Nanayakkara NP, Dayan FE. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. FEBS Lett. 2000 Sep 1;480(2-3):301-5.

66 Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. Mol Nutr Food Res. 2005 Jan;49(1):7-30.

67 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.

68 Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Crit Rev Toxicol. 1993;23(2):147-69.

69 Bohm F, Edge R, Lange L, Truscott TG. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. J Photochem Photobiol B. 1998 Jul 31;44(3):211-5.

70 Bohm F, Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. FEBS Lett. 1998 Oct 9;436(3):387-9.

71 Palozza P, Krinsky NI. beta-Carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants. Arch Biochem Biophys. 1992 Aug 15;297(1):184-7.

72 Constantinescu A, Han D, Packer L. Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. J Biol Chem. 1993 May 25;268(15):10906-13.

73 Ho CT, Chan AC. Regeneration of vitamin E in rat polymorphonuclear leucocytes. FEBS Lett. 1992 Jul 20;306(2-3):269-72.

74 Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. J Lipid Res. 1992 Mar;33(3):385-97.

75 Ingold KU, Bowry VW, Stocker R, Walling C. Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 1;90(1):45-9.

76 Stoyanovsky DA, Osipov AN, Quinn PJ, Kagan VE. Ubiquinone-dependent recycling of vitamin E radicals by superoxide. Arch Biochem Biophys. 1995 Nov 10;323(2):343-51.

⁷⁷ Livrea MA, Tesoriere L. Interactions between vitamin A and vitamin E in liposomes and in biological contexts. Methods Enzymol. 1999;299:421-30.

78 Skinner-Adams T, Davis TM, Beilby J. Inhibition of growth *in vitro* of *Plasmodium falciparum* by vitamin E (alpha-tocopherol). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998 Jul-Aug;92(4):467-8.

79 Levander OA, Ager AL, Jr., Morris VC, May RG. Qinghaosu, dietary vitamin E, selenium, and cod-liver oil: effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite *Plasmodium yoelii*. Am J Clin Nutr. 1989 Aug;50(2):346-52.
80 Levander OA, Ager Jr. AL, Morris VC, May RG. Menhaden-fish oil in a vitamin Edeficient diet: protection against chloroquine-resistant malaria in mice. Am J Clin Nutr. 1989 Dec;50(6):1237-9.

81 Trager W, Jenson JB. Cultivation of malarial parasites. Nature. 1978 Jun 22;273(5664):621-2.

82 Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J Parasitol. 1979 Jun;65(3):418-20.

83 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.

⁸⁴Gueguen 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.

85 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.

86 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.

87 Lanina SA, Toledo P, Sampels S, Kamal-Eldin A, Jastrebova JA. Comparison of reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols. J Chromatogr A. 2007 Jul 20;1157(1-2):159-70.

88 Van Pelt CK, Haggarty P, Brenna JT. Quantitative subfemtomole analysis of alphatocopherol and deuterated isotopomers in plasma using tabletop GC/MS/MS. Anal Chem. 1998 Oct 15;70(20):4369-75.

89 Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften. 2002 Apr;89(4):137-46.

20 Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. Antimicrob Agents Chemother. 1995 Nov;39(11):2541-3.

91 Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Candan M, Yanikoglu A, et al. Insecticidal activity of major lichen compounds, (-)- and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens L*. Parasitol Res. 2008 May;102(6):1277-9.

Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Yaluff G, et al. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1997 Jan;116(1):51-4.

93 Verotta L, Appendino G, Bombardelli E, Brun R. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study. Bioorg Med Chem Lett. 2007 Mar 15;17(6):1544-8.

De Carvalho EA, Andrade PP, Silva NH, Pereira EC, Figueiredo RC. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi in vitro*: an ultrastructural study. Micron. 2005;36(2):155-61.

95 Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. Planta Med. 1995 Apr;61(2):113-5.

Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R, et al. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human *Papillomavirus*. Minerva Ginecol. 1999 Jun;51(6):255-60.

97 Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, et al. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1995 Aug;43(8):1388-90.

98 Meazza G, Scheffler BE, Tellez MR, Rimando AM, Romagni JG, Duke SO, et al. The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Phytochemistry. 2002 Jun;60(3):281-8.

99 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.

100 McGuire SO, James-Kracke MR, Sun GY, Fritsche KL. An esterification protocol for *cis*-parinaric acid-determined lipid peroxidation in immune cells. Lipids. 1997 Feb;32(2):219-26.

101 Soding J, Biegert A, Lupas AN. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. Nucleic Acids Res. 2005 Jul 1;33:244-8.

102 Keller Y, Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B. Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis--evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. Eur J Biochem. 1998 Jan 15;251(1-2):413-7.

103 Chakrabarti D, Azam T, DelVecchio C, Qiu L, Park YI, Allen CM. Protein prenyl transferase activities of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol. 1998 Aug 1;94(2):175-84.

104 Collakova E, DellaPenna D. Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis sp.* PCC 6803 and *Arabidopsis.* Plant Physiol. 2001 Nov;127(3):1113-24.

105 Ayi K, Cappadoro M, Branca M, Turrini F, Arese P. *Plasmodium falciparum* glutathione metabolism and growth are independent of glutathione system of host erythrocyte. FEBS Lett. 1998 Mar 13;424(3):257-61.

106 Simoes AP, van den Berg JJ, Roelofsen B, Op den Kamp JA. Lipid peroxidation in *Plasmodium falciparum*-parasitized human erythrocytes. Arch Biochem Biophys. 1992 Nov 1;298(2):651-7.

107 Davis TM, Binh TQ, Danh PT, Dyer JR, St John A, Garcia-Webb P, et al. Serum vitamin A and E concentrations in acute *falciparum* malaria: modulators or markers of severity? Clin Sci (Lond). 1994 Nov;87(5):505-11.

108 Das BS, Thurnham DI, Das DB. Plasma alpha-tocopherol, retinol, and carotenoids in children with *falciparum* malaria. Am J Clin Nutr. 1996 Jul;64(1):94-100.

109 Fujita T, Ogbonna JC, Hideo H, Aoyagi H. Effects of reactive oxygen species on α -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis*. Journal of Applied Phycology. 2008;21:185-91.

110 Ogbonna JC, Ichige E, Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 2002 Mar;58(4):532-8.

111 Ogbonna JC, Ichige E, Tanaka H. Regulating the ratio of photoautotrophic to heterotrophic metabolic activities in photoheterotrophic culture of *Euglena gracilis* and its application to α -tocopherol production. Biotechnology Letters. 2002;24:953-8.

112 Munne-Bosch S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. J Plant Physiol. 2005 Jul;162(7):743-8.

113 Munne-Bosch S, Schwarz K, Alegre L. Enhanced Formation of alpha-Tocopherol and Highly Oxidized Abietane Diterpenes in Water-Stressed Rosemary Plants. Plant Physiol. 1999 Nov;121(3):1047-52.

114 Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, Dellapenna D. Tocopherols protect *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 from lipid peroxidation. Plant Physiol. 2005 Jul;138(3):1422-35.

115 Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. Plant Cell. 2004 Jun;16(6):1419-32.

116 Falk J, Munne-Bosch S. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. J Exp Bot. 2010 Jun;61(6):1549-66.

117 Cheng SC, Burton GW, Ingold KU, Foster DO. Chiral discrimination in the exchange of alpha-tocopherol stereoisomers between plasma and red blood cells. Lipids. 1987 Jul;22(7):469-73.

118 Biswas T, Pal JK, Naskar K, Ghosh DK, Ghosal J. Lipid peroxidation of erythrocytes during anemia of the hamsters infected with *Leishmania donovani*. Mol Cell Biochem. 1995 May 24;146(2):99-105.

119 Sen G, Mukhopadhaya R, Ghosal J, Biswas T. Interaction of ascorbate and alphatocopherol enhances antioxidant reserve of erythrocytes during anemia in visceral leishmaniasis. Life Sci. 2000 Nov 17;67(26):3181-90.