Raquel Maria Simão Gurge

Estudo da via de heme farnesilado e dos inibidores desta via em estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo
2017

Raquel Maria Simão Gurge

Estudo da via de heme farnesilado e dos inibidores desta via em estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

Co-Orientador: Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

Versão original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Simão-Gurge, Raquel Maria
Estudo da via de heme farnesilado e dos inibidores desta via em estágios intraeritrocitários de P. falciparum. / Raquel Maria Simão-Gurge; orientador Alejandro Miguel Katzin; coorientador Gerhard Wunderlich. -- São Paulo, 2017.
143 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. heme O. 2. Farnesilação. 3. Plasmodium falciparum. 4. Isoprenoides. I. Katzin, Alejandro Miguel, orientador. II. Wunderlich, Gerhard , coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-Graduação da Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

---

Candidato (a): Raquel Maria Simão Gurge

Tese: Estudo da via de heme farnesilado e dos inibidores desta via em estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública, realizada a .... / .... / .... , considerou:

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Presidente Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **542/12** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização do Heme O, do Heme A e das enzimas COX10 e COX15 durante o desenvolvimento intra-eritrocítico de Plasmodium falciparum*" sob a responsabilidade de **Raquel Maia Simão Gurge,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 22 de novembro de 2012.

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

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

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por tantas bênçãos recebidas e pela presença em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Manoel e Wilma, aos meus irmãos em especial ao Marcos, ao meu marido Rick, e a minha filha Eduarda pelo apoio e amor incondicionais que tornaram esta conquista possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, PAI de infinita bondade, pela força para empreender esta caminhada, por torná-la possível e por, em nenhum momento que seja, teres me desamparado ou deixado que o desânimo me alcançasse.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin, pela orientação constante, por todo saber partilhado e apoio.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Gerhard Wunderlich, pela contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Malária e do Laboratório de Biologia Molecular, pelo incansável apoio e companheirismo.

Aos colaboradores deste projeto Julia, Brenda, Fernando, Gerardo, Antonio e ao John, sem a colaboração de todos esse trabalho não seria o mesmo.

Aos colegas do departamento de Parasitologia, dentre eles em especial a Eliana, Ismael, Paola e Oneida, aos meus colegas e amigos de fora do mundo da ciência, dentre eles em especial a Yara, Mariano, Deborah e Carla, por todo apoio moral necessário para terminar esse trabalho.

Ao meu marido Rick, pelas risadas, pela cumplicidade, pela força, companheirismo, pela grande amizade e amor e por ter me apoiado nos bons e maus momentos.

Aos meus pais, Manoel e Wilma, e meus irmãos, pela compreensão, apoio, amor e dedicação imensuráveis.

A minha filha Eduarda que me ensinou a ver a vida com outros olhos, que me mostrou o que é o amor incondicional e que dá sentido à minha vida. Cada sorriso da Eduarda renova minha força para continuar.

A todos os funcionários do departamento, desde os técnicos (Emília, Mario, Valnice, Marinete, Wolf dentre outros) aos funcionários da limpeza e do departamento em geral.

Às demais pessoas que, de uma ou de outra maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo incentivo financeiro no início do trabalho para matricula 8210214.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por toda confiança e incentivo financeiro do processo 2012/20273-9 e para matricula 8210214.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

Resumo

Simão-Gurge RM. Estudo da via de heme farnesilado em estágios intraeritrocitários de *P. falciparum* e dos inibidores desta via. [Tese (Departamento de Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Atualmente, linhagens *Plasmodium falciparum* tem apresentado resistência contra todos os antimaláricos em uso, o que leva a necessidade do desenvolvimento de novas drogas, para isso o nosso grupo tem trabalhado com a caracterização de produtos da biossíntese de isoprenoides em *P. falciparum*, uma via diferente da encontratada no hospedeiro vertebrado. O farnesil-PP (FPP), um intermediário da via de isoprenoides, pode ser substrato para a síntese de diversos isoprenoides, ou pode se ligar a um grupo heme. A investigação da via de biossíntese de heme farnesilado em *P. falciparum* é interessante, já que, os principais antimaláricos têm seu mecanismo de ação relacionado ao heme. Outro importante alvo derivado da via de isoprenoides, é a via de biossíntese de giberilina porque: é estudada em plantas; e já são conhecidos inibidores dessa via que não prejudiciais ao homem. Inabenfide (INA) e uniconazol-P (UNP) inibem a biossíntese de giberilina em plantas, e o crescimento de *P. falciparum*, por isso decidimos estudar um possível alvo dessas drogas no parasita. Inicialmente, identificamos no genoma do *P. falciparum* genes homólogos, cox10 e 15, que codificam as enzimas (HOS e HAS) necessárias para a síntese de heme O e heme A. O alinhamento das sequências de *P. falciparum* com a de outras espécies bem como as arvores filogenéticas, permitiram predizer que as candidatas, cox10 e 15, codificam HOS e HAS. Além disso, parasitas transgênicos expressando versões fusionadas a GFP permitiram identificar como possível localização de cox10 o núcleo e de cox15 a mitocôndria. Para caracterização do heme O, realizamos: marcações metabólicas com [1-^{3}H]FPP ou com [U-^{14}C]glicina, extração com acetona ácida de heme B e heme O; separação por coluna de afinidade; e um estudo com diferentes técnicas de espectrometria de massas. Os resultados obtidos nos permitiram identificar uma via de biossíntese ativa para heme B e O. Apesar dos esforços não identificamos uma via para biossíntese de heme A, o que é compreensivo já que alguns organismos só biossintetizam heme O. Além disso, como não observamos uma possível via ativa para produção de giberilina, resolvemos verificar se INA e UNP (assim como outros antifúngicos) atuam na via de biossíntese de heme e seus derivados. Resultados obtidos por estudo de oxidação e redução indicaram que estas drogas interferem na via de biossíntese do heme O; e experimentos com marcador de potencial de mitocôndria indicam que na presença da droga diminuiu a capacidade funcional desta organela no parasita. Os resultados obtidos nos levaram a fazer um estudo de marcação metabólica, com precursores radioativos da formação de heme B e O em parasitas tratados com INA e UNP, o qual nos permitiu concluir que na presença das drogas há uma diminuição da produção de heme O. Sendo assim, podemos dizer que a via de biossíntese de heme O é ativa em *P. falciparum* e que inibidores dessa via podem estar relacionados com a diminuição da parasitemia. A via de biossíntese de heme farnesilado é um importante alvo para drogas antimaláricas.

Palavras-chaves : heme O. Farnesilação. *Plasmodium falciparum.* Isoprenoides.

Abstract

Simão-Gurge RM. Study of the farnesylated heme synthesis pathway in intra-erythrocyte stages of *P. falciparum* and inhibitors of this pathway. [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

The development of antimalarials is necessary because there are *Plasmodium* strains resistant to the drugs in use and an important target is the isoprenoid pathway. Targets derived from the isoprenoid pathway are: heme O as there are antimalarial drugs related to heme; And gibberillin, because there are inhibitors which are not harmful to man. Inabenfide (INA) and uniconazole-P (UNP) inhibit biosynthesis of gibberillin in plants and of growth the *P. falciparum*. Initially, we identified in *P. falciparum* genes homologous to cox10 and 15 encoding the enzymes (HOS and HAS) for synthesis of heme O and A. We created transgenic parasite lines which had HOS and HAS tagged to GFP. These revealed that the subcellular location of cox10 is in the nucleus and of cox15 in mitochondria. We identified heme O by metabolic labeling and mass spectrometry. However, no heme A or gibberellin was detected. INA and UNP decreased heme O biosynthesis and parasitemia as observed by oxido-reduction and metabolic labeling. Our data point to heme O as an important target for antimalarials.

Keywords: heme O. Farnesylation. *Plasmodium falciparum*. Isoprenoids.

Lista de Figuras

Figura 1 - Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* 25
Figura 2 - Desenho esquemático de *Plasmodium falciparum* na forma merozoíta. 26
Figura 3 - Desenho esquemático de *Plasmodium falciparum* no estágio trofozoíta jovem. 27
Figura 4 - Desenho esquemático de *Plasmodium falciparum* no estágio trofozoíta. 27
Figura 5 - Desenho esquemático de *Plasmodium falciparum* na forma esquizonte. 28
Figura 6 - Resistência aos principais antimaláricos 31
Figura 7 - Distribuição global da malária, mostrando áreas onde o *P. falciparum* é resistente às drogas antimaláricas comumente usadas 32
Figura 9 - Modelo de polimerização do heme e inibição do mesmo por artemisinina 35
Figura 10 - Via híbrida de biossíntese do heme em *P. falciparum.* 37
Figura 11 - Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP. 39
Figura 12 - Diagrama da via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) de biossíntese dos isoprenoides de cadeias básicas 41
Figura 13 - Os isoprenoides são sintetizados pelos precursores, isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP) 42
Figura 14 - Vias biossintéticas de isoprenoides, giberelina e inibidores conhecidos em vários organismos 54
Figura 15 - Via de biossíntese de heme em *P. falciparum.* 55
Figura 16 - Via de biossíntese de hemes.. 55
Figura 17 - Diagrama da estratégia de integração dos tags na região C-terminal da proteína de interesse (POI corresponde a Cox10 e Cox15 nesse projeto). 68
Figura 18 - Esquema da ferramenta genética da ribozima glmS.. 69
Figura 19 - Esquema mostra a inserção dos fragmentos cox10 e cox15 em plasmídeo p426.MET25 72
Figura 20 - Cromatogramas realizados por HPLC para o padrão de Giberelina 75
Figura 21 - Perfil de eluição radioativa em parasitos (A) e eritrócitos (B) marcados metabolicamente com [^{3}H]-GGPP, identificado por RP-HPLC 75
Figura 22 - Teste de toxicidade com diferentes concentrações de GA4 e GA3 adicionadas ao meio de cultivo de *P. falciparum* 76
Figura 23 - Microteste de recuperação por Giberelina, com meio acrescido de 50 µM de GA3 ou GA4 em parasitas incubados com as IC_{50} das drogas INA (3,0 µM) e UNP (30 µM). 77

Figura 24 - Alinhamento de cox10 e cox15 com *T. cruzi, T. brucei, Leishmania, Saccharomyces cerevisiae, Arabidopsis thaliana* e *Plasmodium falciparum*. 80
Figura 25 - Árvore filogenética de cox10 mostrando a evolução da enzima. 81
Figura 26 - Árvore filogenética de cox15 mostrando a evolução da enzima.. 82
Figura 27 - Cromatografia realizados por RP-HPLC para o produto referência, Deuteroporfirina IX, e heme O extraído..... 84
Figura 28 - Espectro de massa de extrato de bactérias pet9a/ctb separada pela coluna Sep-Pak® C18. 85
Figura 29 - Biossíntese de heme O por *P. falciparum*..... 87
Figura 30 - Análise LC / MS de extratos de parasitas, heme O foi separado por coluna Sep-Pak® C18 e eluído com DMSO 89
Figura 31 - Análise MALDI-TOF/TOF de extratos de parasitas 90
Figura 32 - Estruturas dos íons de produto heme O obtidas por software, Mass Frontier (Thermo Scientific TM). 90
Figura 33 - Inibição da biossíntese de heme O em parasitas tratados durante 48h com INA ou UNP 93
Figura 34 - Inibição da biossíntese de heme O em parasitas tratados durante 48h com INA ou UNP.. 93
Figura 35 - Análise por citometria de fluxo da concentração de (A) 2 µM de JC-1 e (B) 2 µM de JC-1+ 100 µM FCCP. 95
Figura 36 - Hemácias parasitadas tratadas com INA 2,0 µM e incubadas com JC-1 95
Figura 37 - Diminuição no potencial de mitocôndria dos parasitas tratados por 48 horas. 96
Figura 38 - Análise estatística de tratados com INA, UNP e cloroquina (CLQ). 97
Figura 39 - Estudo *in vivo* da parasitemia em camundongos Balb/c em tratamento com INA. 98
Figura 40 - pCox10-HA/Stre3,75KDa, confirmados por Western Blot utilizando antiHA para detecção de proteínas contendo o epítopo HA. 101
Figura 41 - Localização das enzimas candidatas a cox10 (A e B) e cox15 (C e D)..... 101
Figura 42 - A- esquema de análise da sequência de Pfcox15 inserida em pRS426M25..... 105
Figura 43 - Teste de complementação e de função de leveduras cox15Δ por pRS-Pfcox15..106
Figura 44: Medidas de consumo de oxigênio, em glicerol 3%, de *S. cerevisiae* DY5113 (WT) e DY5113 cox15Δ 107

Lista de Tabelas

Tabela 1- Oligos desenhados de acordo com a sequência dos genes putativos PF3D7_0519300 e PF3D7_1435000. 64
Tabela 2- Análise das sequências de *P. falciparum* (Pf), outros parasitas e leveduras, por diferentes programas..... 103

Lista de Símbolos

°C - Graus Celsius

µF - Microfarads

gr - Grama

g - Gravidade

h - Hora

i.p. - Intraperitoneal

µL - Microlitro

kV - Quilovolt

µm - Micrômetro

µM - Micromolar

M - Molar

mg/mL - Miligrama por mililitro

mg/kg - Miligrama por quilograma

min - Minutos

mL - Mililitro

mM - Milimolar

m/z - Relação massa/carga

ng - Nanograma

% - Porcentagem

pH - Potencial de hidrogênio

pb - Pares de bases

rpm - Rotações por minuto

s - Segundos

cDNA - ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar

gDNA - DNA genômico

Lista de Abreviaturas

5-ALA - 5-aminolevulínico

5-ALAS - 5-aminolevulinico sintase

[1-(n)-^{3}H] GGPP - geranilgeranila pirofosfato tritiado

[1-^{3}H]FPP - farnesil difosfato tritiado

[U- ^{14}C] glicina – glicina uniformemente marcada com carbono

ACN - acetonitrila

ACTs - artemisinin-based combination therapy

Amp - ampicilina

ALAD - ácido 5-aminolevulínico desidratase

BSA - albumina soro bovina

CDP-MEP - 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato

DP-MEP-2P - 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato

CcO - citocromo c oxidase

CE - expressão condicional ou regulada

CEEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal

CLQ - cloroquina

CO_2 - gás carbônico

CPO - coproporfirinogénio oxidase

CPPS - copalil-difosfato sintase

CTP - citidina trifosfato

CYP - citocromo P450 monooxigenase

CYC1 - citocromo C1

Da - daltons

DAPI - 4´,6 diamidino-2-phenylindole

DD24 - domínio desestabilizador variante 24

DD - domínio desestabilizante

DMAPP - dimetilalil difosfato

DMSO - dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - desoxirribonucleotídeos fosfatados

DOXP - d-xilulose-1-desoxi-5 fosfato

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

ETC - cadeia de transporte de elétrons

FC - ferroquelatase

FCCP - fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona

FPP - farnesil difosfato

GA - gibberellina

GAP - gliceraldeído 3-fosfato

GcpE - hidroximetilbutenil difosfato sintase

gDNA – DNA genômico

GFP - green fluorescence protein

GGP - difosfato de geranila

GGPP - difosfato de geranilgeranila

GlcN - N acetil glucosamina

glmS - glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase

GlcN - glucosamina

GPP - geranil difosfato

HCl - ácido clorídrico

H_2O - água

HAS - heme A sintase

HA - hemaglutinina

hDHFR - gene que codifica a diidrofolatoredutase humana

HDP - proteína heme desintoxicação

Hepes - 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

HOS - heme O sintase

HMBPP - 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato

ICB-USP - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IFA - imunofluorescência

INA - inabenfide

IPP - isopentenil pirofosfato

KCl - cloreto de potássio

KO - ent-caureno oxidase

KS - ent-caureno sintase

LC-MS/MS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

LB - Meio Luria-Bertani

LI - imagem de fluorescência com células vivas

LiCl - cloreto de lítio

LSD - dietilamida do ácido lisérgico

LytB - hidroximetilbutenil difosfato redutase

MALDI - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MCT - 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidina transferase

MCS - 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase

ME-2,4-cPP - 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato

MEP - 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato

$MgCl_2$ – cloreto de magnésio

MVA - via do mevalonato

MS/MS - Espectrometria de massa em tandem

N_2 - gás nitrogênio

NaCl - cloreto de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

O_2 - gás oxigênio

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBGD - porfobilinogénio desaminase

PbGFP - *P. berghei* ANKA GFP

PBS - salina em tampão fosfato

PCR - reação em cadeia de polimerase

PEG - polietilenoglicol

PfATP6 - . falciparum Ca^{+2}-ATPase

POI - lócus genômico que codificam as proteínas de interesse

PPO - protoporfirinogénio oxidase

RNA - ácido ribonucleico

RNAse - ribonuclease

ROS - espécies reativas de oxigênio

RP-HPLC - cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa

RPMI - Roswell Park Memorial Institute (meio de cultivo)

RT - transcrição reversa

RT-PCR - reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

TFA - ácido trifluoroacético

Taq DNA polimerase - DNA polimerase termoestável

Tris - Tris-hidroximetilaminometano

UNP - uniconazole-P

UROS - uroporfirinogénio III sintase

UROD - uroporfirinogénio descarboxilase

WR99210 - 1,6-Dihydro-6,6-dimethyl-1-[3-(2,4,5-trichlorophenoxy)propoxy]-1,3,5-triazine-2,4-diamine

WT - Wild type

YP - extrato de levedura e peptona

Sumário

1 Introdução **22**
2 Revisão de Literatura **24**
2.1 Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* que infectam humanos **25**
2.2 Morfologia e estrutura do parasito no ciclo intraeritrocitário **26**
2.3 O apicoplasto **28**
2.4 Resistência aos fármacos no tratamento da malária **30**
2.4.1 Artemisinina: destaque no Prêmio Nobel de Medicina de 2015 ..... **32**
2.4.1.1 A Artemisinina **34**
2.5 Heme. **36**
2.6 Prenóis (Isoprenoides) **38**
2.6.1 Biossíntese de isosprenoides **39**
2.6.1.1 Metabolismo primário de isoprenoides **39**
2.6.1.1.1 Via do 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP) **40**
2.6.1.1.2 Metabolismo secundário de isoprenoides **41**
2.7 O heme farnesilado **43**
2.7.1 Heme O sintase - HOS **44**
2.7.2 Heme A sintase - HAS **44**
2.7.3 Relação entre o heme e os antifúngicos **45**
2.8 Giberelina **46**
3 Justificativa **47**
4 Objetivos **49**
4.1 Objetivo Geral **50**
4.2 Objetivos específicos **50**
5 Materiais e métodos **51**
5.1 Resumo dos experimentos conduzidos **52**
5.2 Cultura de *P. falciparum* **53**
5.3 Marcação metabólica **53**
5.4 Extração de Giberelina **55**
5.5 Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) para separação de giberelina **56**
5.6 Teste de IC_{50} in vitro das drogas Uniconazol-P e Inabenfide e Microteste de recuperação **56**
5.7 Análise *in silico* **57**
5.8 Preparação de heme O padrão **58**
5.9 Extração de heme B e heme O **58**
5.10 Extração de heme A **59**
5.11 Separação de heme B, heme O e heme A **59**
5.12 Marcação metabólica de heme B e heme O em parasitas tratados com Inabenfide e Uniconazol-P **59**
5.13 Espectrometria de massas **60**
5.13.1 MALDI ***60***
5.13.2 LC-MS/MS ***61***
5.14 Efeito das drogas inabenfide e uniconazol-P na produção de hemes **61**
5.14.1 Potencial de mitocôndria **61**
5.15 Teste *in vivo* **62**
5.16 Animais experimentais **62**
5.17 Infecção **62**
5.18 Parasitemia **63**
5.19 Camundongos Balb/c infectados com PbGFP tratados com INA **63**

5.20 Extração de ácido nucleico, amplificação por PCR, clonagem do gene que codifica a cox10 e a cox15 ..... **63**
5.21 RT-PCR (transcrição reversa-PCR) **64**
5.22 Sequenciamento **64**
5.23 Extração de DNA do plasmídeo em pequena escala (Miniprep) **65**
5.24 Extração de DNA do plasmídeo em grande escala (Maxiprep, segundo Sambrook et al. 1991).. ..... **66**
5.25 Extração de gDNA de *P. falciparum* **67**
5.26 Construção dos vetores de integração **67**
5.27 Transfecção em *P. falciparum* para geração das linhagens transgênicas com os plasmídeos integrados e seleção dos parasitas **69**
5.28 Ciclagem dos parasitas **70**
5.28.1 Clonagem dos parasitas por diluição limitante ***70***
5.29 Cultivo de *P. falciparum* com N-Acetil glucosamina **70**
5.30 Imunofluorescência **70**
5.31 Funções enzimáticas das recombinantes cox10 e da cox15 ..... **71**
5.32 Análise estatística **72**
6 Resultados e discussão **73**
6.1 Giberelina **74**
6.1.1 Identificação de Giberelina e os efeitos de inabenfide e uniconazol-P em P. falciparum ***74***
6.1.2 Teste de recuperação do parasita ***76***
6.2 O estudo da via do heme farnesilado e de possíveis inibidores dessa via **78**
6.2.1 Um estudo in silico das enzimas candidatas a: farnesilação do heme e da biossíntese de heme A **78**
6.2.2 Identificação dos hemes em P. falciparum por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) ***83***
6.2.3 Preparação de heme O padrão ***84***
6.2.4 Marcação metabólica para verificar a biossíntese heme B e heme O por P. falciparum ***86***
6.2.5 Espectrometria de Massa em extrato de parasita para verificar a presença de hemes ***88***
6.2.6 INA e UNP inibem a biossíntese de heme O ***92***
6.2.7 Potencial de mitocôndria na presença de Inabenfide e Uniconazol-P ***94***
6.2.8 Estudo in vivo de INA ***97***
6.2.9 Estudo da biossíntese de heme A em P. falciparum ***99***
6.2.10 Localização e função das enzimas candidatas a Cox10 e Cox15 ..... ***100***
6.2.11 Função de cox10 e 15 por Complementação em leveduras ***103***
6.2.12 Δcox15 e os resultados esperados ***104***
7 Considerações finais e Conclusão **108**
7.1 Considerações finais **109**
7.2 Conclusão **110**
Referências Bibliográficas **111**
Anexos **123**
I - Biosynthesis of heme O in intraerythrocytic stages of *P. falciparum* and inhibitors of this pathway **123**
II – Preliminary studies of biosynthesis of heme O and heme A in intraerythrocytic stages of *P. falciparum*. **141**

1 Introdução

A malária, em termos de morbidade e mortalidade em seres humanos é um importante problema de saúde pública. Principalmente nas regiões tropicais da África subsaariana, Ásia, Oceania e América (1). A estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) é de 219 milhões de novos casos e 660.000 mortes por ano, a maioria crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas (2).

A malária está presente em 97 países, e 3,3 bilhões de pessoas estão em área de risco, das quais 1,2 bilhões estão em risco elevado de contraírem a doença (3). As comunidades mais pobres e marginalizadas estão sujeitas ao maior risco de contrair malária, devido à falta de serviços eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento (4).

No Brasil a maioria dos casos de malária se concentra na região Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), área endêmica para a doença. Entretanto, nas demais regiões se observa uma maior letalidade quando comparada a região Amazônica, motivo pelo qual a doença não pode ser negligenciada mesmo nas áreas não endêmicas (5). Uma redução gradual do número total de casos tem sido observada nos últimos cinco anos, porém em 2012 houve um aumento significativo no número de casos na Amazônia brasileira. Em 2013, segundo dados da OMS, foram registrados 308 mil casos de malária no Brasil (99% destes na região Norte) com 79 mortes (6).

A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, a transmissão natural se dá pela picada das fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*. Os mosquitos transmissores da malária pertencem à: ordem Díptera; infra ordem Culicomorpha; família Culicidae; gênero *Anopheles*.

Segundo o Portal da Saúde – Ministério da Saúde, 2014 (7), o gênero *Anopheles* compreende cerca de 400 espécies, mas apenas cerca de 60 são capazes de transmitir a doença em condições naturais. No Brasil 11 das espécies têm importância epidemiológica na transmissão da doença: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*; *Anopheles (Nys.) aquasalis*; espécies do complexo *Anopheles (Nys.) albitarsis s. l.*; *Anopheles (Nys.) marajoara*; *Anopheles (Nys.) janconnae*; *Anopheles (Nys.) albitarsis s. s*; *Anopheles (Nys.) deaneorum*; espécies do complexo *Anopheles (Nys.) oswaldoi; Anopheles (Kerteszia) cruzii*; *Anopheles (K.) bellator* e *Anopheles (K.) homunculus*. Os vetores da malária são popularmente conhecidos por “carapanã”, “muriçoca”, “sovela”, “mosquito-prego” e “bicuda” (7).

Os anofelinos se criam em águas de remansos de rios e córregos, lagoas, represas,

açudes, valas e valetas de irrigações, alagados, pântanos e em águas coletadas em plantas bromeliáceas.

Com relação ao parasita, este é transmitido ao hospedeiro vertebrado durante a picada de uma fêmea do mosquito infectada. Atualmente são conhecidas aproximadamente 100 espécies que pertencem ao gênero *Plasmodium*, estes infectam vários vertebrados, como aves, répteis, peixes, e primatas superiores. Apenas cinco espécies podem infectar o homem e essa alta especificidade entre hospedeiro e parasito indica uma longa associação entre esses organismos e uma possível evolução conjunta. Nas infecções por *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, predomina a forma da doença caracterizada, classicamente, por: febre intermitente (paroxismo febril), sudorese, mal-estar, vômitos e intensa debilidade física. Já a maioria dos casos de malária grave e de óbitos é causada pelo *P. falciparum*, espécie mais virulenta, entretanto, existem relatos cada vez mais frequentes de infecções graves pelo *Plasmodium vivax* (8).

O ciclo completo de desenvolvimento do parasita da malária no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* foi descrito entre 1898 e 1899 pelos pesquisadores Ronald Ross, Amico Bignani, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi (9). Vários experimentos foram realizados nos anos seguintes para confirmar a transmissão da malária pelo mosquito, e todas as formas de desenvolvimento do parasito no inseto e no homem foram identificadas. Em 1976, William Trager conseguiu cultivar *P. falciparum in vitro* (9).

2 Revisão de Literatura

2.1 Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* que infectam humanos

O ciclo biológico do *Plasmodium*, entre as espécies que infectam os humanos é muito semelhante e apresenta basicamente duas fases (Figura 1):

Ciclo no hospedeiro vertebrado: fase na qual ocorre a reprodução assexuada (esquizogonia) que pode ser dividida em fase hepática e ciclo eritrocítico ou intraeritrocítico (10).

Ciclo no hospedeiro invertebrado: nesta fase a reprodução é sexuada, o que possibilita a recombinação gênica e, com isso, o surgimento de novas cepas que podem ser resistentes às drogas usadas para o controle da doença. Os anofelinos machos se alimentam de néctar e seiva vegetal e as fêmeas de sangue, para o amadurecimento de seus ovos e para possibilitar a ovoposição (10).

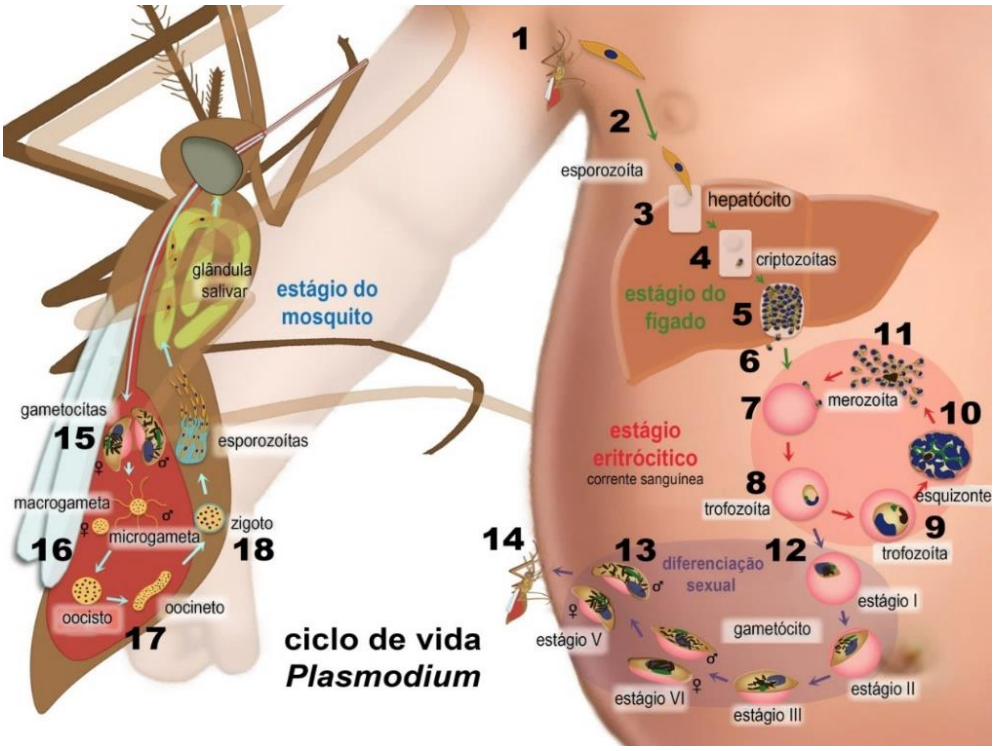

Figura 1 - Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*

Na Figura 1 é possível observar que durante a alimentação, a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítas no hospedeiro humano – 1. Os esporozoítas – 2, podem então infectar as células hepáticas. Ao invadirem os hepatócitos – 3, os esporozoítas transformam-se em criptozoítas – 4 e após o processo de multiplicação, a esquizogonia, os parasitas se transformam em esquizontes hepáticos – 5. Com a ruptura dos esquizontes hepáticos – 6, os merozoítas são liberados na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos – 7. Após a invasão, os merozoítas se desenvolvem para os estágios: trofozoíta jovem – 8, trofozoíta maduro – 9, e esquizonte – 10. No ápice dos esquizontes as hemácias se rompem e liberam novos merozoítas que darão continuidade ao ciclo eritrocítico – 11. Alguns parasitas na forma trofozoíta jovem se diferenciam em gametócitos – 12, formando os gametócitos masculino e feminino – 13. Ao serem ingurgitados pela fêmea do mosquito – 14 os gametócitos masculino e feminino se diferenciam, no estômago do inseto, em microgameta e macrogameta, respectivamente – 15. O macrogameta é fecundado pelo microgameta gerando o zigoto ou oocineto – 16, este migra para a membrana basal do epitélio estomacal do inseto. O oocineto então sofre meiose e se transforma em oocisto – 17. O oocisto sofre uma multiplicação esporogônica gerando milhares de esporozoítas, que, após a ruptura do oocisto – 18 irão se dirigir às glândulas salivares do inseto. Fonte: Biamonte et al., 2013 (11) (adaptado).

Durante o ciclo assexuado, os gametócitos fêmeas (macrogametócitos) e os gametócitos masculinos (microgametócitos) permanecem na corrente sanguínea até serem ingeridos durante a picada, por outro mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (12).

Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos originam formas evolutivas do parasito denominadas hipnozoítos, que podem permanecer em estado de latência no fígado. Estes hipnozoítos são responsáveis pelas recaídas da doença, que ocorrem após períodos variáveis, em geral dentro de 3 a 9 semanas após o tratamento. Para a maioria das cepas de *P. vivax*, é necessário o tratamento das formas sanguíneas e dos hipnozoítos (11).

2.2 Morfologia e estrutura do parasito no ciclo intraeritrocitário

O ciclo intraeritrocítico é o que apresenta as formas do parasito cultivadas *in vitro*: merozoíta, trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte. O estágio merozoíta (Figura 2) é importante imunologicamente, porque, é extracelular (13) e fica exposto enquanto deixa um eritrócito para invadir outro, pois, apesar do tempo do merozoíta extracelular ser curto para formação de anticorpo pelo hospedeiro, é um alvo para produção de vacina.

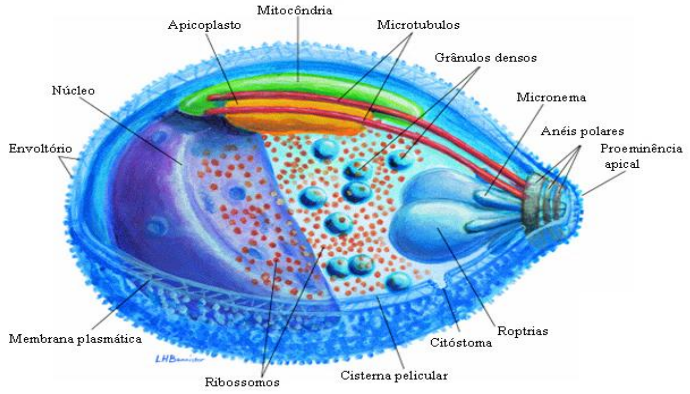

Figura 2 - Desenho esquemático de *Plasmodium falciparum* na forma merozoíta.
Fonte: Bannister et al., 2000 (13) (adaptado).

Após a invasão do eritrócito o parasita começa a se desenvolver à trofozíta jovem, as organelas do complexo apical do merozoíta regridem, e o cistóstoma se desenvolve e será responsável pela fagocitose nas fases seguintes. Uma grande quantidade de retículo endoplasmático liso e rugoso começa a ser formado, e também, possivelmente nessa fase, começa a ocorrer à formação de um complexo de Golgi não tradicional, chamado de “Golgi like” (14). É no trofozoíta jovem, que o apicoplasto começa a se desenvolver (Figura 3) (15).

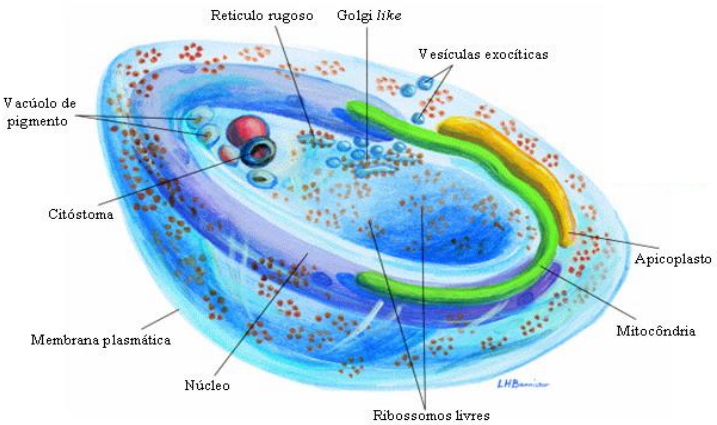

Figura 3 - Desenho esquemático de *Plasmodium falciparum* no estágio trofozoíta jovem.
Fonte: Bannister et al., 2000 (13) (adaptado).

Na transição de trofozoíta jovem para trofozoíta maduro (Figura 4), inicia a digestão da hemoglobina do eritrócito pelo parasita. A disgestão da hemoglobina ocasionando a formação de vários vacúolos alimentares, incluindo a do vacúolo de pigmento onde a hemozoína é estocada. O desenvolvimento das organelas internas continua, e o apicoplasto provavelmente alcança o auge de suas atividades. A síntese de algumas das moléculas necessárias para a multiplicação de parasitas, incluindo DNA, inicia na fase trofozóito (13).

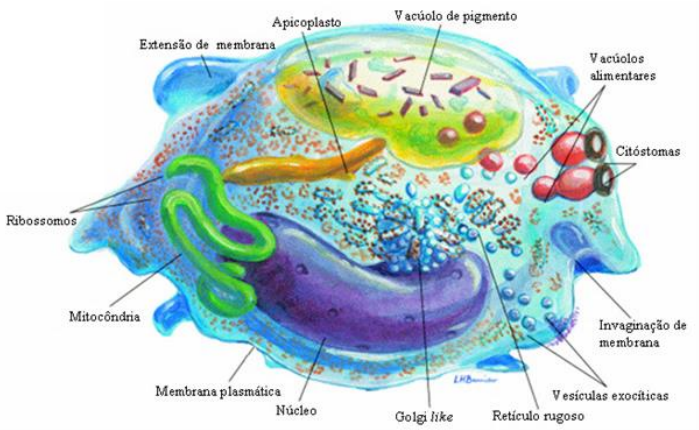

Figura 4 - Desenho esquemático de *Plasmodium falciparum* no estágio trofozoíta.
Fonte: Bannister et al., 2000 (13) (adaptado).

O trofozoíta maduro que sofre ou sofreu divisão nuclear repetitiva por esquizogonia transita para forma de esquizonte (Figura 5), os esquizontes eritrocitários maduros apresentam entre 6 e 32 núcleos, que darão origem a igual número de merozoítos. Ao final da esquizogonia, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, coincidindo temporalmente com os picos febris periódicos característicos da malária (13).

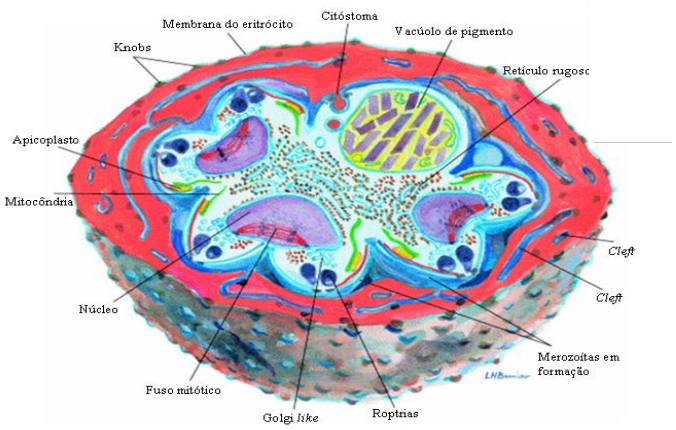

Figura 5 - Desenho esquemático de *Plasmodium falciparum* na forma esquizonte.
Fonte: Bannister et al., 2000 (13) (adaptado).

O importante de se conhecer a fisiologia e a biologia do parasita é que podemos voltar a atenção para organelas ou vias que são potencias alvos para desenvolvimento de antimaláricos, como é o caso do apicoplasto e da via de isoprenoides.

2.3 O apicoplasto

O apicoplasto é um plastídio não fotossintetizante presente na maioria dos organismos do *Phylum* apicomplexa. Ele foi descrito inicialmente em *Toxoplasma gondii* e considerado desde então como uma importante organela para esses parasitas (16).

Acredita-se que o apicoplasto tenha tido origem de uma endossimbiose secundária, uma relação simbiótica, que se refere a um eucariota que englobou e reteve outro eucariota, o qual obteve um plastídio por endosimbiose primária de um procariota (17). Uma característica fundamental de uma organela típica de endossimbiose, tal como um plastídio, é sua capacidade de transferir grande parte de seus genes para o genoma nuclear durante o processo gradual de evolução, por isso, o apicoplasto manteve características de organismos fotossintetizantes (18,19).

Estudos em *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* demonstraram que o apicoplasto possui funções vitais para o parasito. As drogas que inibem a transcrição gênica nessa organela causam a morte dos parasitas (20). Além disso, em *T. gondii* e em *P. falciparum* foi confirmado que, durante a divisão do parasita, uma interferência no processo de segregação do apicoplasto forma células filhas viáveis, porém, essas não conseguem se dividir nos ciclos subsequentes (21,22). Devido a este fenótipo chamado de “morte retardada”, antibióticos, como a tetraciclina e clindamicina, apesar de ação lenta, muitas

vezes foram combinados com fármacos antimaláricos convencionais para quimioterapia eficaz.

Parasitas com o apicoplasto deletado não se desenvolvem em cultura, entretanto, quando adicionando isopentenil difosfato (IPP) ao meio o *P. falciparum* consegue se recuperar (23). Vários aspectos do resgate químico com precursores isoprenoides são notáveis, IPP exógeno poderia ser resgatado pelo parasita através de vias de permeação estabelecidas nos eritrócitos parasitados ou outros transportadores de membrana não caracterizados (24,25). O eritrócito é em grande parte metabolicamente inativo, e é improvável que haja uma significativa biossíntese de precursores de isoprenoides através da via de mevalonato do hospedeiro (26). Também é improvável que estas moléculas pirofosforiladas de alta energia se acumulassem a níveis apreciáveis no plasma (200 μM era necessário para o resgate). Consequentemente, a aquisição de IPP a partir de sangue infectado é improvável (27).

Sendo assim, a investigação sobre a importância metabólica do apicoplasto neste parasita concluiu que: a principal via biossintética que opera dentro desta organela é a que envolve a biossíntese de isoprenoides, ou seja, essa é a única via essencial durante o crescimento sanguíneo assexuado do *P. falciparum* (23,28).

Todos esses resultados evidenciam a grande importância do apicoplasto e da via de isoprenoides para o parasita e também o grande potencial destes como possível alvo para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas (29).

Os isoprenoides são moléculas necessárias para a manutenção da fluidez da membrana celular e da homeostase oxidativo nas células, para a prenilação de proteínas celulares e do heme. Além disso, isoprenoides são precursores para a síntese de outras moléculas essenciais, tais como colesterol, ubiquinonas, plastoquinonas e dolicol (30,31), melhor descrito em 2.6.

Nosso grupo vem pesquisando a via de isoprenoides e suas ramificações em *P. falciparum,* melhor descrito em 2.6.1, dentre os produtos que nos resta investigar estão:

1- A giberelina: um hormônio de crescimento encontrado em plantas. O interessante, é que já existem drogas, antifúngicos, eficazes em inibir a biossíntese de giberelina em plantas e que não são prejudiciais ao homem, o que torna a via de biossíntese de giberelina, em *P. falciparum,* um alvo conveniente.

2- O heme farnesilado: o heme é uma importante fonte nutricional de ferro.

Concentrações elevadas de heme, em contraste, são tóxicas, devido à geração de espécies reativas de oxigênio. A concentração de heme celular requer, portanto, uma regulação. A observação do heme atuando como uma molécula efetora nos processos de captação e sua utilização é bastante nova, e muitos desses processos são desconhecidos ou pouco compreendidos em nível molecular. A via de biossíntese do heme já está caracterizada no parasita (29,32), as enzimas e os substratos desta via em *P. falciparum* são partilhadas entre o apicoplasto e a mitocôndria (25), entretanto a biossíntese de heme farnesilado ainda é desconhecida em *P. falciparum* e é de grande interesse já que, o heme farnesilado é essencial para formação do complexo IV da cadeia de respiração mitocondrial (29).

Devido à resistência da espécie *P. falciparum* a antimaláricos utilizados, o estudo de ambas as vias, de giberelina e de heme farnesilado, é importante, porque, ambas podem ser essências ao parasita. Além disso, giberelina e heme O provém da via de biossíntese de isoprenoides, e as drogas que visam essa via demonstram uma diminuição do crescimento e morte rápida do *P. falciparum* (28,33,34) em contraste com a "morte retardada", causada pelas drogas que interferem com os processos relacionados ao apicoplasto (35).

2.4 Resistência aos fármacos no tratamento da malária

O primeiro relato de resistência da espécie *P. falciparum* a antimaláricos foi no início do século XX, à quinina (Figura 6), desde então, a resistência aos medicamentos representa um desafio global na luta e controle da malária. O termo resistência está relacionado com a capacidade que uma espécie possui de se desenvolver e se multiplicar, independente da absorção e da quantidade administrada de um determinado fármaco em cada paciente.

Tal resistência está relacionada com o uso indiscriminado dos fármacos no tratamento da malária. Nesse sentido, a resistência é classificada como primária (quando o fármaco é utilizado pela primeira vez) ou adquirida (surge durante o tratamento com o fármaco). A resistência adquirida é consequência do aparecimento de alguns parasitas que são menos afetados ou que não são de modo algum afetados pelo fármaco, adquirindo maior vantagem em relação àqueles que são sensíveis ao fármaco.

Durante muitos anos a cloroquina (4 aminoquinolina) foi utilizada como a principal droga no tratamento para malária, isso graças à sua eficácia, baixa toxicidade e o baixo custo. Contudo, a aparição da resistência à cloroquina levou ao desenvolvimento de outras

drogas como a mefloquina, sulfadoxina-pirimetamina, derivados de artemisinina, e atovaquona-proguanil, entretanto, há resistência também para tais drogas (Figura 6).

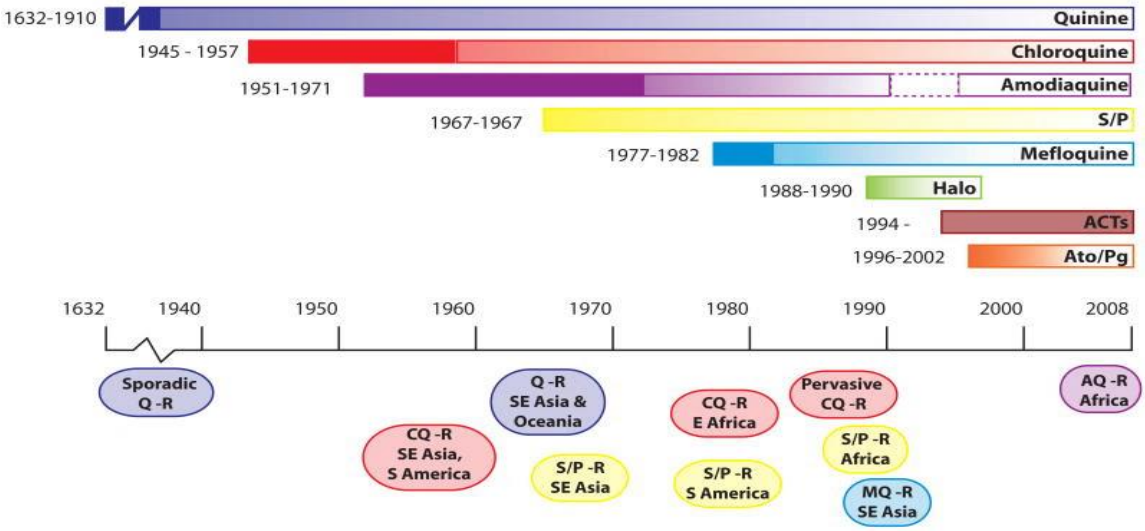

Figura 6 - Resistência aos principais antimaláricos. Cada barra representa uma monoterapia ou combinação de antimaláricos. Os anos à esquerda de cada barra representam a data em que o fármaco foi introduzido e o primeiro caso relatado de resistência. Os cicurdados indicam os períodos aproximados em que a resistência se espalhou por diferentes regiões geográficas. ACTs: Terapias Combinadas baseadas em Artemisinina, AQ, amodiaquina; Ato / Pg: Atovaquona / Proguanil, CQ: Cloroquina, Halo: Halofantrina, MQ, mefloquina; Q: Quinina, R: Resistência, S / P: Sulfadoxina / Pirimetamina.
Fonte: Ekland, Fidock, 2008 (36)

Devido à resistência encontrada em *P. falciparum* para os fármacos utilizados, diversos esforços na pesquisa de combinações de fármacos têm surgido na literatura, além dos estudos para o desenvolvimento de novos fármacos, e muitos destes estudos são baseados no sequenciamento do genoma do parasita (32).

Dependendo da região afetada, a OMS aconselha o uso de determinados antimaláricos, sempre dando preferência para a associação de drogas (35). Mesmo assim, a resistência de alguns isolados tem sido relatada contra todos os antimaláricos existentes. Atualmente, a terapia de combinação baseadas em artemisininas ou ACTs (artemisinin-based combination therapy) tem sido utilizada no tratamento da malária, com a finalidade de aumentar a eficiência no tratamento. Assim, é necessário que os derivados de artemisinina tenham rápida ação contra os parasitas, a fim de amenizarem os efeitos colaterais causados pelo uso desses medicamentos. Em algumas partes do mundo, a artemisinina vem sendo utilizada como droga de primeira linha no tratamento, e indiscriminadamente para o tratamento da malária não-grave. Assim, o surgimento de resistência a essa droga é provavelmente uma questão de tempo.

As áreas mais afetadas pela resistência aos antimaláricos, de acordo com a OMS, são a península indochinesa e a região amazônica da América do Sul, (Figura 7) (37).

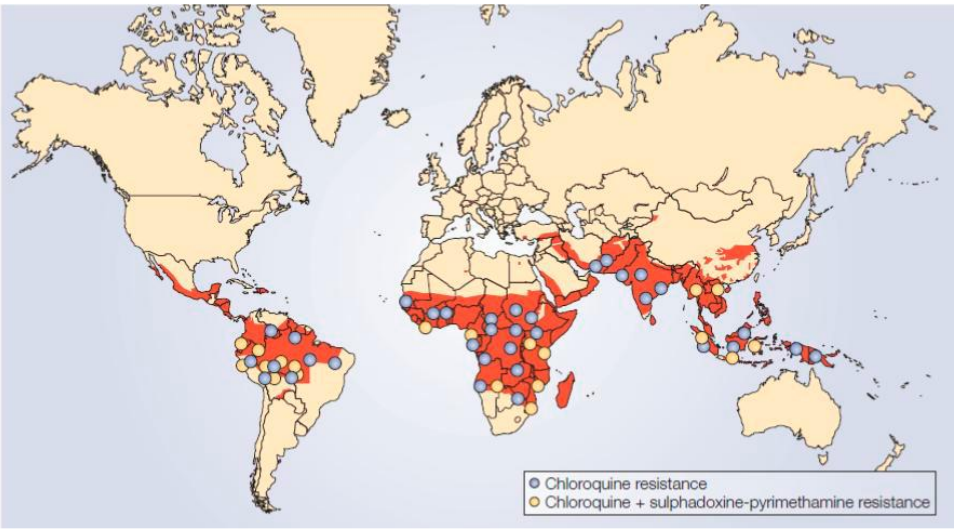

Figura 7 - Distribuição global da malária, mostrando áreas onde o *P. falciparum* é resistente às drogas antimaláricas comumente usadas, cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina. A resistência é amplamente disseminada através das zonas endêmicas para malária. (Áreas vermelhas)
Fonte: Fidock, 2010 (37).

As vacinas são apontadas como outra alternativa no controle da doença, mas ainda há a necessidade de mais estudos que levem a uma formulação eficaz (38).

Levando em consideração esses fatos, é necessário identificar novos alvos potenciais específicos no parasita, sendo esta uma das estratégias para o desenvolvimento de novas drogas, ou seja, a identificação de vias metabólicas próprias e essenciais para a sobrevida do parasita. Portanto, seria importante conhecer a via de isoprenoides, já que, esta é essencial para a sobrevivência e desenvolvimento do *P. falciparum*.

2.4.1 Artemisinina: destaque no Prêmio Nobel de Medicina de 2015

Após o fracasso das tentativas internacionais para erradicar a malária na década de 1950 e o aparecimento de parasitas resistentes aos antimaláricos da época, como a cloroquina, foi criado, em 1967 na China, o projeto nacional contra a malária. A partir de 1967 surgiram trabalhos que investigaram a extração e isolamento de componentes com possíveis atividades antimaláricas com base em plantas chinesas (39).

Foram investigadas mais de 2.000 preparações de ervas chinesas e identificadas 640 com possíveis atividades antimaláricas. O extrato de *Artemisia annua* L. mostrou um grau promissor de inibição contra o crescimento do parasita. No entanto, esta observação não

foi reproduzível em experimentos subsequentes e pareceu ser contraditória com o que era registrado na literatura (39).

Buscando uma explicação, uma única referência, relevante para o uso do qinghao (nome chinês de *Artemisia annua* L.), para aliviar os sintomas da malária apareceu no Manual de Prescrições para Emergências de Ge Hong: "Um punhado de qinghao imerso em 2 litros de água, espremer o suco e beber tudo". Através dessa referência Tu et al., 2016, notaram que o aquecimento envolvido no passo de extração convencional, poderia destruir os componentes ativos e que a extração a uma temperatura mais baixa poderia ser necessária para preservar a atividade antimalárica (39).

Em 04 de outubro de 1971, foi obtido um extrato neutro, não tóxico, que era 100% eficaz contra parasitemia em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* e em macacos infectados com *Plasmodium cynomolgi*. Quando a molécula passou a ser droga, não havia formas práticas de realizar ensaios clínicos de novos fármacos devido a Revolução Cultural. Assim, para ajudar pacientes com malária, os pesquisadores bravamente se ofereceram para serem os primeiros a fazer uso do extrato. Depois de verificar que o extrato era seguro para o consumo humano, os pesquisadores foram para a província de Hainan para testar sua eficácia clínica, realizando ensaios antimaláricos com pacientes infectados com *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*. Estes ensaios clínicos produziram resultados encorajadores: os doentes tratados com o extrato observaram um rápido desaparecimento dos sintomas enquanto que os doentes que receberam cloroquina não o fizeram (39).

Em 1972, foi identificada uma substância cristalina incolor com um peso molecular de 282 Da, com fórmula molecular de $C_{15}H_{22}O_5$ e ponto de fusão de 156-157°C como componente ativo do extrato, chamado de qinghaosu (qinghaosu significa "elemento básico" em chinês) ou artemisinina (39).

Conforme mencionado anteriormente, a artemisinina vem sendo estudada desde 1967, entretanto só foi divulgada após a guerra dos Estados Unidos contra o Vietnã. A pesquisadora chinesa Youyou Tu liderou as pesquisas juntamente com dois grupos das áreas de fitoquímica e farmacologia. No decorrer de sua descoberta Tu, modificou o preparo do extrato da planta *Artemisia annua* a fim de obter um produto com maior atividade. Após a modificação, foi comprovado que a substância possuía atividade antimalárica altamente eficaz (40).

Atualmente a artemisinina é empregada como uma terapia de combinação baseada em artemisinina, com a finalidade de tornar o tratamento mais eficaz, impedindo o surgimento de resistência por espécies parasitas (40).

O motivo pelo qual Tu conquistou o prêmio Nobel de Medicina de 2015 se refere à sua grande colaboração em reduzir os índices de mortalidade em diversos países, principalmente na África, onde os dados são alarmantes. Se tratando de números, houve uma diminuição de cerca de 100 mil mortes por ano em áreas endêmicas, de acordo com o Comitê do Nobel (40).

2.4.1.1 A Artemisinina

Muitos dos antimaláricos atuais tem sua ação no hospedeiro, principalmente, na degradação da hemoglobina, na biossíntese de ácido fólico e na síntese de proteínas no apicoplasto (41), com a artemisinina não é diferente.

Antes da artemisinina poder exercer a sua ação, ela precisa ser ativada e assim gerar as espécies de radicais livres. Duas vias de ativação de artemisinina têm sido sugeridas, a mitocondrial e via de degradação mediada por heme (42).

A ativação da artemisinina por mitocôndrias ocorre pela indução por: citotoxicidade através peroxidação lipídica, da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), da despolarização mitocondrial e das membranas plasmáticas do parasita (42–44). Na via mediada por heme há formação de um carbono ativo no radical (44). Mesmo que alguns estudos afirmem que o íon Fe^{2+} não provindo do heme se liga e ativa a artemisinina, outros estudos mais recentes mostraram que o heme desempenha um papel predominante na ativação de artemisinina em vez do íon Fe^{2+} (45), Figura 8.

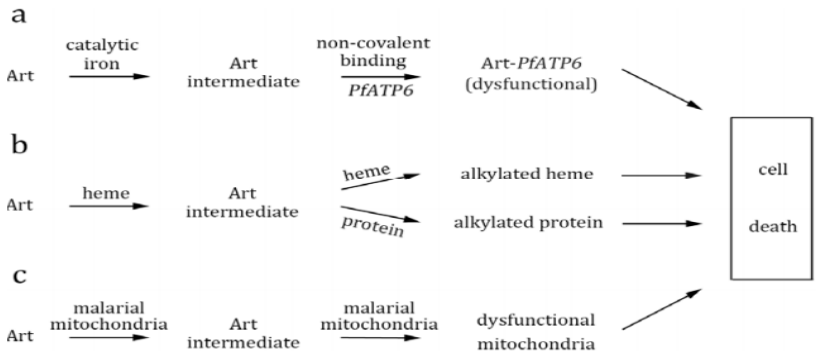

Figura 8 - Modelos biológicos propostos para a ação da artemisinina (Art). (A) No modelo *P. falciparum* Ca^{+2}– ATPase (PfATP6): a artemisinina sofre ativação por reação com ferro catalítico e após interação não covalente específica com PfATP6, os radicais livres formados exercem danos irreversível para a proteína alvo. (B) No modelo do heme: a artemisinina é ativada por heme, seguido por alquilação de heme e/ou outras proteínas do parasita. (C) O modelo da mitocôndria: mitocôndrias maláricas ativam especificamente artemisinina. A artemisinina ativada induz a produção de radicais livres e ocorre despolarização da membrana mitocondrial. Proteínas não específicas estão implicadas.
Fonte: Li e Zhou, 2010 (46).

Recentemente Xie et al., 2016 (47), relataram que duas principais cisteína proteases da hemoglobina também estão envolvidos na ativação do potencial de artemisinina, numa fase precoce do trofozoíta jovem, e também que a formação do complexo heme livre-artemisinina (hemart) mostra um efeito inibidor sobre a conversão que ocorre durante a digestão da hemoglobina pela proteína heme desintoxicação (HDP), esta proteína faz a conversão do heme livre em hemozoína, transformação essencial para a sobrevivência do parasita já que o heme livre pode ser tóxico (48), Figura 9.

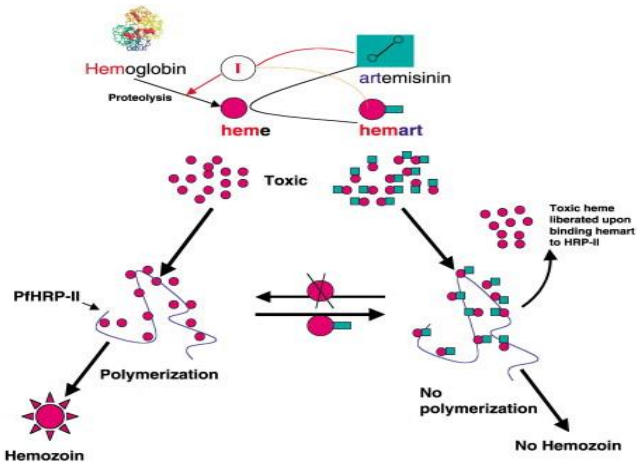

Figura 9 - Modelo de polimerização do heme e inibição do mesmo por artemisinina. A proteólise da hemoglobina no vacúolo alimentar do parasita da malária, libera o heme que pode ser tóxico. Na ausência de artemisinina, ocorrem várias vezes a catalise da polimerização heme à hemozoína. Na presença de artemisinina, o heme sofre uma reação com a droga para formar hemart, como resultado, o processo de polimerização do heme é interrompido, e o heme/hemart excessivo manifestaria sua toxicidade para o parasita. Outro alvo da ação da artemisinina é a inibição (I) de proteases que degradam a hemoglobina. No entanto, a potência da artemisinina para este efeito é marcadamente aumentada pela presença de heme. É possível que o verdadeiro inibidor destas proteases possa ser hemart (linha pontilhada laranja).
Fonte: Kanan et al., 2002 (49).

2.5 Heme

A hemoglobina é a proteína transportadora de oxigênio molecular (O_2) encontrada nos eritrócitos, e de forma simplificada, pode ser considerada como um tetrâmero em que cada unidade apresenta um grupo porfirínico contendo um íon ferroso central, também conhecido como heme ou heme B. Ou seja, o heme consiste em um sistema de quatro anéis tetrapirrol (protoporfirina IX) complexados com ferro (50). A ligação com o ferro ocorre em seu estado de oxidação Fe^{2+} (ferroso), sendo formado um complexo com seis ligantes, quatro dos quais são átomos de nitrogênio da protoporfirina IX (51).

O mecanismo de transporte de oxigênio molecular ocorre por meio da ligação entre O_2 e o íon ferroso (Fe^{2+}) do heme. Dentro do eritrócito, a hemoglobina do hospedeiro é transportada para o interior do parasita, para o vacúolo digestório. A hemoglobina é então quebrada por enzimas proteolíticas a peptídeos que são subsequentemente degradados a aminoácidos essenciais ao seu desenvolvimento. Nesse processo, o grupo heme é liberado e oxidado à hematina (Fe^{3+}-protoporfirina IX), caracterizada por ser uma substância tóxica e acumulada no interior do parasita. Por essa razão, o parasita desenvolveu um mecanismo para formação de hemozoína (pigmento malárico), uma substância isenta de toxicidade (52).

Além do heme adquirido pela degradação da hemoglobina, o parasita apresenta uma via de biossíntese de heme ativa. No genoma de *Plasmodium* estão os genes que codificam todas as enzimas da via do heme que utilizam glicina e succinil-CoA como substratos iniciais (Figura 10). Esta via em parasitas apicomplexas parece ser a condensação evolutiva de duas vias de biossíntese de heme bem conhecidas (29): a via de Shemin que passa pela mitocôndria e o citosol (53); e (dependendo do apicomplexas) a via do mevalonato (MVA) ou 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP). Portanto, no *Plasmodium* as duas vias da condensação evolutiva para biossíntese de heme são: a via Shemin e a via MEP (54).

Em apicomplexas, o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) é sintetizado exclusivamente nas mitocôndrias como ocorre na via de Shemin. Em *P. falciparum*, um total de oito enzimas estão localizadas em três compartimentos diferentes: mitocôndria (três enzimas) (55,56), o citoplasma (uma enzima) (57) e o apicoplasto (quatro enzimas) (56,58). A primeira enzima da via é a 5-aminolevulinico sintase (ALAS), e a última enzima a ferroquelatase (FC). A FC insere um íon ferroso no anel de protoporfirina para formar o

produto heme final, também chamado de heme B. Tanto a enzima ALAS quanto o FC foram localizadas na mitocôndria parasitária (55,56).

Como a formação de hemozoína no vacúolo alimentar parece ser o destino do provindo do heme do hospedeiro, supõe-se que o heme liberado pela digestão com hemoglobina não está disponível para utilização metabólica por parasitas dentro de suas próprias hemoproteínas (59,60).

No entanto, em um estudo sobre o papel das fontes de heme no crescimento e desenvolvimento do parasita da malária, no qual foram deletadas as enzimas ALAS e FC da via de biossíntese do heme de *Plasmodium berghei* e *P. falciparum*, demostrou que:

- *P. berghei* selvagem e nocaute apresenta padrões de crescimento intraeritrocíticos semelhantes em camundongos;

- parasitas com heme marcado metabolicamente com ALA cultivados *in vitro* (reticulócitos de ratos infectados com *P. berghei* e eritrócitos humanos infectados com *P. falciparum),* apresentam heme provindo da digestão da hemoglobina e heme sintetizado pelo parasita na hemozoína e no citocromo mitocondrial. Os destinos semelhantes das fontes de heme sugerem que eles podem servir como mecanismos de *backup* para fornecer heme nos estágios intraeritrocíticos (61).

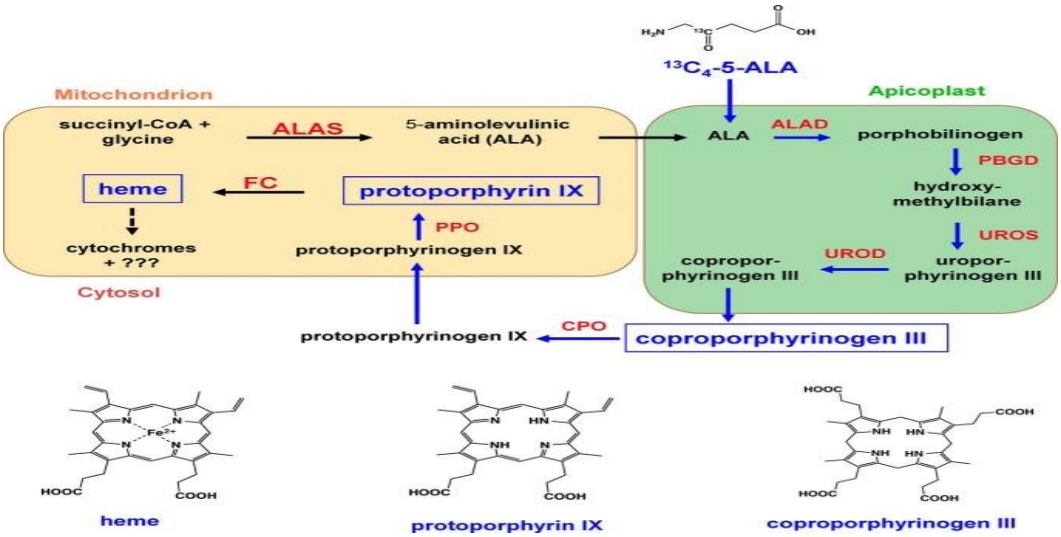

Figura 10 - Via híbrida de biossíntese do heme em *P. falciparum.*
ALAS, 5-aminolevulínico sintase; ALAD, ácido 5-aminolevulínico desidratase; PBGD, porfobilinogénio desaminase; UROS, uroporfirinogénio III sintase; UROD, uroporfirinogénio descarboxilase; CPO, coproporfirinogénio oxidase; PPO, protoporfirinogénio oxidase; FC, ferrochelatase. Os substratos e produtos da via estão em preto, e as enzimas envolvidas na biossíntese de heme estão em vermelho. A fração da via marcada por [^{13}C] ALA está em azul, e os compostos detectados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) estão nos quadrados azuis
Fonte: Sigala, 2014 (62).

O heme é responsável por realizar transporte de O_2 através da ligação Fe^{+2} do heme e o O_2 do sangue (63) entretanto, o Fe^{+2} do heme também pode se ligar a monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxido nítrico e íons cianeto (64). A afinidade por estas moléculas (com exceção do CO_2) é maior do que pelo o oxigénio, sendo responsável pela asfixia e envenenamento. Além disso, o heme é responsável por: reações de oxigenasse (65), regulação da atividade enzimática (66) e transporte de elétrons (67). A última função é central no mecanismo associado à força motriz na fosforilação oxidativa. Em células eucarióticas, sete hemes de arquitetura diferentes (hemes b, c e a) são incorporados nas proteínas da cadeia de transporte de elétrons (ETC), e são reduzidos e oxidados em potencial de redução geralmente crescente (62).

Entretanto, a via do heme farnesilado bem como a de giberelina não foram descritas em *P. falciparum* até o momento, e ambos possuem precursores que provém da via de isoprenoides.

2.6 Prenóis (Isoprenoides)

Os prenóis, também chamados de isoprenoides, constituem a mais divergente e grande família de compostos naturais e estão presentes em todos os organismos vivos. Até o momento, são conhecidos mais de 30.000 compostos isoprênicos na natureza. Os isoprenoides são metabólitos essenciais para diversas funções celulares, incluindo: compostos isoprênicos ligados às proteínas e RNA, ubiquinonas, dolicóis, hormônios em animais e plantas, carotenóides, vitaminas e óleos essenciais.

Os compostos isoprênicos 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. Além disso, muitas proteínas estão ancoradas a membranas via âncoras isoprênicas.

Em plantas, hormônios de baixo peso molecular como giberelinas, ácido abscísico e brassinolideos são fundamentais para o desenvolvimento desses organismos. O mesmo ocorre com hormônios sexuais esteróides e corticosteróides em animais, todos são

derivados de isoprenoides. E também muitos antibióticos, fitoalexinas, repelentes e até drogas alucinógenas (LSD) possuem estruturas derivadas de compostos isoprênicos.

A unidade básica de todo isoprenoide é uma molécula de cinco carbonos de fórmula C_5H_8 chamada isopentenil pirofosfato, difosfato de isopentenila ou farnesil difosfato (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalila ou dimetilalil difosfato (DMAPP) (Figura 11). Assim, todo composto isoprênico possui um esqueleto carbônico básico com formula $(C_5H_8)_n$. Dependendo da classe de composto isoprênico, essa fórmula pode apresentar variações pela adição de hidroxilas, ciclização da molécula ou outras modificações.

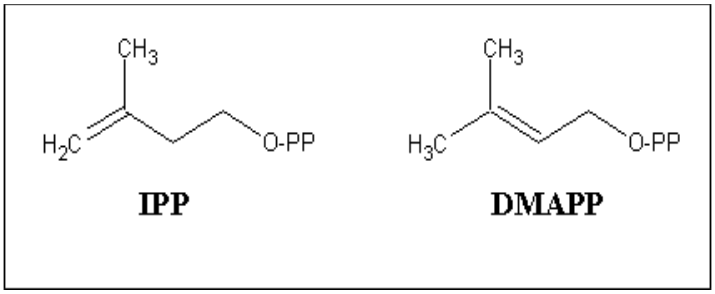

Figura 11 - Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP.

2.6.1 Biossíntese de isosprenoides

2.6.1.1 Metabolismo primário de isoprenoides

Acreditava-se que a via do mevalonato era a única via responsável pela produção de poliisoprenoides em todos os organismos vivos. Porém, começaram a surgir resultados inconsistentes com a via do mevalonato em bactérias. Estudos com [^{13}C] acetato (um precursor da via do mevalonato) mostraram que essa molécula não era incorporada em ubiquinonas de *Echerichia coli* (68,69). Anos mais tarde, outra via de biossíntese de isoprenoides foi descrita, a via do 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP) (70).

Após a descoberta da via MEP, vários estudos demonstraram a presença das enzimas dessa via em organismos, como plantas, bactérias, fungos e parasitas, com uma característica marcante: as enzimas dessa via estão compartimentalizadas, normalmente em plastídios.

Em arqueobactérias, fungos e mamíferos, a biossíntese de isoprenoides ocorre através da via do mevalonato clássica (71–73). Em *P. falciparum*, no entanto, isoprenoides são sintetizados através de uma via alternativa, a 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP) também conhecida como a via não-mevalonato ou via D-xilulose-1-desoxi-5 fosfato

(DOXP). Ambas vias terminam em uma cadeia de 5 carbonos (5-C), o composto intermediário IPP e seu isómero o DMAPP (73).

O que torna o estudo da via MEP em *P. falciparum* ainda mais importante, é que esta é uma via distinta da encontrada em seres humanos para a biossíntese de isoprenoides, ou seja, antimaláricos que tenham como alvo a via MEP de parasitas não vão afetar a biossíntese de isoprenoides em humanos já que, se tratam de vias distintas.

2.6.1.1.1 Via do 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP)

Em 1996 Rohmer (70) descobriu o primeiro passo de biossíntese da nova via de isoprenoides, a via MEP, a condensação de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato (GAP) formando 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (70). Essa nova via foi inicialmente chamada de via Rohmer ou via independente de mevalonato. Com a elucidação dos outros intermediários da via, o seu nome passou para via MEP, já que este intermediário é o primeiro exclusivo dessa via.

A via MEP (Figura 12) inicia com a condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de GAP pela enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DOXP sintase), formando 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DOXP) (74), enzima esta que é dependente de tiamina (vitamina B1) (75). A DOXP é o primeiro intermediário da via, mas não é exclusivo, sendo utilizado também para a biossíntese de piridoxal (vitamina B6) (76,77) e tiamina (vitamina B1) (78). Na etapa seguinte, a enzima 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DOXP redutoisomerase) catalisa simultaneamente o rearranjo intramolecular e redução da DOXP em MEP (79). A enzima que catalisa essa etapa é inibida por um composto utilizado inicialmente como herbicida, chamado fosmidomicina (ácido fosfônico) (80). Posteriormente, o MEP é ligado a uma molécula de citidina trifosfato (CTP) para produzir 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol (CDP-ME), em uma reação catalisada pela enzima 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidina transferase (CDP-ME sintase) (81).

A enzima 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol quinase (CDP-ME quinase) (uma enzima dependente de ATP) fosforila o CDP-ME, produzindo 4-(citidina-5-difosfo)-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP-2P). No passo seguinte, o CDP-MEP-2P é convertido em 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (ME-2,4-cPP) pela ação da enzima 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase (MCS) (82,83). O produto ME-2,4-cPP(84).

Posteriormente, o ME-2,4-cPP é convertido em IPP e DMAPP pela hidroximetilbutenil difosfato redutase (LytB) (85,86).

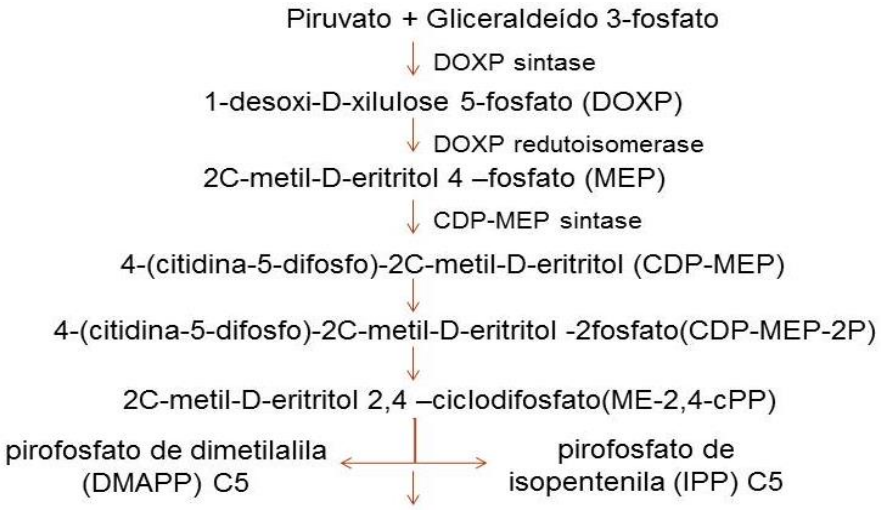

Figura 12 - Diagrama da via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) de biossíntese dos isoprenoides de cadeias básicas, isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP), em *P. falciparum*.
Fonte: Elaborado pela autora.

2.6.1.1.2 Metabolismo secundário de isoprenoides

Após a síntese do IPP e do DMAPP, esses intermediários passam para o metabolismo secundário de isoprenoides, que consiste basicamente na elongação inicial da cadeia isoprênica, passando posteriormente por diferentes modificações para a formação dos diferentes produtos derivados da biossíntese de isoprenoides.

Inicialmente, uma molécula de IPP é ligada a uma molécula DMAPP, por meio de enzimas chamadas preniltransferases, dando origem ao difosfato de geranila (GPP, 10 carbonos). O GPP é ligado a um IPP, originando o farnesil difosfato (FPP, 15 carbonos), que, por sua vez, é ligado a mais uma molécula de IPP, dando origem ao difosfato de geranilgeranila (GGPP, 20 carbonos) (Figura 13). A partir desse ponto, a cadeia isoprênica pode continuar aumentando através da adição de moléculas de IPP, formando ubiquinonas e vitaminas, ou duas moléculas de GGPP podem ser ligadas e dar origem ao fitoeno, molécula-base para a biossíntese de carotenóides. Na Figura 13, é possível observar a grande variedade de compostos que podem ser originados a partir das moléculas de IPP e DMAPP, compostos dos mais diversos e importantes eventos do metabolismo celular.

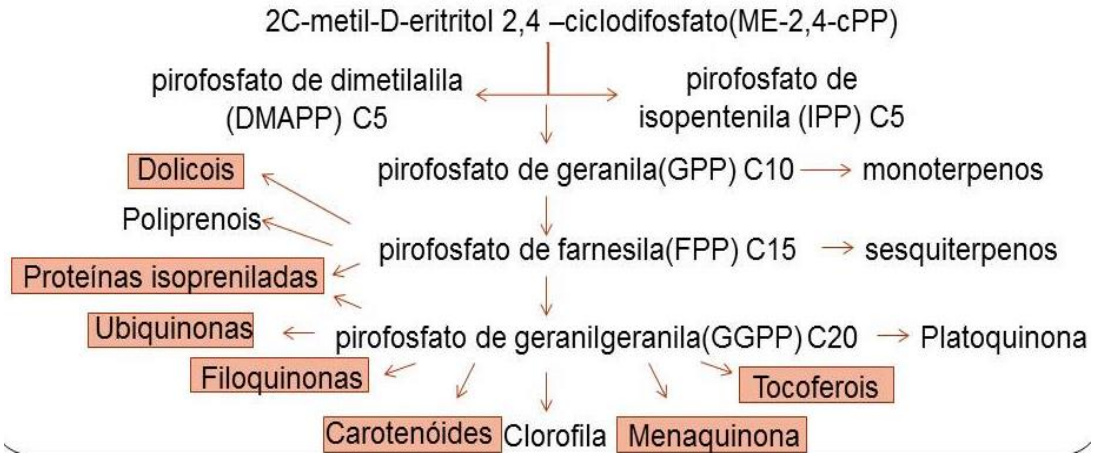

Figura 13 - Os isoprenoides são sintetizados pelos precursores, isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP). As caixas sombreadas indicam os produtos finais identificados em *P. falciparum*.
Fonte: Elaborado pela autora

2.6.2 Biossíntese de isoprenoides em *Plasmodium falciparum*

Em 1999, Jomaa et al., (33) identificaram em *P. falciparum* os genes que codificam as enzimas-chave da via MEP. Uma enzima catalisa a condensação do D-gliceraldeido-3-fosfato e do piruvato formando o 5-fosfato 1-desoxi-D-xilulose enquanto a outra catalisa o rearranjo molecular e reduz esse produto nas formas isoprênicas básicas (87). O mesmo grupo realizou estudos utilizando fosmidomicina e um análogo a este antibiótico, o FR900098, e observou que ambos inibem a enzima DOXP-redutoisomerase. A administração dos dois compostos em ensaios *in vitro* inibiu o crescimento da cultura. Estudos em camundongos indicaram que a simples monoterapia com fosmidomicina ou seu análogo pode não ser suficiente para os casos clínicos de malária (26). A descoberta de uma via MEP funcionalmente ativa em *P. falciparum* foi através da caracterização dos 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 (88).

Nosso grupo caracterizou grande parte dos produtos derivados da via de isoprenoides em P. *falciparum*, Figura 13, dentre eles alguns que, até então, só eram encontrados em plantas, como os carotenoides. Para dar continuidade ao estudo vimos a necessidade de investigar a biossíntese de heme farnesilado e de giberelina por *P. falciparum*, como mencionado em 2.3.

2.7 O heme farnesilado

Os intermediários do metabolismo isoprenoide IPP e/ou DMAPP podem ligar-se a grupos hem,e para biossíntese de heme O que posteriormente forma heme A, moléculas essenciais para numerosos organismos vivos, uma vez que são um componente crítico do transporte de elétrons na cadeia mitocondrial de respiração, catalisando a redução de O_2 em H_2O (29). Mais estudos são necessários para identificar e localizar várias enzimas da via dos hemes farnesilados em *P. falciparum*, pois, se trata de uma via essencial e diferente da encontrada em humanos, sendo assim uma via com grande potencial para antimaláricos.

Heme O e A possuem um grupo 17-hidroxietilfarnesilo na posição 2 do anel pirrol A. Heme A tem um grupo formilo na posição 8 do anel pirrol D (5) e é derivado do heme O (66,89).

Em um primeiro passo para a formação de heme farnesilado, um grupo 17-hidroxietilfarnesilo é inserido à cadeia lateral vinilo do carbono-2 do heme B, catalisada por uma enzima do tipo farnesiltransferase geralmente referida como heme O sintase (HOS) (24). Em *E. coli*, o intermediário heme O serve como um grupo prostético terminal. Ao contrário do que ocorre na bactéria, apenas vestígios de heme O são encontrados nas mitocôndrias de outros seres (90). A cauda de farnesil atua na estabilização da estrutura helicoidal da subunidade do citocromo c oxidase (CcO), através de interações hidrofóbicas (91).

Para formação de heme A o grupo metilo do carbono-8 do heme O é convertido num grupo formilo, esta reação é catalisada por heme A sintase (HAS). A formação do grupo formilo ajuda a desestabilizar heme férrico, que origina uma mudança positiva no potencial de redução de ferro, mudança necessária para a função CcO (91). Com base em estudos em bactérias, tem sido postulado que a conversão ocorre por oxidação sequencial do grupo metil através de um intermediário de álcool-carbono-8 de curta duração, às vezes referido como heme I ou heme OX (92,93). A oxidação do grupo metilo do carbono-8 foi proposta para proceder através de duas reações de mono-oxigenase (93). No entanto, este mecanismo tem sido refugado por isótopo-marcado de O_2, não foi demonstrada nenhuma incorporação significativa do isótopo-marcado em heme A nem em heme I (94). O mesmo estudo sugeriu que a água poderia ser um doador do átomo de oxigênio nesta reação (94).

Como foi visto HOS e HAS são as responsáveis para formação de heme O e A respectivamente, por isso o estudo destas enzimas (bem como o estudo de heme O e heme A) em *P. falciparum* é necessário pois, podem se tornar alvos potenciais de antimaláricos.

2.7.1 Heme O sintase - HOS

Heme O sintase (HOS) também designada como cox10, é uma proteína de membrana que em *Saccharomyces cerevisae* forma um complexo multimérico de ~300 kDa. A estabilidade do oligómero de cox10 parece depender da presença de cox1 recentemente sintetizado e dos seus intermediários (95)

A conversão de proto-hemo catalisada por cox10 parece ser um passo limitante da taxa de formação de heme A (96). Assim, é provável que a regulação da abundância/atividade de cox10 seja a maneira de modular a via de biossíntese do heme A. Através de uma mutação N196K, cox10 foi identificada como um supressor dominante na biossíntese de CcO sem o cofator Coa2 (um fator para biossíntese de citocromo c oxidase de levedura). Estes estudos estabeleceram que Coa2 funciona em conjunto com cox10 na hemilação de cox1. Enquanto cox10 existe apenas como monómero em células Δcoa2 e, aparentemente, é em grande parte inativo, o mutante N196K cox10 forma um oligómero estável, e a enzima é ativa nas células que respiram normalmente (97). A oligomerização de cox10 parece ser uma característica chave da atividade enzimática de HOS.

2.7.2 Heme A sintase - HAS

Heme A sintase foi descrita pela primeira vez em *B. subtilis* (98). Estudos posteriores identificaram ortólogos eucarióticos comumente designados como cox15 (99) e chegaram a uma conclusão de que HAS é uma enzima que utiliza heme B como cofactor no sítio ativo, semelhante a outras oxigenases. O heme A foi interpretado como um produto inédito da reação (98).

Em leveduras, foi demonstrado que cox15 forma um complexo de alto peso molecular (100), mas sua composição é desconhecida. Brown et al., 2002 superexpressaram CtaB e CtaA em *B. subtilis*, bem como cox10 em *R. sphaeroides* e cox15 em *E. coli* e mostraram a interação de HOS e HAS em ambos os casos (93).

No entanto, em levedura não demonstraram interação de cox10 e cox15. Além disso, a deleção de cox15 não afeta a estabilidade do complexo de cox10 e vice-versa (100). Levedura sem cox15 não contém heme A mas mostra baixos níveis de heme O, sugerindo que as duas enzimas não estão intrinsecamente ligadas. Do mesmo modo, fibroblastos isolados de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica infantil fatal associada a mutações em cox15 são caracterizada por níveis de heme A reduzidos, mas o conteúdo de heme O é elevado (101). Contudo, a superexpressão de cox10 em células de levedura deficientes em cox15 não resulta no aumento dos níveis de heme O (102).

2.7.3 Relação entre o heme e os antifúngicos

Alguns azoles (cetoconazol, miconazol, e clotrimazol), de forma eficaz e rápida inibem o crescimento de *P. falciparum in vitro*, por impedir a formação de hemozína a partir do heme (103), ou seja, os mecanismos de ação estão relacionados com polimerização do heme e a degradação do heme.

Como artemisinina, a principal droga utilizada como antimalárico, e alguns antifúngicos são de algumas maneiras relacionados ao heme; e como via de heme não foi completamente caracterizada em *P. falciparum*, nosso grupo viu a necessidade de estudar a via de biossíntese de heme O.

Além disso, recentemente, um estudo sobre inibidores de crescimento de plantas mostrou que duas drogas antifúngicas, inabenfide (INA) e uniconazole-P (UNP), inibem as atividades em ambos apicomplexas: *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* (104).

INA e UNP atuam na inibição de produtos isoprênicos nas plantas, devido a este estudo, decidimos investigar se, como alguns azoles, o inabenfide e uniconazole-P inibem o crescimento de *P. falciparum* por meio de um mecanismo relacionado ao heme ou ao heme farnesilado.

No entanto, como INA e UNP, em plantas, inibem a formação de giberelina, um diterpeno essencial (isoprenoides) e precursor para metabólitos secundários (105), achamos essencial a busca da via de biossíntese deste outro derivado da via de isoprenoides por *P. falciparum*.

2.8 Giberelina

As Gibberellinas (GAs) são um grupo de fitohormonas que regulam o crescimento das plantas, além de influenciar em vários processos de desenvolvimento como: a germinação das sementes; alongamento das células epidérmicas; expansão das folhas; desenvolvimento floral; expressão sexual e maturação dos frutos. Alguns GAs são aplicadas de maneira exógena, como um spray, para aumentar os rendimentos de frutos e plantações (106).

Quimicamente, todas as GAs, conhecidas, são ácidos giberélicos, uma grande família de ácidos diterpenoides tetracíclicos. Atualmente, existem 136 GAs conhecidas, divididas em duas classes as GAs a de 19 e a de 20 átomos de carbono. Além das muitas GAs conhecidas, foram encontrados conjugados de GA (por exemplo, GA-glucósidos) em plantas (102). As GAs são numeradas não por informações sobre suas relações ou funções estruturais, mas pela ordem cronológica de sua identificação, apesar de divergirem pouco na estrutura química, as atividades biológicas podem ser muito distintas. Aproximadamente 30% de todas as GAs conhecidas, incluindo principalmente GA1, GA3, GA4 e GA7, são consideradas como biologicamente ativas (107).

Um estudo realizado com ensaios *in vitro* utilizando reguladores de crescimento e inibidores biossintéticos de giberelina, mostra o efeito inibitório destes sobre o crescimento dos apicomplexas: *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondi* (104).

Dentre os inibidores deste estudo, INA e UNP são conhecidos por bloquear o citocromo P450-dependente monooxygenases em plantas (105), ou seja, INA e UNP interrompem ent-caureno oxidase (KO), um membro do citocromo P450 mono-oxigenases (CYP), oxidando o ent-caureno em ácido ent-caurenóico, impedindo a biossíntese de giberelina (104).

Devido a isso, nosso grupo achou que o estudo da biossíntese de giberelina (apesar desta só ser encontrada em plantas até o momento) era essencial para entender as rotas de biossíntese do *P. falciparum* e assim investigar esta como alvo de antimaláricos, já que, existem inibidores de giberelina com efeito inibitório sobre o crescimento de *P. falciparum*, e esses não apresentam toxicidade para o homem, mesmo em grandes quantidades.

3 Justificativa

Na última década, a biossíntese de isoprenoides tem sido apontada como um importante alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos contra os parasitos causadores da malária humana. Esse fato, se deve à importância dos produtos derivados dessa via para o metabolismo de qualquer célula eucariótica e, principalmente, ao fato de a via de biossíntese de isoprenoides no plasmódio (via MEP) ser diferente da existente em seu hospedeiro vertebrado (via do mevalonato).

Nos últimos anos o grupo de bioquímica de malária do Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin vem identificando os produtos derivados da via de isoprenoides em *P. falciparum*. No estudo dessa via de biossíntese, como potencial alvo quimioterápico, diferentes pontos têm sido abordados e a identificação da via do heme farnesilado pode ser de grande importância.

A identificação do heme O e a caracterização da enzima envolvida, além de agregar conhecimento sobre os produtos biossintetizados pelo parasita, é de extrema importância, já que, é uma molécula essencial para numerosos organismos vivos sendo um componente crítico da cadeia mitocondrial do transporte de elétrons, catalisa a redução do O_2 a H_2O e aproveita a energia liberada desta reação para translocar até quatro prótons (oito equivalentes de carga) através da membrana da mitocôndria (108). Além disso, a via do heme já é estudada como uma via para novos antimaláricos.

As drogas INA e UNP, também intrigaram nosso grupo: em plantas, inibem a formação de giberelina inibindo assim o seu crescimento, e em cultura de *P. falciparum* mostrou eficácia na diminuição da parasitemia sugerindo a biossíntese de giberelina pelo parasita. Como objetivo do nosso grupo é determinar os produtos derivados da via de isoprenoides, achamos essencial a investigação da biossíntese de giberelina pelo parasita, e se INA e UNP estão agindo onde se espera ou se, assim como, outros antifúngicos agem na via de biossíntese do heme.

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Como a via de isoprenoides é essencial para a sobrevivência do parasita, conhecer os produtos e as enzimas dessa via é de extrema importância, já que, há uma resistência por parte dos parasitas aos antimaláricos utilizados, o que faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos ou o melhoramento dos existentes. Por isso, nosso grupo investigou se o parasita biossintetiza a giberelina e o heme farnesilado.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a biossíntese de giberelina, nas formas intraeritrocíticas de parasitas de *P. falciparum.*
- ✓ Caracterizar a biossíntese de heme O, nas formas intraeritrocíticas de parasitas de *P. falciparum.*
- ✓ Verificar se a via de heme é um possível alvo de inibição das drogas Inabenfide e Uniconazol-P.
- ✓ Realizar um estudo *in silico* das enzimas cox10 e cox15.
- ✓ Revelar a localização e função de cox10 e cox15 nas formas intraeritrocíticas de parasitas de *P. falciparum.*

5 Materiais e métodos

5.1 Resumo dos experimentos conduzidos

Para realização deste projeto tivemos auxilio de diversos colaboradores: Dra. Julia Cricco e Brenda Cirulli do Instituto de Biologia Molecular e Celular de Rosario, Conselho Nacional de Investigações Científicas e Técnicas da Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas, Universidade Nacional de Rosario, Argentina; Dr. Antonio Doménech-Carbó e Dr. Gerardo Cebrián-Torrejón do Departamento de Química Analítica, Faculdade de Química, Universidade de Valência, Espanha; Dr. John Wright da Universidade do estado de Michigan, Estados Unidos; Dr. Fernando G Almeida, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Primeiramente, para verificar a biossíntese de giberelina e de hemes foi preciso manter uma cultura de parasitas. A partir da cultura e marcação metabólica, com o precursor radioativo adequado, conseguimos observar se o parasita biossintetiza o produto, no caso giberelina ou hemes.

Com o auxílio do espectrômetro de massas determinamos se o produto de massa específica, no caso hemes, está presente em extrato de parasita previamente purificado por coluna de afinidade. Desta maneira, com a marcação metabólica e o estudo de massas das amostras podemos identificar a biossíntese de um produto pela espécie em questão.

Com relação a via de biossíntese de hemes em *P. falciparum*, para determinar se as enzimas candidatas a HOS e HAS têm a localização e a função esperada e para determinar quão são essências para o parasita, construímos plasmídeos, adequados para cada necessidade, contendo as a sequência das enzimas cox10 e cox15 de *P. falciparum*, melhor descrito a partir do item 5.20.

Em relação as drogas, foram realizados ensaios para confirmar IC_{50} de INA e UNP e um teste de recuperação do parasita, no qual culturas de *P. falciparum* foram tratadas com as drogas em meio enriquecido com giberelina, ou seja, se as drogas estivessem inibindo a formação de giberelina os parasitas poderiam se recuperar utilizando o produto exógeno do meio.

Para verificar se INA e UNP inibiam a via dos hemes, utilizamos culturas tratadas com as drogas e marcação metabólica, assim foi possível, através da incorporação ou não do radioativo, determinar se a droga inibe a formação de algum produto desta via.

5.2 Cultura de *P. falciparum*

O cultivo da cepa 3D7 de *P. falciparum* foi realizado em garrafas contendo meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de Hepes, 21 mM de bicarbonato de sódio, 1,1 mM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 µg/mL de gentamicina e 0,5% (v/v) de AlbuMAX (Invitrogen). Eritrócitos foram adicionados à cultura obtendo um hematócrito de 1 a 3%. As garrafas foram mantidas em estufa a 37 ºC com trocas diárias de meio e injeção de uma mistura gasosa composta por 5% CO_2, 5% O_2 e 90% N_2. O controle da parasitemia foi feito com a verificação microscópica diária de esfregaços corados com Giemsa (109).

A sincronização da cultura de *P. falciparum* foi feita com Sorbitol (5%) e/ou por flotação em gelatina. Na primeira técnica, o Sorbitol rompe hemácias infectadas contendo as formas maduras do parasita (trofozoíta maduro e esquizonte), deixando íntegras apenas hemácias parasitadas por trofozoítas jovens que retornam à cultura. As culturas com mais de 10% de parasitemia, a maioria no estágio trofozoíta jovem, foram centrifugadas a 800 xg por 10 minutos. Depois de retirar o sobrenadante foi 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 foi centrifugada a 800 xg por 10 minutos. O pellet, que corresponde a um concentrado de parasitas sincronizados no estágio trofozoíta jovem, foi introduzido novamente na cultura (110). No mesmo ciclo em que o parasita foi sincronizado com Sorbitol, ele será submetido à flotação em gelatina das formas maduras (111).

Para a separação das formas maduras de *P. falciparum* e dos eritrócitos não parasitados, foi empregada à técnica de coluna magnética (112). Os parasitas foram coletados e lavados três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) (30 mM Na_2HPO_4, 6 mM KH_2PO_4, pH 7.4, 120 mM NaCl). O volume do precipitado de cada purificação foi medido, liofilizado e congelado em nitrogênio líquido para posterior análise.

5.3 Marcação metabólica

Culturas sincrónicas de *P. falciparum* foram marcadas com pirofosfato de geranilgeranila tritiado ([1-(n)-^{3}H] GGPP) (3.125 µCi/mL, 16.5 Ci/mmol) ou farnesil difosfato tritiado ([1-(n)-^{3}H]FPP) (3,125 µCi/mL, 14,0 Ci/mmol) ou [U- ^{14}C] glicina (112,7 µCi/ml, 112,7 mCi/mmol) em meio RPMI 1640 em estágios de trofozoíto (20% de

parasitemia) durante 10-14 horas e foram então recuperadas em estágios de esquizonte. Subsequentemente, as culturas de parasitas foram centrifugadas a 800 xg durante 10 min a 22 °C. Os estágios intraeritrocíticos foram purificados por coluna magnética e submetidos a métodos de extração de giberelina ou heme B/heme O. Como controle, o mesmo procedimento foi realizado com eritrócitos não infectados.

Os precursores radioativos foram escolhidos com base na via de biossíntese de Giberelina, heme e de hemes farnesilados (Figura 14 e 15).

Os precursores isoprênicos para biossíntese de giberelina são o FPP ou GGPP (Figura 14), como o GGPP é o precursor mais próximo foi o que utilizamos.

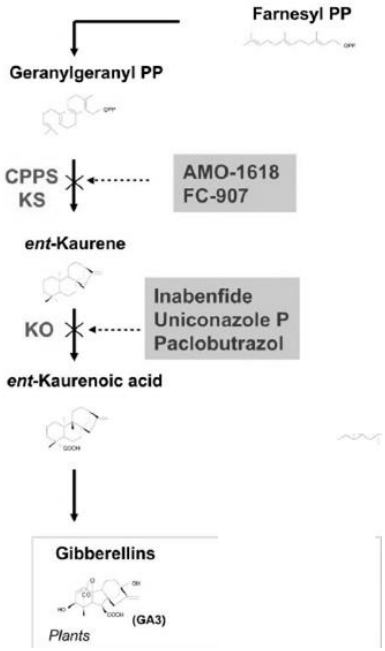

Figura 14 - Vias biossintéticas de isoprenoides, giberelina e inibidores conhecidos em vários organismos. As setas pontilhadas indicam inibidores específicos na biossíntese. CPPS, copalil-difosfato sintase; KO, ent-caureno oxidase; KS, ent-caureno sintase.
Fonte: Toyama, 2012 (104).

Já para a biossíntese de heme utilizamos um precursor do início da via, a glicina, e um precursor para ver heme farnesilado, o FPP, assim saberíamos se o heme O foi sintetizado pelo parasita (Figura 15).

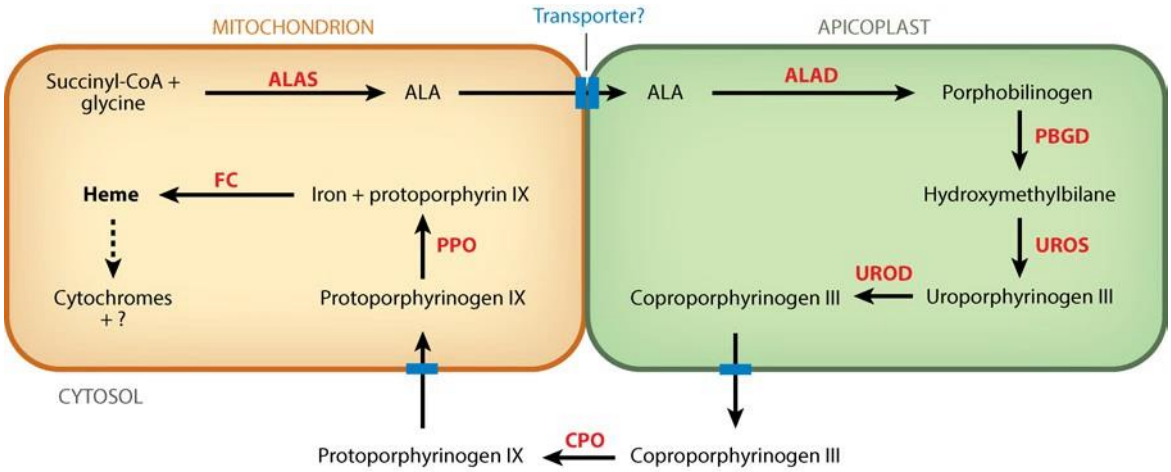

Figura 15 - Via de biossíntese de heme em *P. falciparum*.
As abreviaturas de enzimas estão em vermelhos, substratos e os intermediários da via estão em preto: ALAS (ácido aminolevulínico sintase), ALAD (ácido aminolevulínico desidratase), PBGD (porfobilinogênio desaminase), UROS (uroporfirinogênio sintase), UROD (uroporfirinogênio descarboxilase), CPO (coproporfirinogênio III oxidase), PPO (PPIX oxidase), FC (ferrochelatase). Para simplificar, todas as organelas são representadas com membranas únicas.
Fonte: Sigala, 2014 (62).

O que ainda não se sabe sobre a biossíntese de hemes em *P. falciparum*, é se ele farnesila heme, se estão presentes ambos os farnesilados heme O e heme A e se as enzimas cox10 e cox15 são as responsáveis por catalisar essa reações, respectivamente (Figura 16).

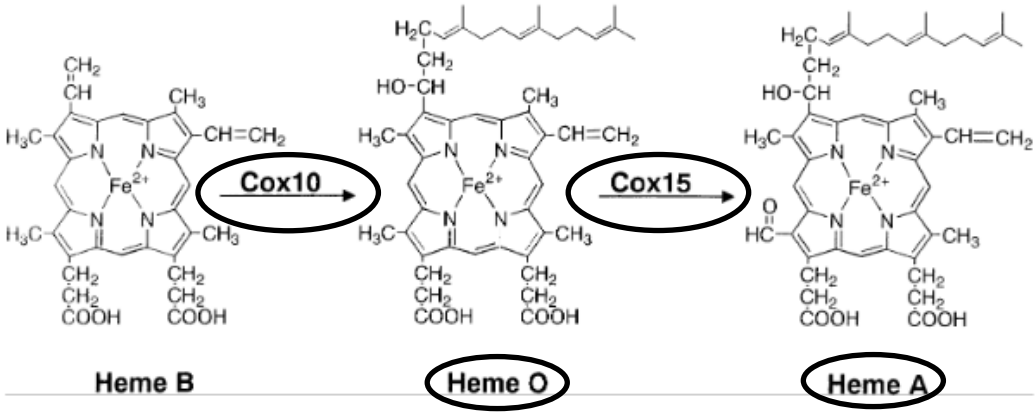

Figura 16 - Via de biossíntese de hemes. Em destaque estão os produtos e as enzimas que ainda não foram identificados em *P. falciparum.*
Fonte: van Dooren et al., 2012.

5.4 Extração de Giberelina

No processo de extração, o *P. falciparum* purificado por coluna magnética foi homogeneizado com tampão Tris-HCl 1,0 M com pH 7,2, 2% de Triton X-100 e incubado durante uma hora a 4 °C. Após centrifugação (25 min a 2400 xg), o pH do sobrenadante foi ajustado para 2,5. A extração foi realizada com dietil-éter e o procedimento do extrato

aquoso, remanescente da fase dietil-éter, foi realizado como o método descrito por Barthe e Bulard (1978) (113).

5.5 Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) para separação de giberelina

Sistema gradiente de RP-HPLC para separação de giberelina foi uma adaptação do sistema isocrático descrito por Bhalla e Singh (2010)(114), no qual o solvente é acetonitrila (ACN)/H_2O (1:1), com fluxo de 0,5 mL/min a 30ºC em uma coluna C18 3.0 mm X 150 mm YMC ODS-A (5 µm 300 Å). O comprimento de onda utilizado para a análise foi de 206 nm e a Giberelina 4 (GA4) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda - 48870) foi utilizada como padrão.

Eritrócitos não parasitados, como controle, e eritrócitos parasitados, foram metabolicamente marcados com [^{3}H]-GGPP. Ambos os extratos, de eritrócitos e parasitas obtidos como descrito em 5.3, foram co-injectados com GA4 como padrão do sistema de HPLC descrito. As amostras foram secas a 50 °C e ressuspendidas em 0,5 mL de líquido de cintilação (Betaplate Scint, Perkin Elmer, Finlândia) para enfim serem analisados em uma unidade de cintilador Beckman®.

5.6 Teste de IC_{50} *in vitro* das drogas Uniconazol-P e Inabenfide e Microteste de recuperação

A parasitemia inicial utilizada foi de 0,5% de *P. falciparum* no estágio trofozoíta jovem com um hematócrito de 3 %. O microteste é realizado em placa com 96 poços (Corning) para cultura de células. O volume final por poço foi de 200 µl (115).

Culturas independentes de parasitas foram tratadas por 48 horas com as drogas INA 3,0 µM ou UNP 30 µM em meio enriquecido com giberelina A4 ou A3 (GA4 e GA3), utilizada para o parasita obter giberelina exógena e assim fazer os ensaios que denominamos como teste de recuperação, ou seja, se as drogas estivessem inibindo a formação de giberelina o parasita poderia obter do meio enriquecido e se recuperar.

As análises foram feitas através de esfregaços corados com Panótico® onde se diferenciam as formas dos parasitas (trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte) calculando-se assim a porcentagem de parasitas vivos e saudáveis de cada alíquota. Após obtenção desses valores, sendo dois deles extremos de concentrações, calculou-se a

concentração da droga suficiente para inibir 50% do crescimento do parasita, IC_{50}. Todos os testes foram feitos em triplicata.

INA e UNP são preparadas com seus respectivos solventes, DMSO e etanol. Concentrações maiores, do que as utilizadas para diluir a droga, de DMSO e etanol foram testadas em cultura parasitada, para assim descartarmos algum efeito prejudicial no desenvolvimento e crescimento dos parasitas que pudesse ter sido ocasionado pelo solvente e não pela droga.

5.7 Análise *in silico*

O genoma de *Plasmodium falciparum* foi obtido a partir de Plasmodium Genomic Resource DataBase (http://plasmodb.org/plasmo/). As sequências dos projetos de genoma 'Tritryps' foram obtidas no GeneDB (http://www.genedb.org/) e TriTrypDB (http://tritrypdb.org/tritrypdb/)(116). A sequência de *S. cerevisiae* ScCOX10 (YPL172C) foi obtida a partir da Base de Dados do Genoma de *Saccharomyces* (www.yeastgenome.org). A sequência de *E. coli* (NC_000913.3), sequência de *B. subtilis* (NC_000964.3), sequência de *A. thaliana* (NM_130015.3) e sequência de *Homo sapiens* (NM_001303.3) foram obtidas a partir de NCBI (http: // www. Ncbi.nlm.nih.gov).

Para o alinhamento de sequências múltiplas de aminoácidos, utilizou-se o software clustalw 2.0.12(117). As porcentagens de similaridade e identidade foram calculadas usando o software Ident e Sim (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html).

As previsões do domínio transmembrana para a enzima Cox10 foram geradas utilizando o software para a previsão de topologia TMHMM 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/).

As análises evolutivas filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando o software MEGA versão 6(118). A história evolutiva foi entendida usando o método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo de matriz JTT(119). As árvores com maior probabilidade de log foram mostradas.

As árvores iniciais para a pesquisa foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Joining e BioNJ a uma matriz de distâncias estimada usando o modelo JTT e, em seguida, selecionando a topologia com valor de probabilidade de log superior. Sendo assim, a história evolutiva para cada gene foi reconstruída utilizando o método de Máxima Verossimilhança para todas as análises, as árvores com maior valor de

log foram mostradas, utilizamos log devido aos valores obtidos serem muito baixos. A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramificação medida no número de substituições por local. Todas as posições contendo as lacunas e os dados em falta foram eliminados. Análises evolucionárias foram realizadas em MEGA6 (120).

5.8 Preparação de heme O padrão

O vector de expressão pET3a, com o gene CtB de *Bacillus subtilis*, doado por John Wrightt do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Michigan ao professor Alejandro Miguel Katzin do laboratório de malária da Universidade de São Paulo, foi expresso em estirpes BL21 de *E. coli* e utilizado para obter heme O padrão. A extração de heme O das bactérias transformadas foi feita com acetona e ácido clorídrico, e foi separada por coluna Waters Sep-Pak Vac C18 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts EUA), descrita em 5.11.

A construção de um plasmídeo pet3a/CtA foi realizada para extração de heme A, semelhante ao cedido por John Wrightt para extração de heme O, a diferença é que o fragmento da construção foi baseado na sequência de cox15 ao invés de cox10, ambas são providas do genoma de *B. subtilis*, como descrito em Brown et al., 2002 (93).

5.9 Extração de heme B e heme O

Para extração de heme B e O, amostras de *P. falciparum* purificado por coluna magnética foram lisados com saponina a 0,1% e ressuspensos em solução de Tris-HCl 0,2 M a pH 8,0 mais sacaroses a 10%. Após ressuspensão, adicionou-se acetona/HCl (95: 5) numa proporção – (40% do lisado) / (60% acetona ácida), o ressuspendido foi mantido em gelo durante 90 minutos. Em seguida, o extrato de parasita foi centrifugado a 8000 xg durante 10 minutos a 4 °C para separar heme B e heme O em coluna Waters-Sep-Pak® C18 Vac (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). Como controle o mesmo procedimento, de extração e separação por afinidade, foi realizado em hemácias não parasitadas.

5.10 Extração de heme A

Tanto para coração bovino ou de camundongos quanto para parasitas purificados em coluna magnética, a metodologia de extração de heme A foi a mesma. Para a extração, adicionamos duas vezes o volume da amostra de acetona aquosa (80% acetona a 4 ºC), a mistura foi passada no vortex por 1 minuto e centrifugada a 2.500 xg a 4 ºC. O pellet foi ressuspendido, pela segunda vez, em duas vezes o volume da amostra de acetona aquosa fria, misturado no vortex por 1 minuto e centrifugada a 2.500 xg. Ao sobrenadante adicionamos duas vezes o volume da amostra de éter e metade do volume da amostra de HCl 1,5 M, a mistura foi homogenizada no vortex por 1 minuto e centrifugada a 2.500 xg. A última etapa do processo foi realizada por duas vezes. A fase do éter é retirada e seca por gás nitrogênio (93). A análise da amostra seca foi realizada por espectrometria de massas.

5.11 Separação de heme B, heme O e heme A

A separação de heme B e heme O foi realizada utilizando colunas Waters-Sep-Pak® C18 Vac (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA). Os extratos foram previamente lavados com 2 mL de Acetonitrila (ACN) a 25%. O sobrenadante da extração de heme foi coletado e passado através da coluna de afinidade Waters Sep-Pak® C18 Vac. Em seguida, lavamos a coluna com 5 mL de ACN a 25%. Após a lavagem, utilizamos ACN a 80% para eluir heme B e DMSO para eluir heme O.

Outra metodologia testada para separação das moléculas heme O e heme A foi por sistema de RP-HPLC. Utilizamos um sistema de gradiente linear com 0,1% de TFA em Acetonitrila (v/v) como solvente A e 0,1% TFA em H_2O como solvente B (20). O gradiente empregado de 10% a 90% do solvente B, e o fluxo de 0,5 mL/min a 30ºC em coluna C18 3.0 mm X 150 mm YMC ODS-A (5 µm 300 Å) como descrito em Brown et al., 2002(93) com adaptações testadas neste trabalho. O comprimento de onda utilizado para a análise dos hemes é de 400 nm e o Cloreto de Ferro (III) Deuteroporfirina IX é utilizado como um uma referência para os tempos de retenção do heme O e do heme A (93).

5.12 Marcação metabólica de heme B e heme O em parasitas tratados com Inabenfide e Uniconazol-P

Para verificarmos se as drogas INA e UNP estão agindo na via de biossíntese de heme B e/ou heme O tratamos parasitas com ambas as drogas, para isso, utilizamos as

seguintes concentrações: de INA 0,15 µM e 1,5 µM e UNP 2,0 µM e 20 µM (concentrações abaixo IC_{50} e 15 vezes menor), por 48 horas e nas últimas 16 horas adicionamos os precursores radioativos [^{14}C]-glicina ou [^{3}H]-FPP em garrafas de cultura de parasitas. Após o tratamento e a marcação metabólica realizamos a extração com acetona / HCl (95:5), como descrito em no item 5.9, e a separação dos hemes por coluna Waters Sep-Pak® C18 Vac, como descrito em no item 5.11. Assim, por análise da incorporação dos radioativos é possível relatar se as drogas agem na via de biossíntese do heme.

5.13 Espectrometia de massa

Os experimentos envolvendo os espectrômetros de massas foram realizados no Centro de Facilidades para a Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o auxílio do técnico Fernando G Almeida.

Para conferir se as amostras de extrato de parasita purificado por coluna de afinidade apresentavam compostos com as massas de heme B, heme O e heme A:

5.13.1 MALDI

As amostras foram analisadas num espectrômetro de massa Smartbeam de velocidade Autoflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) utilizando o software FlexControl (versão 3.3, Bruker Daltonics). Os espectros foram registrados no modo refletor positivo (frequência do laser, 500 Hz, tempo de atraso de extração, 130 ns, tensão de fonte de íons 1, 19,0 kV, tensão de fonte de íons 2, 16,8 kV, tensão de lente 7,9 kV, refletor 1 21,0 kV, refletor 2 9,35 kV, gama de massa, 500 a 2500 Da). Para cada espectro, 5000 tiros, em etapas de 500 disparos, foram somados a partir de diferentes posições do alvo, coletadas e analisadas. Todos os espectros foram calibrados utilizando Padrão de Calibração de Péptidos (Bradykinina [M + H] + = 757,3991, Angiotensina II [M + H] + = 1046,5418, Angiotensina I [M + H] + = 1296,6848, Substância P [M + H] + = 1347,7354, Bombesin [M + H] + = 1619,8223, Substrato de Renina [M + H] + = 1758,9326, Clip ACTH 1-17 [M + H] + = 2093,0862, Clip ACTH 18-39 [M + H] + = 2465.1983) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

Para as experiências MS/MS, o instrumento foi ajustado para o modo LIFT (frequência de laser, 200Hz, tempo de atraso de extração, 120 ns, tensão de fonte de íon 1,

6,0 kV, tensão de fonte de íons 2, 5,3 kV, tensão de lente 3,0 kV, refletor 1, 27,0 kV, reflector 2, 11,6 kV, elevador 1, 19,0 kV e elevador 2, 4,40 kV) e 2000 tiros foram somados em passos de 500 disparos para cada espectro adquirido.

5.13.2 LC-MS/MS

As amostras de heme foram analisadas num sistema LC-MS composto por uma bomba quaternária ACCELA 600 LC ligada a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo TSQ Quantum Max (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) através de uma fonte de ionização ESI. A separação foi realizada utilizando uma Coluna Hypersil Gold C18 (100 x 2,1 mm, i.d., 5 µm - Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A temperatura da coluna foi mantida a 25 °C. O volume de injeção foi de 5 µL. A fase móvel utilizada para separar os compostos consistiu em água com 0,02% de ácido acético (A) e acetonitrilo com 0,02% de ácido acético (B). A composição do solvente B variou como se segue: 0-2 minutos, mantida a 10%; 2-20 minutos, de 10 a 90% de gradiente linear; 20-30 minutos, mantida a 10%. O caudal foi de 0,2 mL/min. O espectrômetro de massa TSQ Quantum Max foi operado no modo de varredura MS de íons de produto, em polaridade positiva. Os parâmetros de funcionamento da MS foram a tensão de pulverização 3500 V, a temperatura do vaporizador 375 °C, a pressão do gás da bainha 60 (unidades arbitrárias), a pressão do gás de varredura iónica 2,0 (unidades arbitrárias), a pressão do gás auxiliar 55 (unidades arbitrárias); Temperatura capilar 224 °C, deslocamento capilar 35 V.

5.14 Efeito das drogas inabenfide e uniconazol-P na produção de hemes

5.14.1 Potencial de mitocôndria

Como ensaio preliminar dos fármacos, realizamos a cultura de *P. falciparum* em placa de 12 poços. A cultura foi tratada com as drogas INA (2,5 µM e 5,0 µM), UNP (25 µM e 50 µM) e CLQ (5 nM e 15 nM)[i] e amostras foram retiradas e centrifugadas, após 24 horas de tratamento. Os eritrócitos infectados por parasitas com 3% de hematócrito e parasitemia inicial de 25% foram incubados com corante JC-1 a 2 µM (Sigma-Aldrich) por

[i] As concentrações utilizadas para INA, UNP e CLQ foram abaixo e acima da IC_{50} ideais para ver diminuição da parasitemia, entretanto, as concentrações permitem a realização do experimento por manter um número adequado de parasitas viáveis.

30 minutos a 37 °C no escuro com agitação a cada 10 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas 4 vezes com PBS. Após a quarta lavagem, uma parte da amostra foi incubada com 10 µl/mL de Hoechst (10 mg/mL) por 60 segundos e lavada uma quinta vez. As amostras incubadas com JC-1 e Hoechst foram observadas por: citometria de fluxo para verificar se a ação das drogas está relacionada com o potencial da mitocôndria, e por microscopia de fluorescência, que permitiu a visualização da incorporação de JC-1 pelo parasita.

5.15 Teste *in vivo*

Inicialmente decidimos tratar os camundongos com INA, porque sua concentração para IC_{50} *in vitro* é 10 vezes menor do que a concentração de UNP. Para este experimento contei com o auxílio da aluna de doutorado, do nosso laboratório, Adriana Alejandra Marin Rodriguez.

5.16 Animais experimentais

Camundongos Balb/c machos, com 6 - 8 semanas de idade e com peso de 25 ± 2gr, fornecidos pelo Biotério Setorial do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), foram mantidos em salas com temperatura e umidade padrão, com ciclo claro/escuro de 12 horas, em gaiolas de polietileno com maravalha de pinho autoclavada e alimentados com ração e água ad libitum. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as normas de cuidados de animais de laboratório e o uso dos animais estava de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA), processo n° 140/2009.

5.17 Infecção

Para obter os inóculos experimentais a cepa *P. berghei* ANKA GFP (PbGFP), letal em infecções em camundongos Balb/c mantida em nitrogênio, foi descongelada a 37ºC e inoculada via intraperitoneal (i.p.), em camundongos Balb/c. Posteriormente durante a fase logarítimica da parasitemia (7 dias após inoculação), o sangue dos camundongos foi coletado por punção cardíaca, utilizando o citrato de sódio como anticoagulante. Após a

coleta o sangue foi lavado 2 vezes com PBS por 5 minutos a 4°C, o pellet gerado foi ressuspendido em 1 mL de PBS. Uma alíquota foi retirada para análise e contagem dos eritrócitos em Câmara de Neubauer. Por último, cada camundongo Balb/c (n=20) foi infectado via intraperitoneal com 1 x 10^6 / 200 µL eritrócitos parasitados de PbGFP.

5.18 Parasitemia

Sangue foi coletado, 2 µl, através de uma pequena incisão na ponta da cauda do camundongo, e foi depositada em 400 µl de tampão (0,05% azida sódica e 2% de soro fetal bovino). A parasitemia de todos os animais, foi acompanhada em dias pré-definidos e determinada usando o Facscalibur e o programa Cellquest pro versão 5.2.

5.19 Camundongos Balb/c infectados com PbGFP tratados com INA

Camundongos Balb/c infectados com PbGFP foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, grupo controle e grupos tratados com duas concentrações diferentes de INA, devido ausência de dados na literatura. Após duas horas da infecção, 10 camundongos foram tratados com INA nas concentrações de 80 mg/kg/dia e 8 mg/kg/dia e tiveram a parasitemia acompanhada diariamente por 4 dias.

5.20 Extração de ácido nucleico, amplificação por PCR, clonagem do gene que codifica a COX10 e a COX15

Para verificarmos se HOS e/ou HAS estão presentes em *P. falciparum*, a sequência de aminoácidos da cox10 e cox15 de *Saccharomyces cerevisiae*, com os números de acesso no Genbank: NP_015153.1 e NP_011068.1 respectivamente, foram inseridas no banco de dados do PlasmoDB, no qual encontramos as sequências identificados como PF3D7_0519300 e PF3D7_1435000. Um alinhamento da sequência encontrada em *P. falciparum* com as sequências de cox10 e cox15 de outras espécies foi realizado utilizando o software GeneDoc.

DNA do parasita foi isolado a partir da extração de parasitas por fenol/clorofórmio. DNA genômico do *P. falciparum* foi submetido à amplificação por PCR usando iniciadores que foram desenhados de acordo com a sequência dos genes putativos, da proteína semelhante a citocromo c oxidase (heme A: farnesiltransferase) PF3D7_0519300 e da

proteína semelhante a citocromo c oxidase PF3D7_1435000 (Tabela 1) (http://www.PlasmoDB.org; GenBank ®).

		cox10/ PF3D7_1435000 - PFE0970w
cox10	5'-3'	PF3D7_1435000 _fw: ggatccATGAATAAAAATTATTCACTTGGTC
	3'-5'	PF3D7_1435000 _rv: gaattcAGAAAATACTATACAATATTTAATGAGC
		cox15/ PF3D7_0519300 - PF14_0331
cox15	5'-3'	PF3D7_0519300 _fw: ggatccATGGGATTTAATAAGATTTTTCCTA
	3'-5'	PF3D7_0519300_rv: gaattcTTTAAATGTTCTTTTTATCAAATGTAGG

Tabela 1 - Oligos desenhados de acordo com a sequência dos genes putativos PF3D7_1435000 e PF3D7_0519300.
Fonte: Elaborada pela autora.

5.21 RT-PCR (transcrição reversa-PCR)

Para obtermos os fragmentos de cox10 e cox15, realizamos a amplificação do gene putativo por RT-PCR de *P. falciparum* incluindo dNTPs, tampão de PCR contendo $MgCl_2$, KCl e Taq DNA polimerase (Invitrogen). Condições de amplificação, como temperatura, tempo e ciclos para desnaturação foram testadas, iniciando com uma temperatura de análise de 53 °C. O fragmento amplificado foi clonado em vetor pGEM® T-easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante gerando pGEM_cox10 e pGEM_cox15. Clones foram sequenciados em ambas as direções, 5'-3' e 3'-5', melhor descrito em 5.22.

5.22 Sequenciamento

Primeiramente fizemos uma análise de restrição do pGEM_cox10 e do pGEM_cox15, para isso, utilizamos as enzimas EcoRI e BamHI (Fermentas, tipo comum ou fast digest) conforme as instruções do fabricante. Os fragmentos, resultantes da digestão por EcoRI e BamHI, foram submetidos à eletroforese em gel TAE de agarose 1%, o DNA foi marcado com brometo de etídio e observado em luz ultravioleta.

Em seguida a análise de restrição, pGEM_cox10 e pGEM_cox15 foram enviados para sequenciamento de DNA em um sequenciador ABI 3550 e componentes BigDye 3.1 (Applied Biosystems). Após confirmação de 100% de identidade dos fragmentos com as sequências depositadas no plasmoDB, estes foram excisados e clonados nos vetores de transfecção.

5.23 Extração de DNA do plasmídeo em pequena escala (Miniprep)

Bactérias competentes foram transformadas com pGEM_cox10 e pGEM_cox15, através da metodologia química que utiliza de cloreto de cálcio e um choque térmico. As bactérias transformadas foram cultivadas em placas com Agar LB-antibiótico. Após a incubação por 16 horas das placas, colônias foram inoculadas em 1,5mL de LB ou TB-amp em tubos Falcon de 15 mL. Os cultivos foram incubados sob agitação por 16 horas a 37 ºC e com 5% de CO_2.

Para a extração do DNA dos plasmídeos utilizados nesse projeto, realizamos o procedimento descrito por Sambrook et al. 2001 (121), que consiste da troca do meio LB ou TB das bactérias por um tampão isotônico e posterior lise com detergente iónico alcalino (SDS), que desnatura parcialmente plasmídeos e totalmente o DNA genômico (gDNA). Após a desnaturação precipitamos os complexos SDS/proteína/gDNA, o DNA do plasmídeo foi precipitado com isopropanol e a eliminação de sais e contaminantes foi realizada por lavagem com etanol 70%.

Posterior à incubação, as culturas foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas a 1100 xg durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 200 µl de tampão 1 (Tris-HCl 0,1 M pH 8, glicose 1% e 2 mM de EDTA) e as bactérias foram lizadas por adição de 400µl de tampão 2 (NaOH 0,2 M e SDS 1%). As proteínas e gDNA de *E. coli* foram precipitados com 300 µl de tampão 3 (acetato de potássio 3M e ácido acético 5 M) e por incubação no gelo durante 5 minutos.

Após a precipitação do gDNA das bactérias (por centrifugação a 1100 xg durante 5 minutos a 4 ºC), o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o material foi precipitado com 600 µl de isopropanol, por 10 minutos incubação a 24 ºC e centrifugação a 1100 xg durante 5 minutos a 4 ºC. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 2 minutos a 1100 xg. Por fim, o sobrenadante foi retirado e o material foi resusspenso em 50 µl de solução com pH 8,0 de 10 mM de Tris-HCl e 0,1 M EDTA (TE) suplementado com RNAse (10 µg/mL, Invitrogen).

Para análise e confirmação da clonagem, 4 µl do DNA do plasmídeo foram incubados com as respectivas enzimas de restrição EcoRI e BamHI a 37 ºC e analisados por eletroforese em gel TAE de agarose 1%, o DNA foi marcado com brometo de etídio e observado em luz ultravioleta.

5.24 Extração de DNA do plasmídeo em grande escala (Maxiprep, segundo Sambrook et al., 1991 (121))

Para obtermos uma quantidade de DNA do plasmídeo desejado realizamos a Maxiprep, para isso, após confirmação da sequência utilizando enzimas de restrição, 0,2µl dos plasmídeos positivos foram usados para re-transformação de células competentes *E. coli* XL1 blue ou DH10B. Uma colônia foi inoculada em 5 mL de LB-amp + 2% de glicose e foi incubada em agitação a 37 ºC durante 7 horas e transferida a 100-200 mL de TB-Amp sob agitação a 37 ºC durante 16 horas.

Após as incubações os cultivos foram centrifugados em tubos Falcon de 50 mL a 1000 xg durante 15 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e as bactérias sedimentadas foram dissolvidas em 5 mL de tampão 1, seguido da adição de 10 mL de tampão 2 com uma leve agitação por inversão do tubo e incubação de 10 minutos. Após a incubação acrescentamos 7,5 mL de tampão 3 o tubo foi agitado por inversão e incubado no gelo durante 10 minutos. O material foi centrifugado a 1000 xg durante 10 minutos a 4ºC.

O sobrenadante foi filtrado para um tubo novo no qual acrescentamos 0,6 vezes o volume da amostra de isopropanol, seguido de um período de incubação de 15 minutos e centrifugação a 1000 xg durante 10 minutos a 4 ºC. Após precipitar o material, o sedimento foi ressuspenso em 3 mL de solução TE e no tubo acrescentamos 3 mL de LiCl 5 M (4 ºC). Após nova centrifugação de 15 minutos a 1000 xg e 4 ºC o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e no qual acrescentamos o mesmo volume de isopropanol. Após uma nova centrifugação (15 minutos a 1000 xg e 4 ºC), sedimento foi ressuspenso em TE-RNAse 10 µg/mL e transferido para um tubo Eppendorf para ser incubado por 30 minutos a 37 ºC.

Em seguida a incubação a 37 ºC, 0,5 mL de PEG 6000/1,6 M NaCl foram adicionados e o material foi centrifugado 5 minutos a 800 xg (centrifuga Eppendorf). O sedimento foi ressuspenso em 0,5 mL de TE e subsequentes foram realizadas extrações com 400 µl dos respectivos solventes: fenol (v 100%), fenol clorofórmio (v/v 50/50%) e clorofórmio (v 100%).

Ao produto obtido das extrações foram adicionados 100 µl de acetato de amônio 10 M. Por fim, os plasmídeos foram precipitados com 1mL de etanol 100%, centrifugado 5 minutos a 1000 xg, lavados com etanol 70% e o sedimento foi seco e ressuspenso em 100-

200 µl de TE. O DNA purificado foi quantificado no aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

5.25 Extração de gDNA de *P. falciparum*

Para extração de gDNA de P. *falciparum,* em 100 µl de hemácias 5% parasitadas foram acrescentados: 1,25 mL de PBS e 150 µl de saponina 1%. A mistura foi agitada por inversão e incubada no gelo por 5 minutos. Logo após a lise das hemácias, os parasitas foram centrifugados por 5 minutos a 1000 xg, e o sedimento obtido (~50µl) foi lavado uma vez com PBS e dissolvido em 250 µl de TE. Posteriormente, foi incubado com 100 µl de tampão de lise 4 X (40 mM Tris-HCl pH 8; 4 mM EDTA; 0,8 mM NaCl e 4% SDS) mais 20 µl de Proteinase K (10 mg/mL) por um período de 3 horas a 37 ºC. Durante este tempo, espera-se que proteínas sejam degradadas e membranas totalmente solubilizadas.

O DNA foi então: extraído com fenol (v 100%), fenol clorofórmio (v/v 50/50%) e clorofórmio (v 100%); lavado uma vez com etanol 70%; seco e ressuspenso em 50-200 µl de TE; e armazenado a 4 ºC.

5.26 Construção dos vetores de integração

Para obtermos os vetores contendo o fragmento desejado, cox10 ou cox15 de *P. falciparum* foram excisados do plasmídeo pGEM® T-easy, utilizando as enzimas de restrição EcoRI e BamHI (Sinapse Biotecnologia) e ligados a plasmídeos pTEX150-HA/Stre3, pTEX150-GFP/HA e pTEX150-DD24/HA, que contêm o epítopo da proteína hemaglutinina (HA), devido a este epítopo podemos utilizar o anticorpo para HA e determinar a presença de HOS e HAS em amostras de *P. falciparum*. Os plasmídeos foram pré-digerido com EcoRI e BamHI. Nos vetores utilizados (Figura 17) o gene que codifica a proteína de fusão, nesse caso a cox10 e cox15, não tem promotor, impedindo assim que a proteína seja expressa antes da integração. Uma vez integrado no genoma a proteína de fusão é expressa em níveis similares aos da endógena (122).

Para verificar a função dos fragmentos, estes foram ligados a plasmídeos pRS426 com promotor MET25 e terminador CYC1 (p426.MET25) (123). Os plasmídeos resultantes foram transformados em bactérias competentes DH10B.

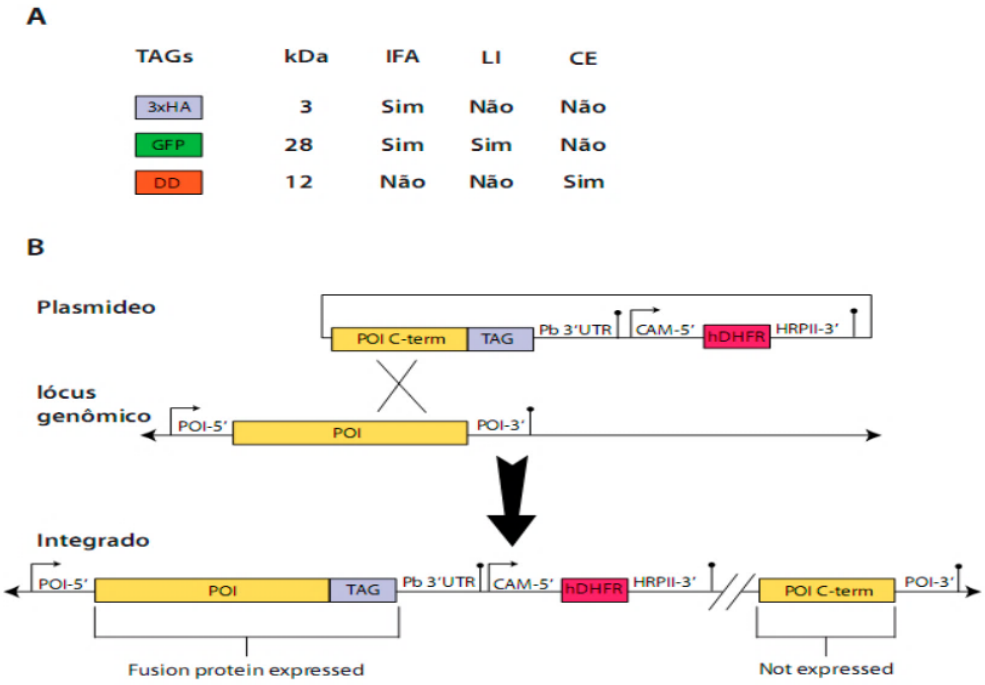

Figura 17 - Diagrama da estratégia de integração dos tags na região C-terminal da proteína de interesse (POI corresponde a Cox10 e Cox15 nesse projeto). (A) Tags que serão integrados na região C-terminal de Cox10 e Cox15 e suas funções: IFA – imunofluorescência, LI – imagem de fluorescência com células vivas, CE – expressão condicional ou regulada. (B) Representação esquemática da integração no lócus genômico que codificam as proteínas de interesse (POI). hDHFR – gene que codifica a diidrofolatoredutase humana (marcador de seleção que confere resistência à droga WR99210). Os vetores com os tags para integração são derivados do plasmídeo pTEX150-HA/Stre3'.
Fonte: de Azevedo, 2012(124)

Para tornar a proteína regulável e ao mesmo tempo diminuir ao máximo mudanças na sua sequência de aminoácidos no C-terminal, optamos por fazer outro tipo de plasmídeo, incluindo apenas um marcador HA e uma sequência ribozima glmS no 3' do gene. A ribozima é ativada por adição de N-acetil glucosamina no meio de cultivo do transfectante, já em cultura. Com glmS inserido antes do 3' UTR/terminador este cliva o sinal poliA do transcrito levando a sua destruição (Figura 18). O grau de auto-clivagem da ribozima glmS, e por isso o grau de atenuação do gene alvo, pode ser controlada pela concentração de GlcN adicionado ao parasita meio de cultura (125). Assim poderemos por marcação metabólica confirmar sua função. Experimentos estão sendo realizados com a ajuda da aluna de doutorado Eliana Galindo do laboratório de Biologia Molecular do ICB II.

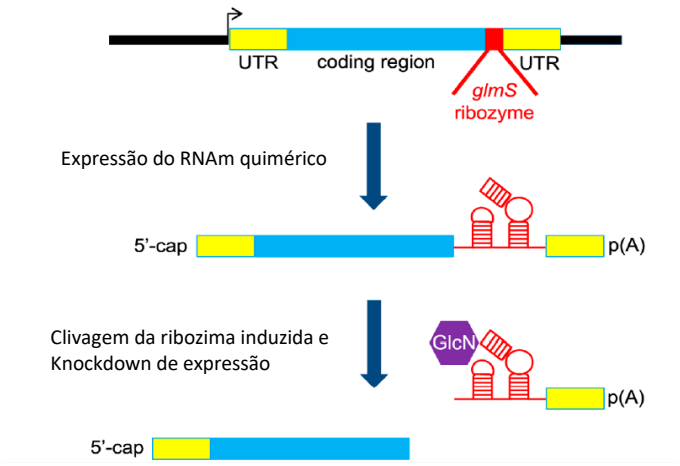

Figura 18 - Esquema da ferramenta genética da ribozima glmS. A ribozima é inserido na 3'-UTR após a região de codificação de modo a que esteja presente no RNAm. A seguir à adição do indutor, N-acetil glucosamina, que se liga ao ribozima, RNAm é auto-clivada resultando na degradação do RNAm e subsequente *knockdown* da proteína correspondente.
Fonte: Prommana, 2013 (125).

5.27 Transfecção em *P. falciparum* para geração das linhagens transgênicas com os plasmídeos integrados e seleção dos parasitas

A transfecção foi realizada através da metodologia descrita por Hasenkampet al., 2012 (126) nas condições de eletroporação estabelecidas por Fidock e Wellems, 1997 (127). Um volume de 150 µl de hemácias humanas frescas (<1 semana após doação) não parasitadas foi previamente lavado em cytomix (120 mMKCl; 0,15 mM $CaCl_2$; 10 mM K_2HPO_4 pH 7,6; 25 mM HEPES pH 7,6; 2 mM EGTA; 3 mM $MgCl_2$). Nas hemácias já lavadas acrescentamos 40 µg dos plasmídeos circulares purificados por maxiprep, como descrito em 4.23. Essa mistura foi eletroporada em cubetas de 0,2 cm (Biorad), com as seguintes condições de eletroporação: 0,31 kV e 960 µF. Por fim, os eritrócitos eletroporados foram adicionados a cultura juntamente com parasitas em fase trofozoito/esquizonte purificados em coluna magnética ou por flotação em gelatina.

Os parasitas eletroporados são mantidos em cultura por 2 dias com trocas diárias de meio, em seguida uma seleção de parasitas resistentes foi iniciada com o uso da droga WR99210 ou WR99210/Shld1 nas concentrações: de 2,5 nM e 0,5 µM, respectivamente. O domínio desestabilizante (DD), encontrado nas construções pTEX150-DD24/HA, possui um sítio para um ligante Shld1, então a proteína é estável somente na presença do ligante, se instável a proteína de fusão de interesse é degradada.

O meio de cultura é trocado diariamente nos primeiros 5 dias e depois em dias alternados até a detecção dos parasitas.

5.28 Ciclagem dos parasitas

Para obtermos uma linhagem de parasita transfectado é necessário realizar a seleção utilizando WR99210 ou WR99210/Shld1. Os parasitas são submetidos a, no mínimo, três ciclos de 14 dias em meio com a droga e 14 sem a droga. A ciclagem facilita a seleção de eventos de integração por recombinação simples. Nos intervalos dos ciclos, a integração no lócus desejado é detectada por PCR, Western Bolt, devido a presença de HA, e/ou microscopia de fluorescência, devido ao GFP.

5.28.1 Clonagem dos parasitas por diluição limitante

Para obter linhagens de parasitas 100% integrados em transfectantes com cox10_GFP_HA_DD24, foram feitas diluições seriadas até obter aproximadamente 30 parasitas em 9,6 mL de meio em 3-5% de hematócrito, que foram distribuídos em placas de 96 poços durante duas semanas na ausência de WR99210. A detecção dos poços positivos foi feita por esfregaço sanguíneo corado com kit panótico rápido. Poços com parasitas foram expandidos até alcançarem parsitemias suficientes para extração de gDNA com kit (Promega) e amplificação do gene de interesse por PCR.

5.29 Cultivo de *P. falciparum* com N-Acetil glucosamina

Para induzir a clivagem do transcrito alvo, parasitas transfectados com vetores que contém a sequência da ribozima glmS (pHHTK_cox10_glms e pHHTK_cox15_glms) foram sincronizados e mantidos em cultura com N-Acetil glucosamina 5 mM, e depois de 24 e 48 horas de incubação o RNA foi extraído para posteriores análises de transcrição dos genes de interesse. A ribozima de *Bacillus subtillus* glmS é única, uma vez que tem um co-factor específico (glucosamina ou seus derivados) e apenas na sua presença induz a degradação do mRNA (125,128).

5.30 Imunofluorescência

Para a análise de imunofluorescência seguimos o protocolo descrito por Furtado, 1999 (129) com modificações. Esfregaços de eritrócitos infectados (5-10% de parasitemia, hematócrito de 10%) foram fixadas com metanol durante 10 segundos em, bloqueados e permeabilizados com 0,1% de BSA e 0,05% de saponina em PBS durante 25 min,

incubado com o anticorpo primário anti-apicoplasto (diluição 1:1000, FastBio) diluídos em 0,1% BSA, 0,001% de saponina em PBS durante 1 hora a 24 ºC, em seguida incubado com o anticorpo secundário Alexa Fluor (®) 488 e DAPI 10 µg/mL também diluído em 0,1% BSA e 0,001% de saponina em PBS durante 45 min a 24 ºC. Depois da lavagem em PBS. O material foi seco ao ar e, em seguida, analisadas por microscopia de fluorescência [ii].

Para a análise com parasitas vivos que expressam GFP, utilizamos Mitotracker, (Molecular Probes, São Paulo, SP, Brasil - diluição 1: 10000) durante 30 min a 37 °C, depois da incubação centrifugamos a amostra e fizemos um esfregaço das hemácias parasitas, os eritrócitos das laminas foram fixadas com metanol durante 10 segundos. Após a fixação as hemácias foram bloqueados e permeabilizados com 0,1% de BSA, 0,05% de PBS-saponina durante 25 min e incubados com DAPI por 45 min a 24 ºC. Após secarem ao ar as laminas foram visualizados por microscopia de fluorescência .

5.31 Funções enzimáticas das recombinantes cox10 e da cox15

Para verificarmos a função de HOS e HAS de *P. falciparum*, utilizamos estirpes de levedura *Saccharomyces cerevisiae* com as deleções dos ORFs de ortólogos de cox10 e cox15, Δcox10 e Δcox15, doadas por Dennis Winge da Universidade de Utah à Julia Cricco da Universidade de Rosario. As células foram cultivadas em meio de cultura completo e enriquecido com: YP, extrato de levedura 1%, peptona a 2%; ou, meio sem os nutrientes adequados para o plasmídeo seleção, neste caso meio sem uracila.

Primeiramente inserimos os fragmentos de cox10 e cox15 provindos de *Plasmodium* em um vetor de expressão para leveduras, o p426.MET25, esse vetor permite que a levedura se desenvolva em meio sem uracila. A competência respiratória das estirpes é determinada utilizando testes de crescimento em placas contendo 2% de glucose ou 2% glicerol-3% de etanol como fontes de carbono, as quais são incubadas em 30 ºC para 3-5 dias (130). Em meio com glucose a levedura pode obter ATP por fermentação, já em meio glicerol/etanol a levedura precisaria respirar para formar ATP, e isso só é possível se cox10 e 15 complementassem as leveduras Δcox10 e Δcox15, Figura 19.

[ii] (Microscópio de fluorescência DMI6000B/AF6000 (Leica) acoplado a um sistema de câmera digital (DFC 365 FX). Imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência com programa incorporado ao sistema (Leica AF6000) e editadas com o programa Image J)

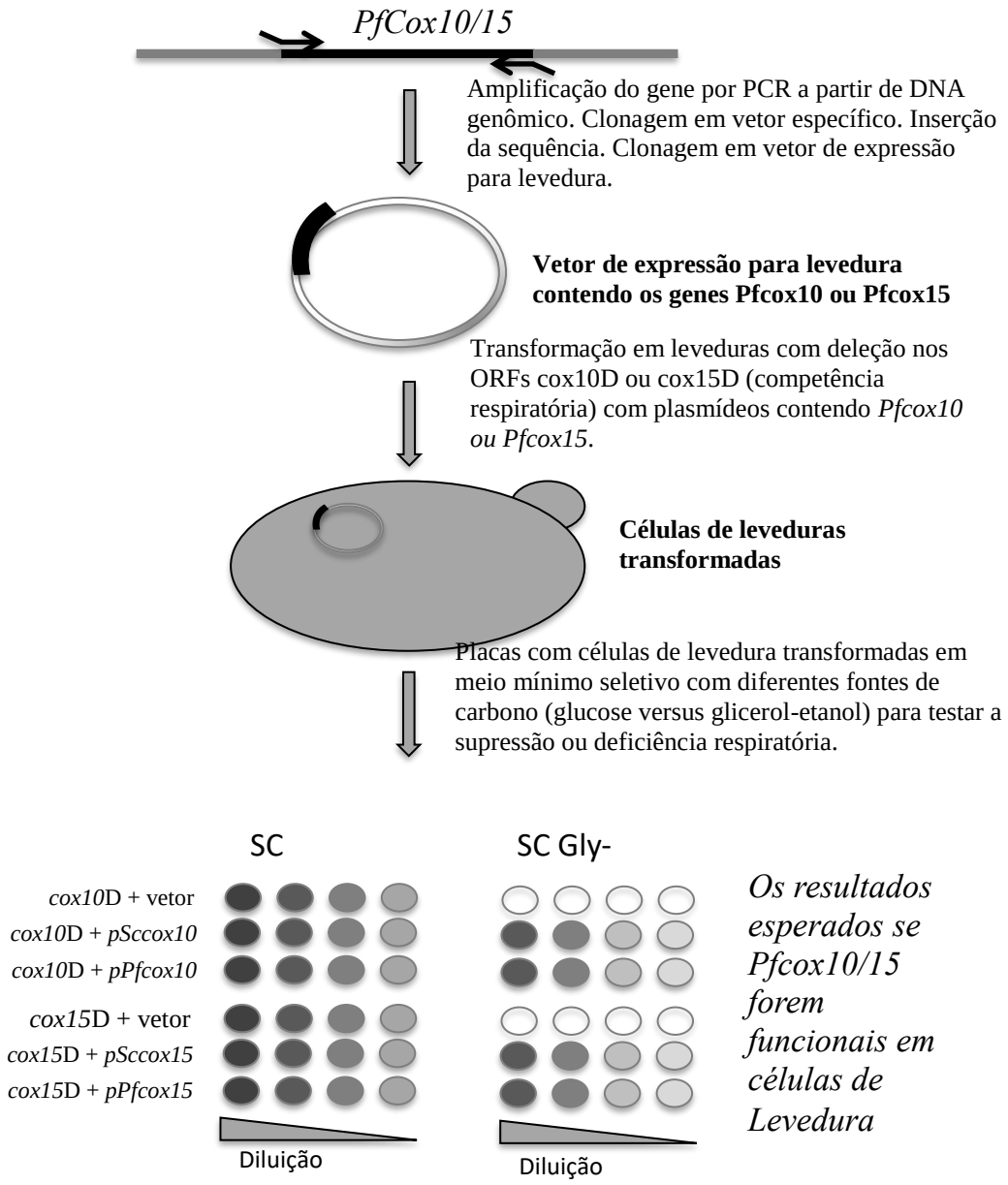

Figura 19 - Esquema mostra a inserção dos fragmentos cox10 e cox15 em plasmídeo p426.MET25, a transformação destes em leveduras com as deleções dos ORF Δcox10 e cox15Δ e os resultados esperados.
Fonte: Elaborada pela autora

5.32 Análise estatística

Para variáveis com distribuição normal, utilizamos o teste t-Student para comparar médias entre eritrócitos infectados não tratados e eritrócitos infectados tratados com INA ou UNP. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM® 5.3

6 Resultados e discussão

6.1 Giberelina

A via de biossíntese de giberelina seria um importante alvo, já que: não está presente em seres humanos; é bastante estudada em plantas; e por ter alguns inibidores dessa via conhecidos. Por isso, demos início a sua caracterização em *P. falciparum*.

6.1.1 Identificação de Giberelina e os efeitos de inabenfide e uniconazol-P em *P. falciparum*

Inabenfide e uniconazol-P os inibidores da giberelina utilizados neste estudo afetam a síntese de giberelina nas plantas e também afetam o crescimento de *P. falciparum in vitro* (104).

Para padronizar um sistema para detecção de giberelina por RP-HPLC foram testadas as condições descritas por Bhalla e Singh, 2010 (114). Neste sistema de RP-HPLC isocrático utilizamos como fase móvel o solvente ACN 12%, e como padrão a Giberelina A4, escolhemos trabalhar com a GA4 e GA3 por serem as giberelinas mais estaveis, e segundo Toyama, et al., 2012 (104) as mais eficazes, com ou sem inibidores biossintéticos de giberelina.

Na primeira tentativa, a GA4 no sistema Bhalla e Singh, 2010 (114) apresentou tempo de retenção muito próximo ao tempo do pico de injeção, por isso, a necessidade de modificar o sistema para acetonitrila 50%. Com a modificação, o pico que pode corresponder ao padrão de giberelina tem um tempo de retenção de 7-8 minutos (Figura 20 A), um tempo distante do tempo do pico de injeção.

Após a padronização do sistema para RP-HPLC, o método de extração (item 5.4) foi testado. Utilizamos cultura de eritrócitos não parasitados acrescida do padrão de GA4 (Figura 20 B) e extração com Triton-X-100. A amostra apresentou o pico no tempo de retenção 6-8 minutos e com rendimento de 25% indicando que a metodologia de extração está adequada.

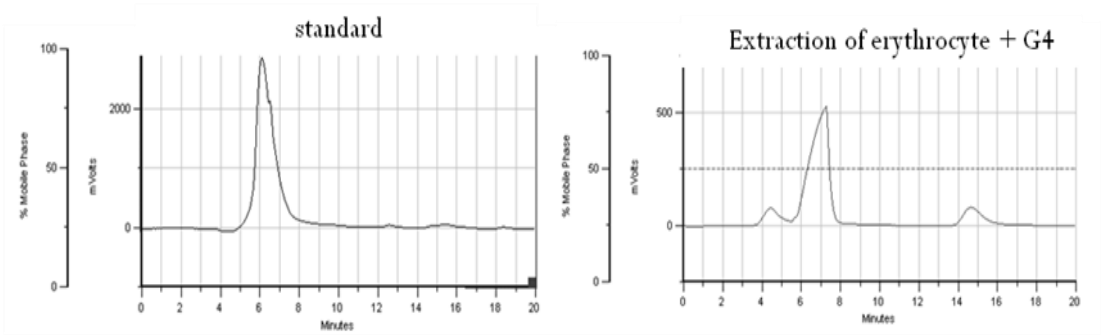

Figura 20 - Cromatogramas realizados por HPLC para o padrão de Giberelina. (A) padrão GA4 (B) Extrato obtido de eritrócitos enriquecido com GA4. Os tempos de retenção ficaram entre 6-8 minutos.
Fonte: Elaborada pela autora

Amostras de parasitas, marcados metabolicamente e purificados na forma esquizonte, passaram pelo processo de extração de giberelina, como descrito em 5.2. A amostra obtida desta extração foi co-injetada com padrão de GA4 para serem cromatografadas por RP-HPLC e analisadas por cintilador. As amostras foram coletadas a 0.5 mL/minuto, secas em estufa a 50 ºC e ressuspendidas em 0,5 mL de líquido de cintilação (BetaplateScint, Perkin Elmer, Finland) e analisadas no cintilador Beckman®. Não foram observadas frações radioativas, ou seja, não obtivemos indícios de biossíntese de giberelina (GA4) por *P. falciparum* (Figura 21).

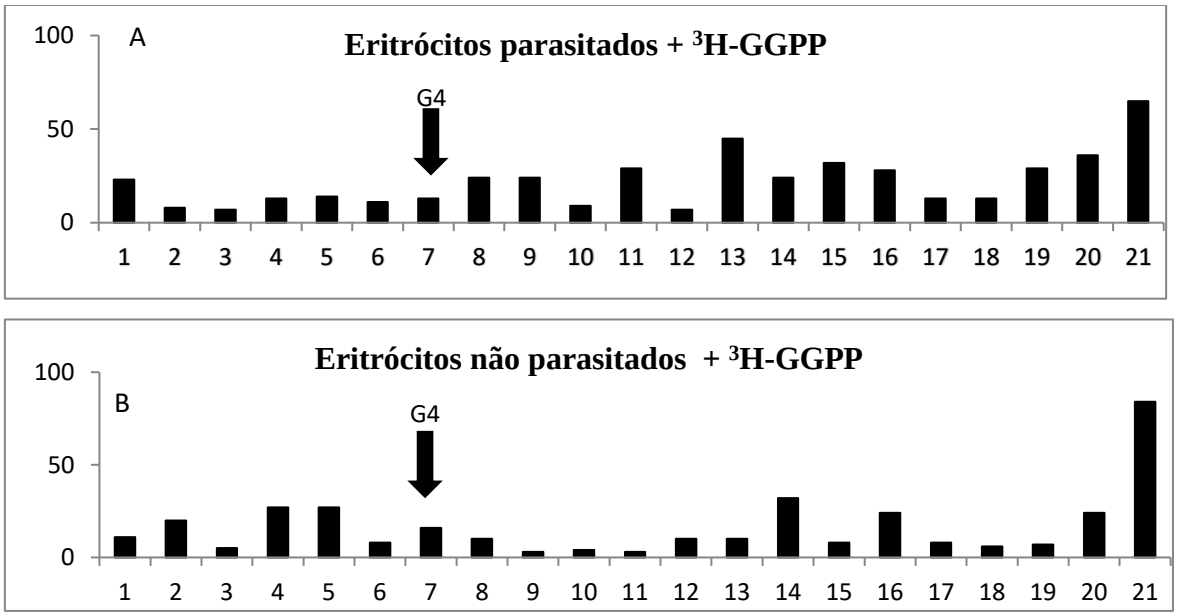

Figura 21 - Perfil de eluição radioativa em parasitos (A) e eritrócitos (B) marcados metabolicamente com [^{3}H]-GGPP, identificado por RP-HPLC. O pico de retenção foi identificado por co-injeção do padrão comercial de GA4 e ocorreu entre 6-8 minutos, indicado pelas setas.
Fonte: Elaborada pela autora.

A metodologia de RP-HPLC utilizada apresentou um rendimento de 25% da giberelina acrescida na amostra de parasitas, isto é, utilizando a metodologia de extração

com Triton-X-100 conseguimos recuperar 25% de giberelina. Entretanto, apesar de um bom rendimento obtidos após a extração e separação de giberelina de uma amostra de parasitas, e de marcação metabólica com radioativo ser uma técnica bem sensivel, não conseguindo observar frações radioativas no tempo de retenção correspondente a GA4. Sendo assim, resolvemos verificar a biossíntese de giberelina pelo parsita por um teste de recuperação, no qual o parasita conseguira se recuperar na presença de inibidores utilizando de giberilina endógena, melhor detalhado em 5.1.2.

6.1.2 Teste de recuperação do parasita

Primeiramente, concentrações entre 10 µM e 150 µM de GA4 e GA3 foram testadas para verificar toxicidade da giberelina exógeno (Figura 22). Como não houve alteração significativa na parasitemia com tais concentrações, foi realizado o teste de recuperação utilizando uma concentração intermediária das testadas (50 µM) (Figura 23).

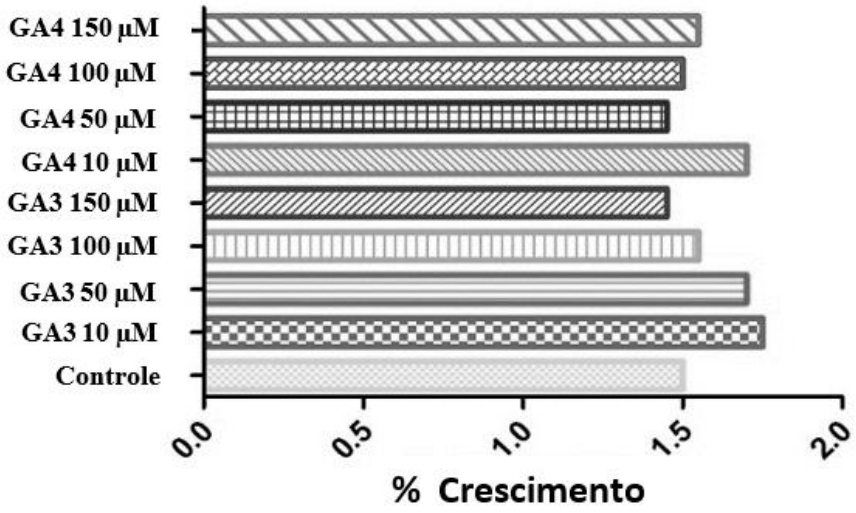

Figura 22 - Teste de toxicidade com diferentes concentrações de GA4 e GA3 adicionadas ao meio de cultivo de *P. falciparum*. Culturas tratadas com diferentes concentrações das giberelinas GA3 e GA4 (entre 10 e 150 µM), crescimento analisado após 48 horas, não havendo diferença entre a parasitemia do controle em relação aos tratados com giberelinas.
Fonte: Elaborada pela autora.

Uma maneira de verificar se a giberelina é biossintetizada e se possui um papel essencial para o parasita, é realizar um microteste de recuperação. Tal microteste consiste de parasitas cultivados em meio contendo: inibidores de síntese de giberelina, INA ou UNP, e enriquecido com produto supostamente inibido, neste caso com as GA4 e GA3. Sendo assim, o parasita mesmo tratado com INA e UNP conseguiria se recuperar,

utilizando a giberelina exógeno. Este procedimento é semelhante ao experimento onde o apicoplasto foi deletado, por tratamento com tetraciclina, e a parasitemia voltou a aumentar após adição de IPP exógeno (23).

As IC_{50} das drogas INA e UNP encontradas por Toyama, 2012 (99), foram confirmadas em nosso laboratório conforme a metodologia descrita em 5.15. Para o teste de recuperação tratamos a cultura de eritrócitos parasitados com a IC_{50} das drogas INA ou UNP, e com a concentração escolhida de GA4 ou GA3. Análises dos resultados nos permitiram concluir que não há diferença na parasitemia entre o grupo tratado e o grupo tratado em meio contendo GAs (Figura 23).

Em ambos os grupos a parasitemia diminuiu significativamente em relação ao controle, ou seja, os parasitas não apresentaram recuperação em meio enriquecido com GAs, mais uma razão para acreditarmos que o parasita não possui uma via ativa para biossíntese de GA4 e GA3. Alternativamente, o parasita é inibido por INA e UNP em outros pontos do metabolismo ainda desconhecidos (*off target*), e a tentativa de suplementação com apenas giberelina não seria suficiente para sustentar um crescimento como parasitas não tratados.

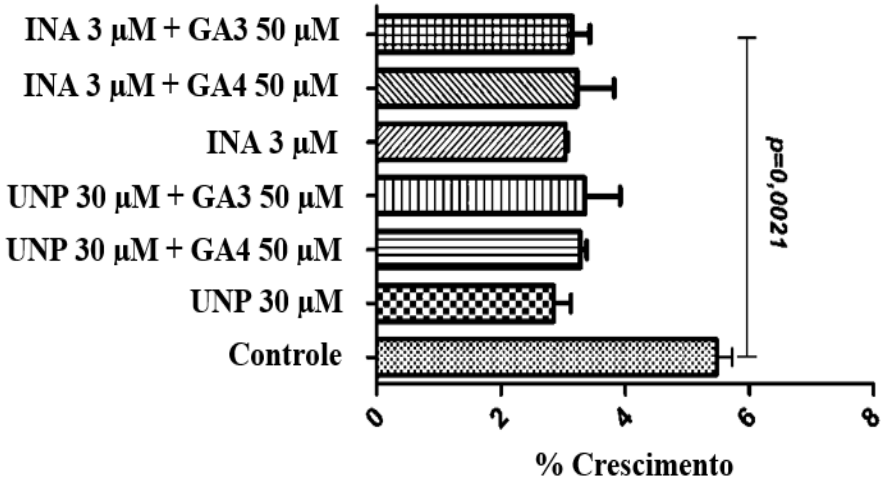

Figura 23 - Microteste de recuperação por Giberelina, com meio acrescido de 50 µM de GA3 ou GA4 em parasitas incubados com as IC_{50} das drogas INA (3,0 µM) e UNP (30 µM). A parasitemia diminui significativamente (Avaliado por Student' Teste t e p=0,0021) em relação a tratados e controle. Culturas acrescidas de giberelina e tratada com as drogas apresentaram mesma parasitemia de cultura tratada com as drogas em meio não enriquecido com GA3 ou GA4.
Fonte: Elaborada pela autora

As vias biossintéticas dos isoprenóides são complexas e existem vias paralelas para a biossíntese dos compostos que utilizam das unidades básicas de 5 carbonos. Uma grande

variedade de esteróis e terpenóides são sintetizados através de vias metabólicas isoprenóides de uma forma específica da espécie, embora todas as vias utilizem IPP como molécula de partida gerada na via do mevalonato ou via MEP. Sabe-se que os inibidores biossintéticos da giberelina bloqueiam outras enzimas que conduzem à produção de esteróis e terpenóides. Entretanto Toyama, et al., 2012 (104), analisou o *P. falciparum* tratado com INA por GC-MS e, não detectou quaisquer esteróis ou terpenóides além do colesterol derivado de eritrócitos humanos e também não observou diferenças significativas no nível de colesterol entre as amostras controle e as amostras tratadas com INA. Toyama, et al., 2012 (104) também verificou as seqüências de aminoácidos e as seqüências de domínio conservadas essenciais das enzimas necessária pra biossíntese de giberelina utilizando o PlasmoDB, mas não encontrou sequências com homologias significativas.

Tendo esgotado nossas possibilidades de detectar giberelina, assumindo que o parasita não produz GA4 e GA3 e sabendo que INA não inibe a biossíntese de colesterol por *P. falciparum*, já que, esta via não é ativa no parasita (131), resolvemos investigar se assim como outros antifúngicos, INA e UNP podem agir na via do heme ou na via do heme farnesilado.

6.2 O estudo da via do heme farnesilado e de possíveis inibidores dessa via

6.2.1 Um estudo *in silico* das enzimas candidatas a: farnesilação do heme e da biossíntese de heme A

O estudo filogenético molecular dos parasitas da malária, começou em 1991 (132) e o campo continua a crescer. As conclusões de muitos estudos anteriores, foram anuladas mais tarde, pois, foram afetadas por dificuldades decorrentes de insuficiência de amostragem de táxon e problemas com os genes escolhidos para análise. A escolha da taxa de *ingroup* (os organismos de interesse) e da taxa de *outgroup* (organismos fora do grupo de interesse) para a análise filogenética, pode ter uma influência significativa na força da hipótese evolutiva resultante. As filogenias mais antigas, continham frequentemente um pequeno número de espécies *ingroup*, entre seis e doze, que eram uma mistura de táxons muito próximos e alguns muito divergentes. Essa amostragem de táxons, é pobre para este gênero muito grande e diverso, e o uso de espécies muito distantes como *outgroups*,

provavelmente levam a alguns resultados espúrios e as conclusões conflitantes encontradas na literatura na época (132).

No genoma do *P. Falciparum,* identificamos genes que codificam homólogos das enzimas cox10 e da cox15, enzimas necessárias para a síntese de heme O e heme A. Um alinhamento da sequência encontrada em *P. falciparum* com as sequências de cox10 e cox15 de outras espécies foi realizado (Figura 24) bem como a árvore filogenética de cox15 e cox10 (Figura 25 e 26).

A sequência identificada no genoma de *P. falciparum* que codifica as enzimas HOS e HAS, compartilham mais de 60% de similaridade de aminoácidos com enzimas previamente caracterizadas de outros organismos.

O alinhamento das sequencias de cox10 e cox15 de algumas espécies, permitiu a observar muitos domínios conservados entre as espécies, um dado importante para acreditarmos que estas enzimas de *P. falciparum* desempenham papel de HOS e HAS. Através do alinhamento observamos que as regiões transmembra (TM) são conservadas entre as espécies alinhadas, isto é, verificamos as sequências nas regiões transmembranares potenciais: 7 foram identificadas em PF3D7_1435000 e são semelhantes a HOS de outros organismos e 8 identificadas em PF3D7_0519300 e são semelhantes a HAS de outros organismos (Figura 24).

Além disso, os resíduos considerados relevantes para a atividade catalítica de HOS e HAS foram conservados na sequência de *P. falciparum,* são eles : N196, R212, R216 e H317 (numeração de *S. cerevisiae*), que estão envolvidos na função da proteína HOS (130); H169, H245 e H393 (numeração de *S. cerevisiae*), que correspondem respectivamente a CtaA H60, H123 e H216 e estão envolvidos na função da proteína HAS (92,99) (Figura 24).

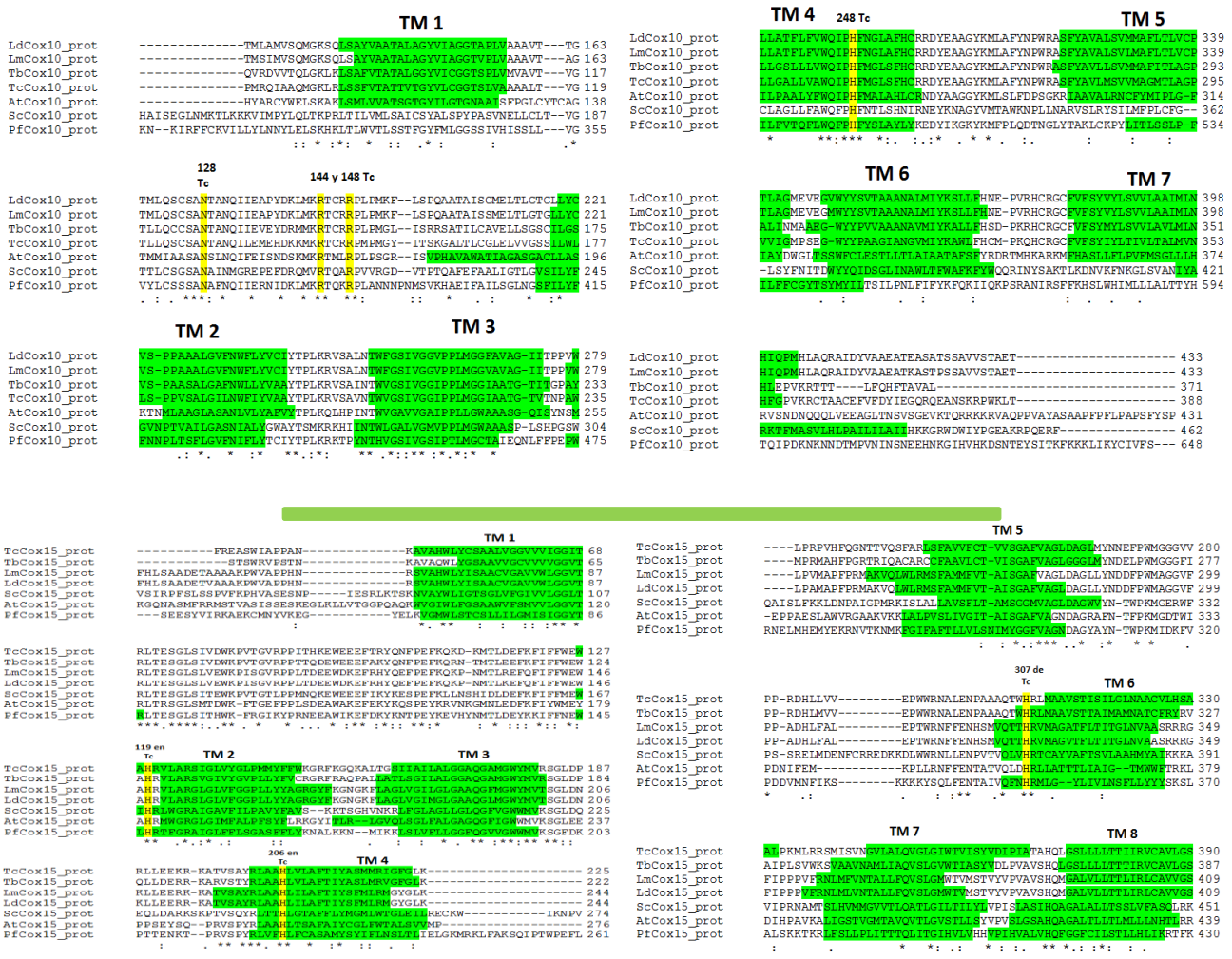

Figura 24 - Alinhamento de cox10 e cox15 de *T. cruzi, T. brucei, Leishmania, Saccharomyces cerevisiae, Arabidopsis thaliana* e *Plasmodium falciparum*, mostrando áreas conservadas. Em verde temos as regiões trasmembranas, cox10 apresenta 7 TM e cox15 8 TM, e em amarelo os resíduos conservados que estão envolvidos na função das proteínas HOS e HAS.
Fonte: Elaborada pela autora.

Após o alinhamento foi possível obter as árvores filogenéticas (Figura 25 e 26), através dessas podemos notar a relação evolutiva entre sequências que codificam HOS e HAS de diferentes organismos. As árvores mostram a proximidade de *Plasmodium* com outros apicomplexas, e uma estreita relação entre as enzimas HOS e HAS de *P. falciparum* e *S. cerevisiae.* Esse dado é importante, já que, cox10 e cox15 de *S. cerevisiae* foram caracterizadas e essas codificam HOS e HAS respectivamente, sugerindo que PF3D7_1435000 e PF3D7_0519300 codificam HOS e HAS, respectivamente, em *P. falciparum*.

Comparando as árvores obtidas no nosso estudo e a árvore filogenética da evolução de *Plasmodium* (133), conseguímos notar a semelhança de proximidade entre espécies de

Plasmodium das árvores filogenéticas de cox10 e cox15, com a proximidade entre espécies de *Plasmodium* da sárvore da evolução, por exemplo, *berghei* e *yoelii* estão menos distantes de *vivax* e *knowlesi* do que de *falciparum* tanto nas árvores de cox10 e 15 como na árvore da vida (133).

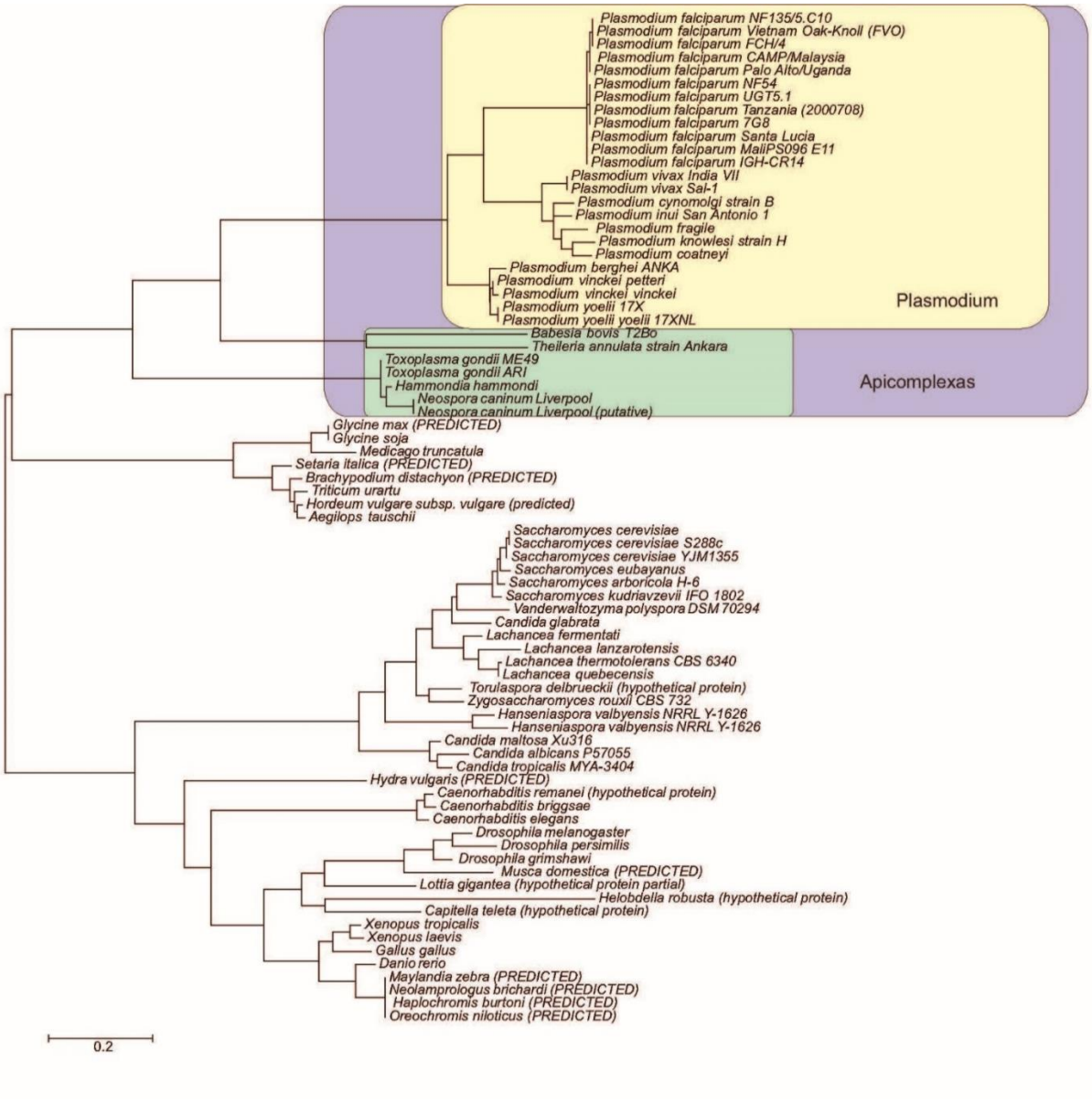

Figura 25 - Árvore filogenética de cox10 mostrando relações evolutivas da enzima entre vários filos e gêneros. Em destaque podemos observar a proximidade de *Plasmodium* com outros apicomplexas e com *S. cerevisiae*.

Fonte: Elaborada pela autora.

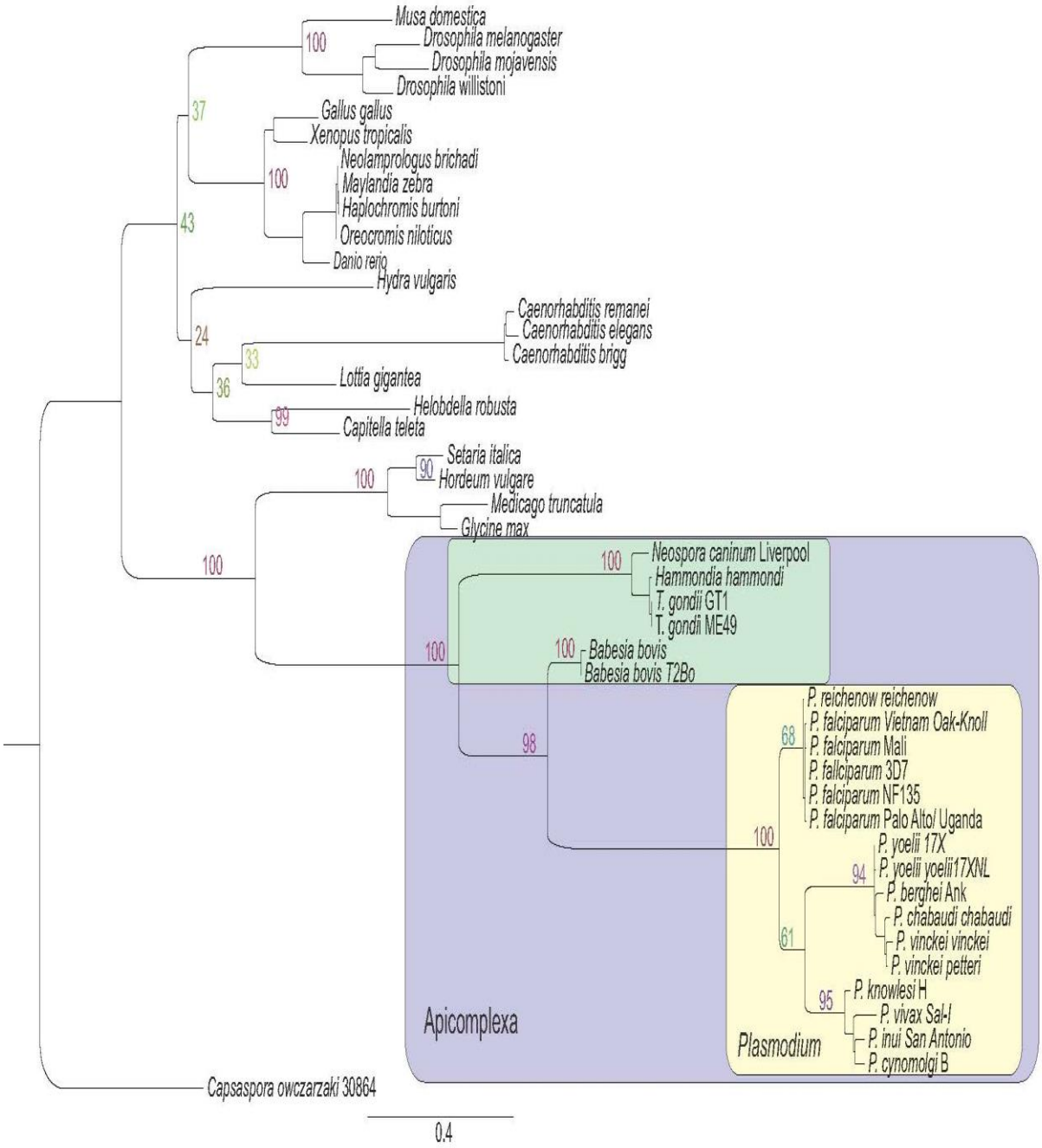

Figura 26 - Árvore filogenética de cox15 mostrando relações evolutivas da enzima entre vários filos e gêneros. Em destaque podemos observar a proximidade de *Plasmodium* com outros apicomplexas e com *S. cerevisiae*.
Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados obtidos pelos ensaios *in silico* de cox10 e cox15 de *P. falciparum*, indicam que estas são fortes candidatas a codificarem enzimas com atividade HOS e HAS, sendo assim, iniciamos a caracterização de heme O e heme A no parasita.

6.2.2 Identificação dos hemes em *P. falciparum* por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC)

Para a padronização de um sistema para detecção de hemes por RP-HPLC, foram testadas as condições descritas por Brown et al., 2002(93). O produto referência utilizado é a Deuteroporfirina IX. Na Figura 27, o sistema mostra um pico que pode corresponder ao produto referência já que, apresenta uma saturação na Figura 27 A, visualizada por um platô da curva no tempo de retenção de 8 minutos, e não na Figura 27 B quando injetamos uma concentração menor do produto referência.

Vimos que era necessária uma alteração no sistema de gradiente para distanciar ao máximo o pico de Deuteroporfirina IX do pico de injeção, passamos a utilizar o gradiente de 10% a 90% de solução 0,1% TFA com o fluxo de 0,5%/minuto. Com a utilização do sistema modificado, observamos além do pico de injeção um pico no tempo de retenção de 17-18 minutos, indicando que este pode corresponder ao produto referência (Figura 27 B).

Após verificar e modificar o sistema gradiente de RP-HPLC com o produto referência, iniciamos a padronização com heme O extraído de *E. coli* (cedido por Dra. Julia Cricco). Utilizando o sistema modificado de RP-HPLC, observamos no tempo de retenção de 27 minutos o pico que pode corresponder ao extrato de heme O (Figura 27 C).

Por fim, a Deuteroporfirina IX foi injetada no sistema RP-HPLC juntamente com o heme O extraído, apresentando picos nos tempos de retenção 19 e 30 minutos, picos estes que podem corresponder aos produtos injetados (Figura 27 D).

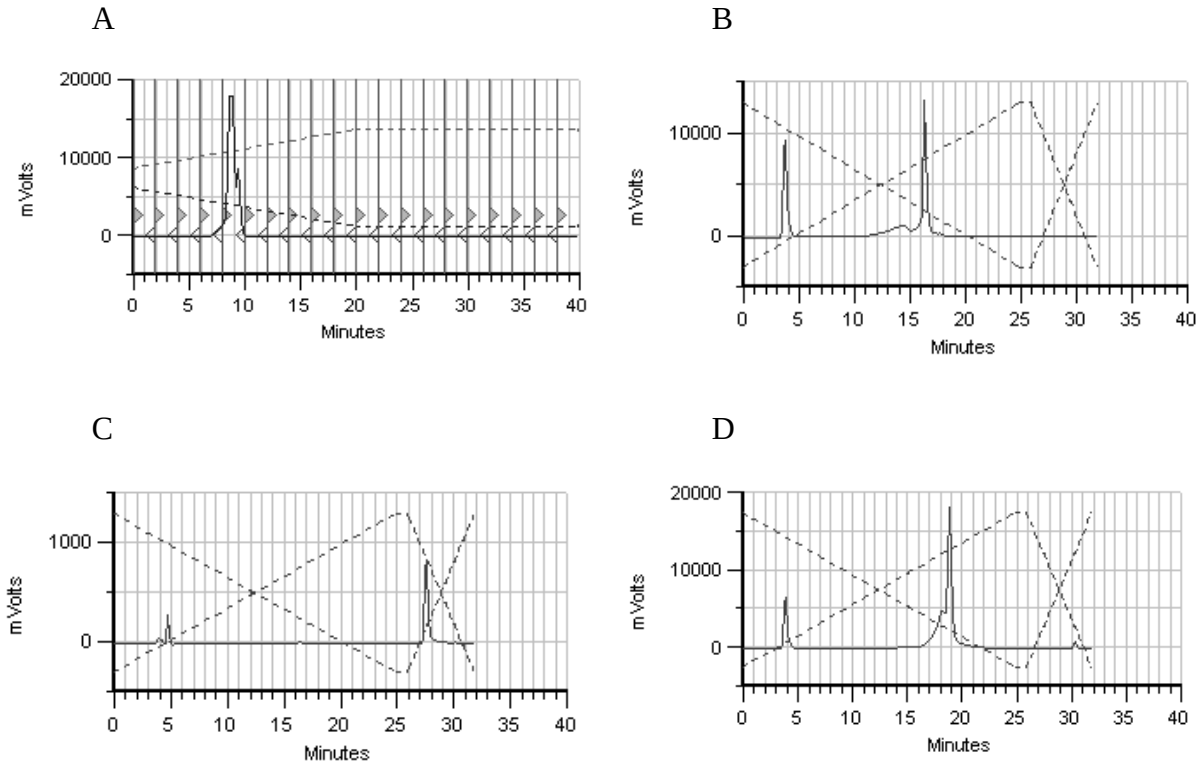

Figura 27 - Cromatografia realizados por RP-HPLC para o produto referência, Deuteroporfirina IX, e heme O extraído. (A) Reprodução do sistema descrito por Brown et al., 2002, para o produto referência tempo de retenção 10 minutos. (B) Sistema modificado, para o produto referência, tempo de retenção 16 minutos. (C) Sistema modificado, para o extraído de heme O, tempo de retenção 27 minutos. (D) Sistema modificado, para o produto referência e para o extraído de heme O, tempos de retenção 19 e 30 minutos respectivamente.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com o sistema de RP-HPLC e de extração para o produto referência e para heme O padronizados, poderíamos dar continuidade a caracterização de hemes em *P. falciparum*, entretanto, não tínhamos heme O suficiente para mais experimentos e esse não é um produto comercial. Sendo assim, foi necessário preparar heme O.

6.2.3 Preparação de heme O padrão

Para preparar heme O padrão, utilizamos bactérias BL21 transformadas com plasmídeo pet9a/ctb cedido por John Wright. Para a extração de heme O de bactérias transformadas, desenvolvemos uma metodologia em colaboração com John Wright, descrito em 5.3 e 5.11.

A utilização da coluna Sep-Pak® C18 em extrato de bactéria para separação de heme O e a análise por espectrometria de massas resultou num espectro sem grandes impurezas (Figura 28). A fração eluída da coluna com ACN 80%, resultou na separação de

heme B (Figura 28 A) e a fração eluída com DMSO, resultou na separação de heme O (Figura 28 B).

A análise dos espectros obtidos por espectrometria de massa, apresenta em destaque a presença de heme B e heme O nas frações eluídas com ACN 80% e DMSO, tal análise nos permitiu concluir que a separação pela coluna Sep-Pak C18, tanto para heme B como para heme O, é bem específica (Figura 28).

Decidimos utilizar a metodologia que envolve a coluna Sep-Pak C18 ao invés da metodologia que utiliza o RP-HPLC, isso devido a especificidade do método, praticidade e por não precisar co-injetar padrão com as amostras. Sendo assim, para parasitas marcados metabolicamente, utilizamos a metodologia de extração e separação desenvolvida.

Como o uso da coluna Sep-Pak C18 permite a separação de heme B e heme O em frações diferentes, foi possível utilizar precursores da formação de hemes ([^{14}C]-glicina) e precursor específico da formação de heme O ([^{3}H]-FPP). Desta forma, é possivel analisar a biossíntese de heme B e heme O desde a ligação da glicina ao succinil-CoA e também a farnesilação do heme.

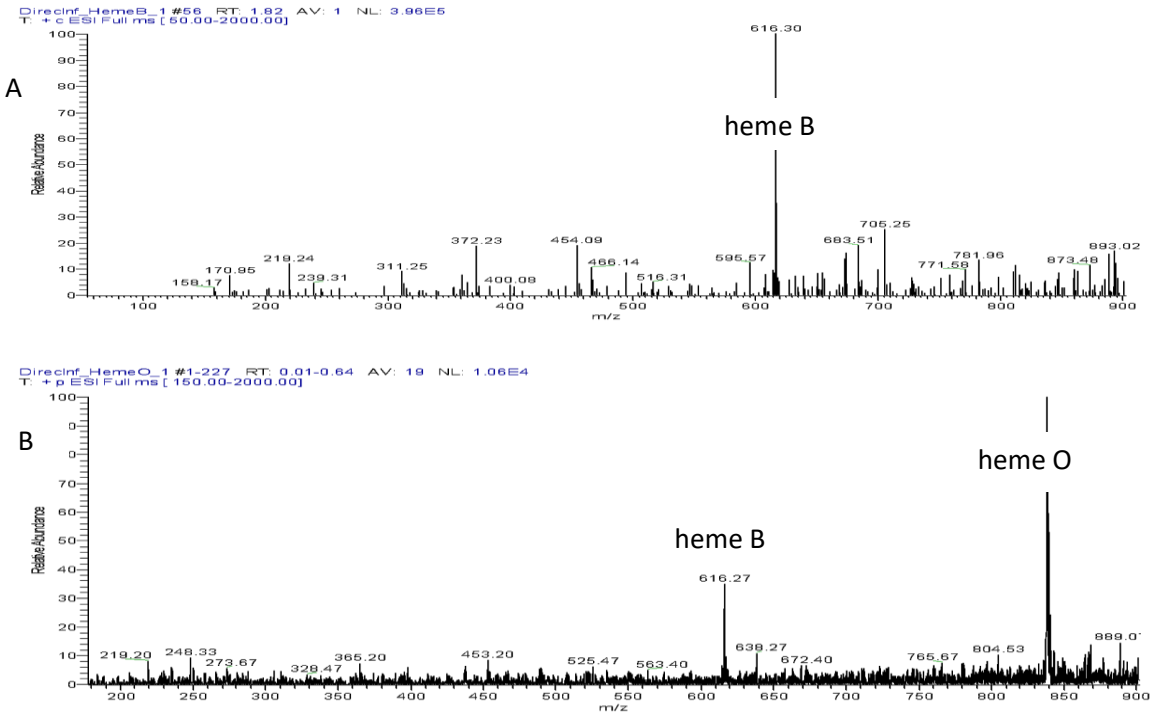

Figura 28 - Espectro de massa de extrato de bactérias pet9a/ctb separada pela coluna Sep-Pak C18. Em A, a fração eluída por ACN 80% que separou o produto heme B (616,30 Da). Em B, a fração eluída por DMSO, que separou o produto heme O (840 Da). Note em B, que pequenas quantidades de heme B eluem também com DMSO (616 Da). Ambos correspondem ao espectro obtido por Brown et al., 2002 (93).
Fonte: Elaborada pela autora

Tendo padronizado uma metodologia de extração, separação por coluna Sep-Pak C18 e análise por espectrometria de massa dos produtos heme B e heme O, iniciamos a caracterização destes em *P. falciparum*, utilizando marcação metabólica com precursores da formação de hemes.

6.2.4 Marcação metabólica para verificar a biossíntese heme B e heme O por *P. falciparum*

A princípio a identificação do heme O ocorreu por marcação metabólica com [^{3}H]-FPP (precursor direto da formação de heme O) e com [U-^{14}C]-glicina (precursor inicial da via heme).

A partir de culturas marcadas com os precursores radioativos, os parasitas foram purificados por coluna magnética e foi realizada a extração com acetona ácida, e separação de heme B e heme O por coluna Sep-Pak C18. As frações obtidas da coluna foram analisadas conforme a intensidade radioativa medida em c.p.m. (Figura 29). Como controle utilizamos o mesmo volume de eritrócitos não parasitados, estas passaram pelas mesmas condições que o extrato de parasita.

Segundo a análise da radioatividade da fração eluída com DMSO, da qual obtemos heme O, as quantidades de c.p.m. obtidas são consideráveis em relação aos eritrócitos não parasitados, isso para culturas marcadas com [^{3}H]-FPP ou [U-^{14}C]-glicina (Figura 29). Já com a fração eluída por ACN 80%, fração da qual obtemos heme B, a quantidade de c.p.m. só é considerável na marcação com [U-^{14}C]-glicina. Assim, a análise dos produtos, heme B e heme O, marcados com os dois precursores diferentes nos permite afirmar que há uma incorporação dos radioativos pelo parasita para a formação de heme B e heme O (Figura 29). Para confirmação do resultado obtido por marcação metabolica, um extrato de parasita não marcado e purificado pela coluna de afinidade Sep-Pak® C18, foi analisado por espectrometria de massa.

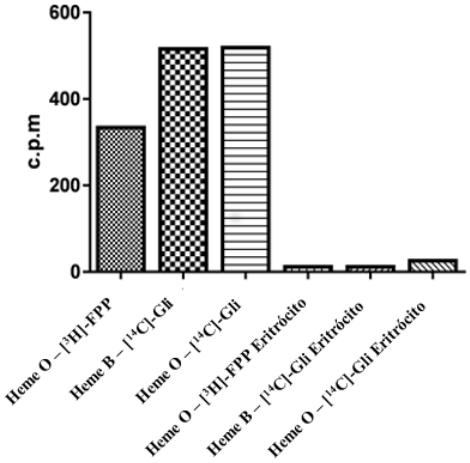

Figura 29 - Biossíntese de heme O por *P. falciparum*.. Eritrócitos parasitados e eritrócitos não parasitados marcados com [^{3}H]-FPP ou com [U-^{14}C]-glicina, purificado por coluna de afinidade e analisado por um cintilador. A Figura mostra que: a fração eluída por ACN 80%, que separa heme B, apresenta incorporação radioactiva de glicina; E a fração eluída por DMSO, a partir da qual obtemos heme O, apresenta incorporação radioactiva para ambos os precursores radioactivos. Heme O- [^{3}H]- FPP: extrato de eritrócitos parasitados marcados com [^{3}H] - FPP e eluído com DMSO; Heme B- [^{14}C] - Gli: extrato de eritrócitos parasitados marcados com [U-^{14}C]-glicina e eluído com ACN 80%; Heme O- [^{14}C] Gli: extrato de eritrócitos parasitados marcados com [U-^{14}C]-glicina e eluído com DMSO; Heme O- [^{3}H] FPP Eritrócitos: extrato de eritrócitos marcado com [^{3}H] -FPP e eluídos com DMSO; Heme B- [^{14}C] Gli Eritrócitos: extrato de eritrócitos marcados com [U-^{14}C] –glicina e eluído com ACN 80%; Heme O- [^{14}C]-Gli Eritrócitos: extrato de eritrócitos marcados com [U-^{14}C]-glicina e eluído com DMSO.
Fonte: Elaborada pela autora

Durante os experimentos para caracterizar a produção de heme O em *P. falciparum*, confirmamos também a via de biossintética para heme B, o que podemos considerar como um controle positivo. A razão pela qual o parasita ainda apresenta a via do heme B ativa no estágio assexuado é intrigante, já que, o heme B não é essencial para o parasita no estágio assexuado de acordo com Ke et al., 2014 (134), além do fato da quantidade de heme B biossintetizada pelos parasitas ser muito menor do que o heme produzido via digestão de hemoglobina.

Talvez o *P. falciparum* precise manter a via do heme B ativa, devido a, esta ser essencial para a biossíntese de heme farnesilado, já que, heme O e heme A são essenciais para os organismos vivos que dependem de mitocôndria, para produção de ATP, pois, heme O e heme A fazem parte da formação do complexo IV da cadeia de respiração mitocondrial.

Outra possibilidade é que o heme oriundo de hemácia não possa ser transportado para fora do vacúolo digestivo devido ao complexo Fe^{2+}, que é tóxico demais para um transportador. Entretanto, em um estudo, sobre o papel das fontes de heme no crescimento e desenvolvimento do parasita da malária, no qual foi realizado um *knockout* dos genes que codificam a primeira enzima (ALAS) e a última enzima (FC) da via de biossíntese do heme em *Plasmodium berghei*, foi possível observar que os parasitas de tipo selvagem e *knockout*

apresentaram padrões de crescimento intraeritrocitários semelhantes em camundongos (61).

O mesmo estudo realizou marcação metabólica de heme *in vitro* (reticulócitos de ratos infectados com *P. berghei* e eritrócitos humanos infectados com *P. falciparum*) utilizando 5-ALA, e verificou que os parasitas incorporavam tanto o heme derivado da digestão de hemoglobina, quanto o heme sintetizado pelo parasita para a formação de hemozoina e de citocromos mitocondriais. Os destinos semelhantes das duas fontes de heme sugerem que podem servir como mecanismos de "backup" para fornecer heme no estágio intraeritrocitários (61).

Para confirmar a presença de heme O no estágio intraeritrocítico do parasita, realizamos um estudo de espectrometria de massas na amostra eluída com DMSO da coluna de afinidade, esta corresponde a fração na qual é possível detectar a massa de heme O.

6.2.5 Espectrometria de Massa em extrato de parasita para verificar a presença de hemes

Para confirmação da presença de heme O em P. *falciparum*, analisamos um extrato de parasita não marcado, após a extração com acetona ácida e separação pela coluna Sep-Pak® C18, por espectrometria de massa. Tal análise, foi realizada assim como à analise que realizamos no extrato de bactérias, ou seja, a mesma metodologia aplicada para obter heme O de bactérias foi utilizadada para obter heme O de parasita.

Para análise de heme O obtido de extrato de parasita, realizamos duas técnicas diferentes de espectrometria de massas, para isso, desenvolvemos um método de LC-MS, como descrito em 4.30.1, ajustamos o equipamento para realizar um experimento com o íon do produto com massa 839 m/z, como mostrado na Figura 30 B. O espectro apresentado é extraído do pico com tempo de retenção 11,58 e os dois produtos iônicos mais intensos são 737 m/z e 671 m/z.

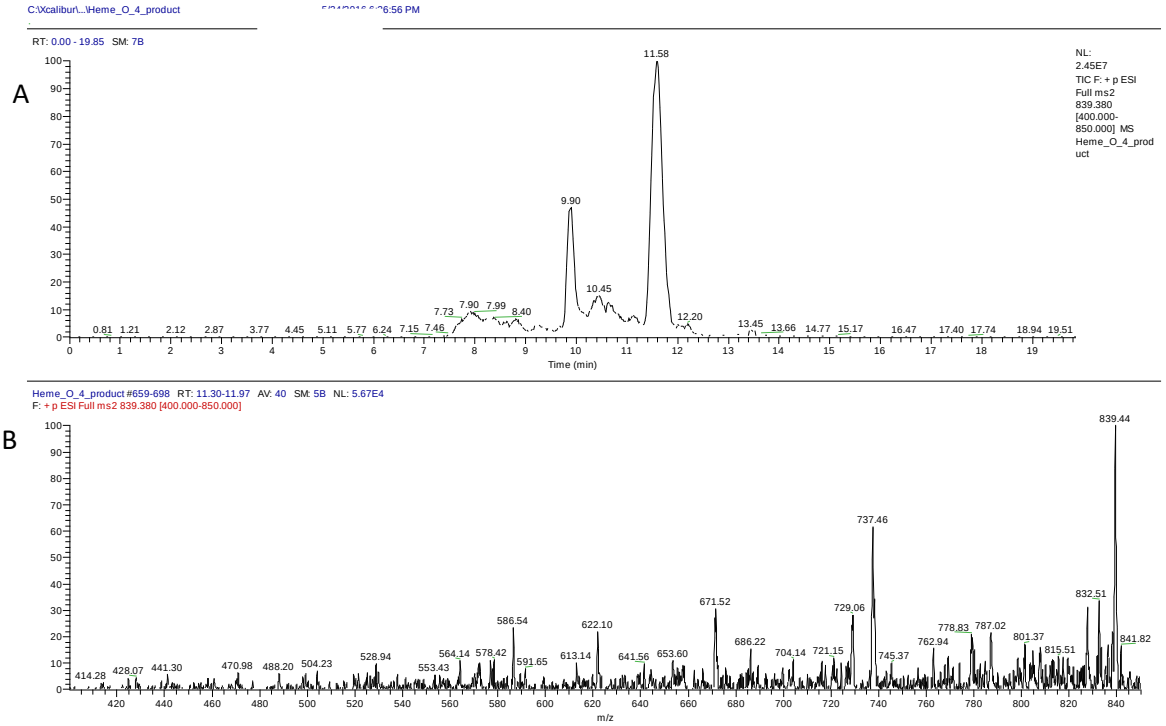

Figura 30 - Análise LC / MS de extratos de parasitas, heme O foi separado por coluna Sep-Pak C18 e eluído com DMSO, (A) mostra o pico de 11,58 min e (B) mostra análise do pico 11,58 que apresentou heme O, mostrando o m/z de heme O (839.405, compatível com a sua massa calculada).
Fonte: Elaborada pela autora.

Complementarmente, foi realizada uma análise MALDI-TOF/TOF, Figura 31. Neste espectro, o íon 839 m/z também está presente, confirmando a presença de heme O na amostra de extrato de parasita. É importante mencionar que utilizamos dois tipos diferentes de instrumentos e, consequentemente, dois métodos de ionização diferentes, o Electrospray (ESI) para o método LC-MS/MS e o MALDI. Além disso, o padrão de fragmentação é diferente nesses instrumentos, razão pela qual temos diferentes produtos iónicos (135) para o mesmo íon 839 m/z de heme O.

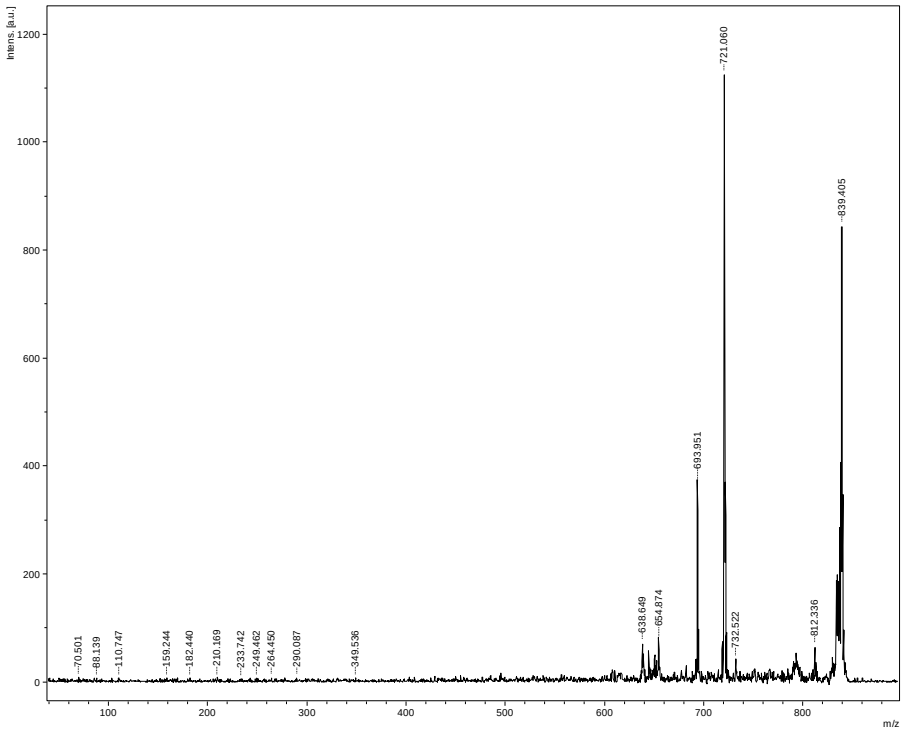

Figura 31 - Análise MALDI-TOF/TOF de extratos de parasitas, hemes foram separados por coluna Sep-Pak C18 e eluídos com ACN a 80% e DMSO, respectivamente, para separar os produtos heme B e O, mostrando um pico com a massa de 839.405 compatível com heme O.
Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, utilizamos um software, Mass Frontier (Thermo Scientific TM), para prever as possíveis estruturas para os produtos iônicos obtidos a partir de íons 839 m/z, na Figura 32.

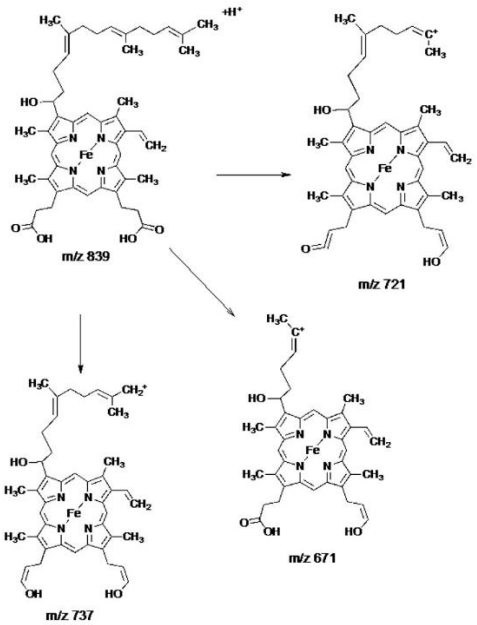

Figura 32 - Estruturas dos íons de produto heme O obtidas por software, Mass Frontier (Thermo Scientific TM).
Fonte: Elaborada pela autora.

Como heme O não pode ser obtido do hospedeiro pela digestão de hemoglobina, como ocorre com heme B, após a análise do extrato de parasitas por espectrometria de massas e dos dados obtidos pela marcação metabólica, podemos confirmar a biossíntese de heme O por *P. falciparum.*

Sabendo que o parasita tem uma via ativa de biossíntese para hemes e não tendo encontrado uma via de biossíntese de giberelina, resolvemos investigar se as drogas INA e UNP, interferem na síntese de heme B e/ou heme O.

Outra razão, que nos levou a investigar se as drogas tem relação com o heme, é que INA e UNP são antifúngicos e alguns azoles tem ação antimalárica. A griseofulvina (um inibidor do crescimento *P. falciparum* no estágio intraeritrocítico *in vitro*), por exemplo, é um antifúngico usado para tratar infecções dermatófitas, e tem um efeito secundário de induzir a produção de N-metil protoporfirina IX (N-MPP), sendo o N-MPP é um potente inibidor da enzima ferroquelatase (importante enzima na via de biossíntese de heme) essa droga inibi o crescimento do parasita (136). Outros antifúngicos com ação antimaláricas, azoles, também o mecanismo de ação relacionado com o heme.

Primeiramente, realizadomos um teste em colaboração com Dr. Gerardo Cebrián Torrejón e com o Prof. Dr. Antonio Doménech Carbó do Departamento de Química Analítica, Faculdade de Química, Universidade de Valencia na Espanha. Dr. Gerardo e o Prof. Dr. Antonio realizaram a parte do experimento que envolvia eletroquímica em um experimento de oxido-redução. Este teste eletroquímico teve como objetivo analisar o comportamento de oxido-redução das amostras de parasitas de *P. falciparum* antes e após o tratamento com as duas drogas: INA 2,0 µM e UNP 20 µM[iii] concentração menor que a IC_{50}.

O teste do comportamento de oxido-redução dos eritrócitos não parasitados e tratados com INA e UNP apresentaram características típicas de eritrócitos não infectados, enquanto que as amostras de eritrócitos infectados e tratados com INA e UNP apresentaram voltamogramas que diferem dos eritrócitos infectados não tratados para os tratados (anexo 1). Com os resultados obtidos em Valencia, concluimos que INA e UNP interferem na via

---

[iii] As concentrações estão abaixo da IC_{50} ideal para ver diminuição da parasitemia, entretanto, esta redução permite a realização do experimento por manter um número adequado de parasitas viáveis.

heme bloqueando a síntese do heme O e que este mecanismo causa diminuição da parasitemia (dados detalhados no anexo 1).

6.2.6 INA e UNP inibem a biossíntese de heme O

Para confirmar se as drogas INA e UNP estão agindo na via de biossíntese de heme O, como demonstrou o teste eletroquímico que analisa o comportamento de oxido-redução (anexo 1), tratamos os parasitas com ambas as drogas, INA 2,0 µM e UNP 20 µM [iv], por 48 horas, e nas últimas 16 horas adicionamos os precursores radioativos [^{14}C]-glicina ou [^{3}H]-FPP no meio de cultura de parasitado. Após o tratamento e a marcação metabólica, realizamos a extração com acetona/HCl (95:5) e separação dos hemes por colunas Sep-Pak C18 para identificar heme B e heme O. Assim, conforme a análise feita da incorporação dos radioativos e sua quantificação, é possível mostrar se as drogas agem na via de biossíntese do heme.

As marcações metabólicas com os precursores radioativos em conjunto com o tratamento com INA ou UNP (Figuras 33 e 34), mostram que: não há uma redução da biossíntese de heme B; e há uma redução significativa da biossíntese de heme O na presença de ambas as drogas e com ambos os precursores. Estes resultados indicam que o declínio da parasitemia de cultura tratada com INA e UNP pode estar de fato relacionado inibição da biossíntese de heme O, confirmando o verificado por Dr. Gerardo e o Prof. Dr. Antonio no teste de oxido-redução (anexo 1).

[iv] As concentrações estão abaixo da IC_{50} ideal para ver diminuição da parasitemia, entretanto, esta redução permite a realização do experimento por manter um número adequado de parasitas viáveis.

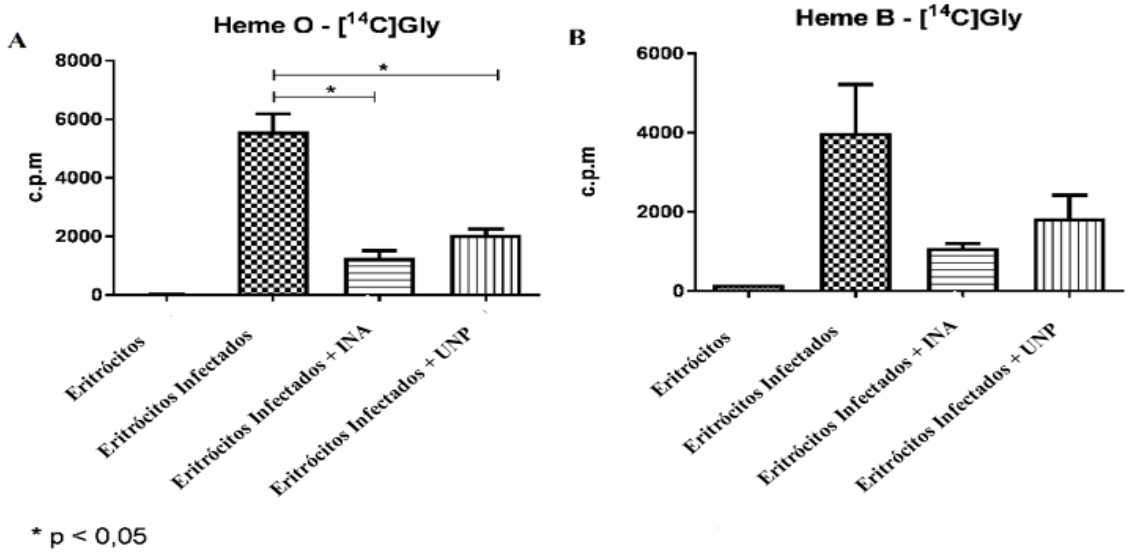

Figura 33 - Inibição da biossíntese de heme O em parasitas tratados durante 48h com INA ou UNP. Culturas de *P. falciparum* tratadas com INA 2,0 µM ou UNP 20 µM e marcadas com [U-^{14}C]-glicina. O extrato de esquizontes marcados foi analisado por colunas Sep-Pak C18. (A) heme O detectado em parasitas não tratados (Eritrócitos Infectados), em parasita tratado com INA (Eritrócitos Infectados + INA) que mostrou inibição de 76% ($p < 0,05$) e em parasita tratado com UNP (Eritrócitos Infectados + UNP) com inibição de 64% ($p < 0,05$), Eritrócitos: eritrócitos não infectados; (B) o heme B em parasitas não tratados (Eritrócitos Infectados), em parasita tratado com INA (Eritrócitos Infectados + INA) com inibição de 75% e, em parasita tratada com UNP (Eritrócitos Infectados + UNP) com inibição de 54%. Não foram observadas diferenças significativas na inibição do heme B, Erythrocytes: eritrócitos não infectados. Avaliado por Student' Teste t.

Fonte: Elaborada pela autora.

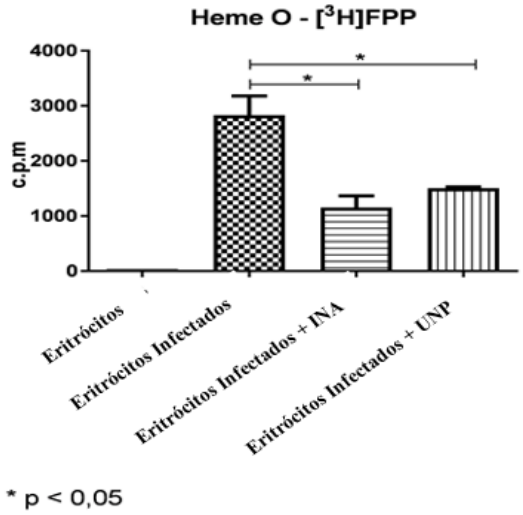

Figura 34 - Inibição da biossíntese de heme O em parasitas tratados durante 48h com INA ou UNP. Culturas de *P. falciparum* tratadas com INA 2,0 µM ou UNP 20 µM e marcadas com [^{3}H] -FPP. O extrato de esquizontes marcados foi analisado por coluna Sep-Pak C18. Heme O foi detectado em parasitas não tratados (Eritrócitos Infectados), no parasita tratado com INA (Eritrócitos Infectados + INA) com inibição de 58% ($p < 0,05$) e no parasita tratado com UNP (Eritrócitos Infectados + UNP) com inibição de 52,5% ($p < 0,05$), Eritrócitos: eritrócitos não infectados. Avaliado por Student' Teste t.

Fonte: Elaborada pela autora.

O fato das drogas não inibirem a biossíntese de heme B e deste produto não ser o alvo de INA e UNP, confirma que as diferentes fontes de heme para o parasita (61) são

utilizadas na fase intraeritrocítica. Ou seja, inibir a biossíntese de heme B, não levaria a uma diminuição da parasitemia devido ao *backup*, heme B da digestão de hemoglobina.

Outra conclusão é que caso as drogas inibissem a polimerização do heme-livre impedindo a formação de hemozoína o parasita ainda poderia biossintetizar heme farnesilado, o que não ocorre. Ou seja, diferente do que ocorre com outros antimaláricos a droga não parece estar interrompendo a formação de hemozína.

Como o heme O está relacionado com o complexo IV da cadeia respiratória da mitocôndria, decidimos verificar se os inibidores, em 24 horas, alteram o potencial de mitocôndria dos parasitas.

6.2.7 Potencial de mitocôndria na presença de Inabenfide e Uniconazol-P

Para verificar se as drogas INA e UNP interferem no potencial de mitocôndria, iniciamos um estudo de potencial de mitocôndria que emprega uma metodologia de incorporação de JC-1. JC-1 é um corante catiônico carbocianina que se acumula nas mitocôndrias. O corante existe como um monómero em baixas concentrações e produz fluorescência verde, o acumulo do corante na mitocôndria forma J-agregados que exibe fluorescência vermelha. Estas características fazem JC-1 um marcador sensível para o potencial de membrana mitocondrial. Assim, essa técnica permite a visualização em tempo real de parasitas viáveis (coloração vermelha) e/ou não viáveis (ausência de coloração vermelha). Os experimentos foram realizados *in vitro* como descrito em Pasini et. al., 2013 (137).

Para padronização da concentração de JC-1 em cultura de *P. falciparum*, utilizamos diferentes diluições do JC-1 e JC-1 em cultura tratada com um potente desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, o fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona FCCP, assim, teríamos um controle positivo, uma droga que afeta diretamente a mitocôndria. A análise das amostras foi realizada por citometria de fluxo no aparelho Guava EasyCyte Plus.

Na padronização, utilizamos cultura de: hemácias parasitadas sem JC-1; hemácias parasitadas com diferentes concentrações de JC-1 (4 µM, 2 µM, 1 µM, 0,5 µM e 0,25 µM); hemácias parasitadas tratadas com 100 µM de FCCP mais 4 µM e 2 µM de JC-1. A melhor concentração de JC-1 obtida foi de 2 µM como mostra a Figura 35.

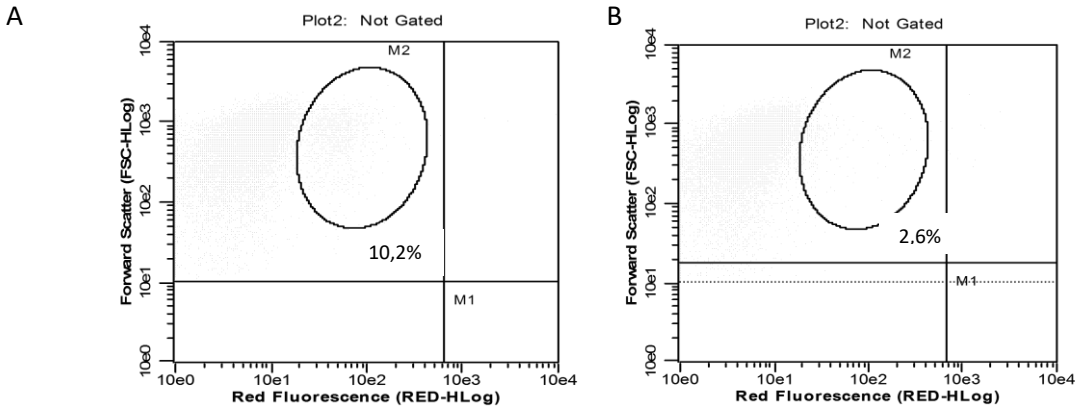

Figura 35 - Análise por citometria de fluxo da concentração de (A) 2 µM de JC-1 e (B) 2 µM de JC-1+ 100 µM FCCP.
Fonte: Elaborada pela autora.

Após encontrar a melhor concentração de JC-1, analisamos culturas tratadas com a droga INA por microscopia de fluorescência (Figura 36), assim pudemos confirmar a presença de parasitas que apresentaram o potencial de mitocôndria e a diluição de JC-1.

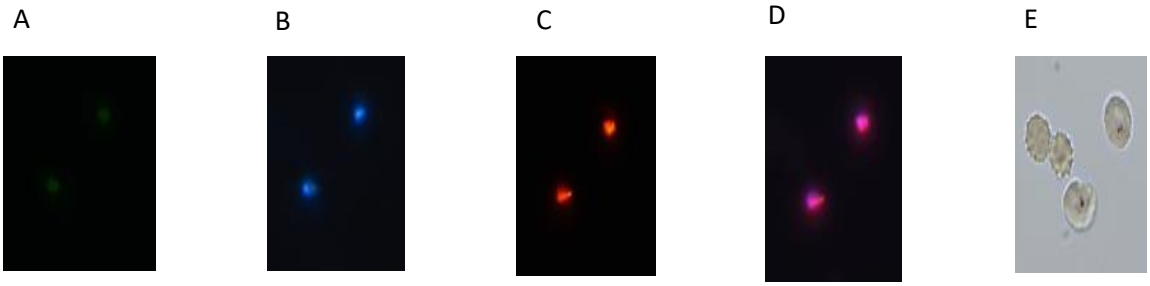

Figura 36 - Hemácias parasitadas tratadas com INA 2,0 µM e incubadas com JC-1 e Hoechst. A- mostra o JC-1 como monômero; B- marcação com Hoechst que intercala DNA; C- JC-1 vermelho indica o funcionamento da mitocôndria; D- sobreposição das fotos A,B e C; E- eritrócitos parasitados. As fotos foram produzidas com o microscópio Zeiss AXIO Imager.M2.
Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 37, parasitas tratados com INA e UNP por 48 horas aparentemente apresentam uma redução dose dependente da incorporação de JC-1, entretanto, a diminuição pode ser acionada pela interferência das drogas no funcionamento da mitocôndria ou pela morte do parasita. Como não observamos maior concentração do monômero JC-1, analisando a fluorescência verde, acreditamos que a droga pode realmente interferir no potencial de mitocôndria (dados não mostrados).

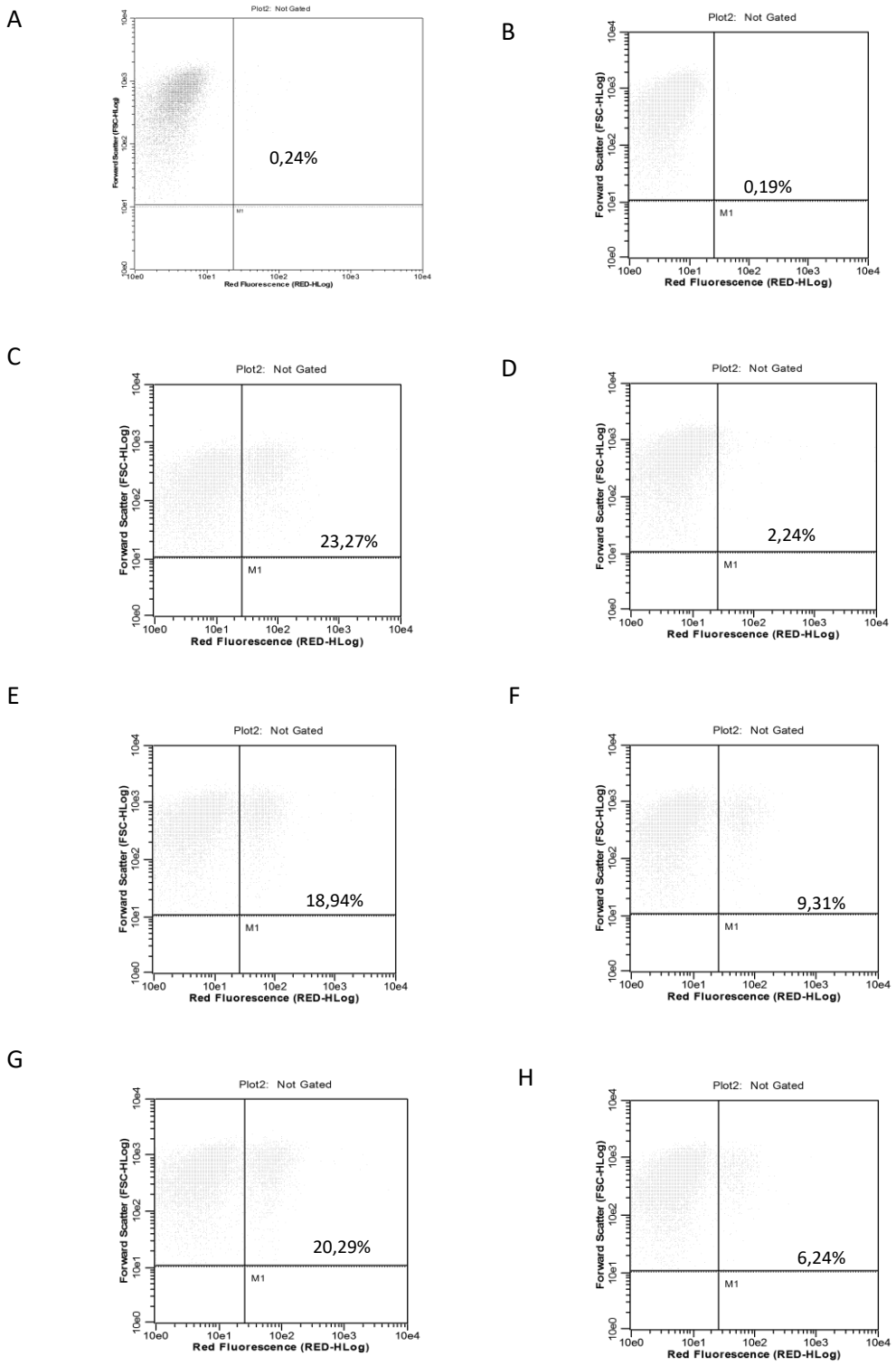

Figura 37 - Diminuição no potencial de mitocôndria dos parasitas tratados por 48 horas. Quadrante superior direito: hemácias não parasitadas e quadrante superior esquerdo: hemácias parasitadas. A- hemácias não parasitadas; B- hemácias sem JC-1; C- hemácias parasitas com JC-1; D- hemácias parasitas com JC-1 e CLQ 5 nM; E- hemácias parasitas com JC-1 e INA 2,0 µM; F- hemácias parasitas com JC-1 e INA 5,0 µM; G- hemácias parasitas com JC-1 e UNP 25 µM; H- hemácias parasitas com JC-1 e UNP 50 µM. Esse estudo mostrou uma relação dose-dependente para diminuição da parasitemia, visto que, em concentrações menores das drogas a diminuição da parasitemia é menor do que a detectada em concentrações maiores das drogas.

Fonte: Elaborada pela autora.

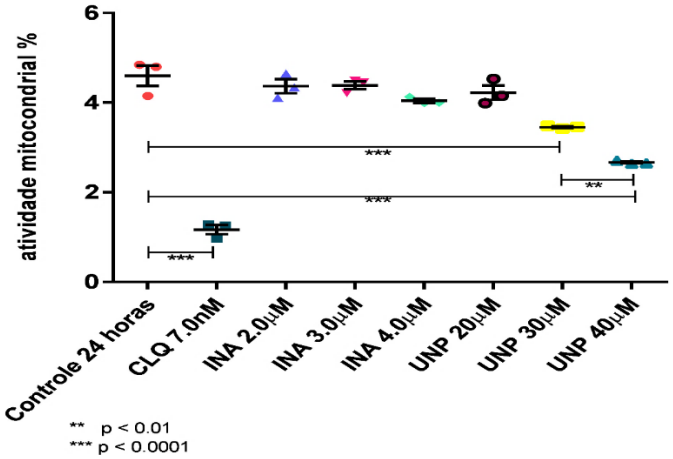

Figura 38 - Análise estatística de tratados com INA, UNP e cloroquina (CLQ), incubados com JC-1 e analisados no citômetro Facscalibur e o programa Cellquest pro, versão 5.2 (t-Student). Em 24 horas observamos diferença significativa em relação ao controle e: CLQ (cloroquina) 7,0 nM, e UNP 30 e 40 µM. Também observamos diferença significativa entre UNP 30 e 40 µM, mostrando dose dependência. Avaliado por Student' Teste t.
Fonte: Elaborada pela autora.

Parasitas tratados com as drogas INA e UNP apresentam a IC_{50} em 48 horas, INA 3,0 µM e UNP 30 µM. Entretanto, nas primeiras 24 horas, UNP e a cloroquina mostram um decréscimo na função mitocondrial em relação ao controle, esse dado e fato de UNP estar relacionada a diminuição de heme O (um componente crítico da cadeia de respiração mitocondrial) nos leva a concluir que a droga está agindo no potencial da mitocôndria (Figura 36).

Como foram obtidos resultados positivos em relação à droga e a diminuição de parasitemia (observado através da relação de INA e UNP com a diminuição da formação do heme O e da diminuição do potencial de mitocôndria), achamos válido testar ao menos uma das drogas *in vivo*.

6.2.8 Estudo *in vivo* de INA

Para iniciarmos o estudo *in vivo*, levamos em consideração que INA possui uma concentração para IC_{50} menor do que a UNP, por isso, apenas INA foi utilizada nos experimentos *in vivo*.

A droga INA foi testada *in vivo* em camundongos Balb/c machos infectados com a cepa *P. berghei* ANKA GFP (PbGFP) (Figura 39). A parasitemia de todos os animais, foi acompanhada em dias pré-definidos e determinada usando o Facscalibur e o programa Cellquest pro versão 5.2.

Analisando os resultados obtidos por citometria de fluxo, não visualizamos diminuição da parasitemia e nem aumento da sobrevida após tratamento. Muitas vezes as drogas funcionam *in vitro* e não *in vivo,* uma das explicações é o metabolismo do hospedeiro, entretanto isso não significa que tal droga deva ser descartada, e sim que um estudo químico para possíveis modificações estruturais de tal molécula deve ser realizado.

Um estudo sobre o metabolismo de INA em ratos mostrou que a excreção urinária e fecal da droga e de seus metabólitos é de 21% e 32% da dose, respectivamente, 24 horas após a administração. Há também a possibilidades de que outros metabólitos estejam presentes na bíle e/ou na urina, entretanto, estes não foram detectados (138). Isto é, mais de 50% de INA é excretado do organismo em 24 horas, talvez por isso a droga não tem tido o efeito esperado *in vivo; In vitro* não observamos efeito da droga em menos de 48 horas, como mostram os experimentos com JC-1 e o experimento para conferir a IC_{50} (dados não mostrados obtidos por esfregaço e contagem de parasitemia por microscopia optica). Entretanto, não foram identificados compostos acetilados de INA nas excressões de ratos (138), talvez estes não sejam facilmente metabolizados pelo organismo e sejam inibidores do crescimento de *P. falciparum.* Sendo assim, um estudo mais aprofundado dessa droga como antimalárico não deve ser descartado.

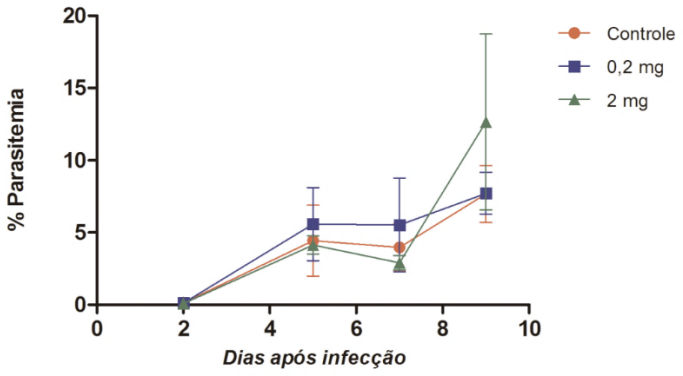

Figura 39 - Estudo *in vivo* da parasitemia em camundongos Balb/c em tratamento com INA 0,2 e2,0 mg/Kg/dia . Contagem da parasetemia, por citometria de fluxo, durante dez dias de infecção (dia 2, 5, 7 e 9 após infecção). Não houve diferença significativa da parasitemia entre controle e tratados (t-Student). Fonte: Elaborada pela autora.

Com todas as confirmações de uma via ativa em *P. falciparum* para produção de heme O, e como a maioria dos organismos tem heme O como um intermediário e heme A como produto final, decidimos verificar a presença de heme A em *P. falciparum*.

6.2.9 Estudo da biossíntese de heme A em *P. falciparum* - Extração e Separação do heme A

Para obtermos um padrão de heme A, iniciamos a extração a partir de coração bovino como descrito por Brown et al., 2002 (93). Como não houve sucesso, talvez devido às adaptações que foram necessárias, como a massa de coração utilizada e volumes de solventes[v], Brown sugeriu, por contato pessoal e informal, o uso de coração de camundongo, esse poderia ser mais adequado devido à menor quantidade de lipídeos.

O teste com coração de camundongo e também de uma metodologia que utiliza uma coluna de afinidade de Celite®, para uma primeira etapa de purificação de heme A, infelizmente não trouxe resultados positivos.

Após a tentativa com coração de camundongos e coluna de Celite®, resolvemos utilizar a coluna Sep-Pak C18, como feito para obter heme O de extrato de bactéria e parasita, tal adaptação foi pensada devido à semelhança das moléculas heme O e heme A. A hipótese era de que hemes farnesilados, pela semelhança estrutural, teriam afinidades com o mesmo solvente e com material da coluna Sep-Pak C18. Quando utilizamos a coluna Sep-Pak e o coração bovino, e análisamos por espectrometria de massas –MALDI-TOF– detectamos uma molécula com um espectro igual à massa de heme A, entretanto, o espectro obtido não era limpo de impurezas como o de heme B e heme O, ou seja, o pico correspondente a heme A era mais um dentre muitos.

A amostra separada por RP-HPLC adaptado de Brown et al., 2002 (93), apresentou picos em dois tempos de retenção que foram analisados por espectrometria de massas. Entretanto, a análise das amostras dos tempos de retenção, não apresentou resultados positivos para a presença de heme A.

Além da estratégia para obter heme A de extração de coração bovino e de camundongos, trabalhamos na construção de um plasmídeo pET3a/cta. Essa ideia surgiu da construção do plasmídeo cedido pelo Dr. John Wright para extração de heme O, a diferença é que o fragmento da construção foi baseado na sequência de cox15 ao invés de cox10. Ambas as sequencias são providas do genoma de *B. subtilis*, isso porque o estudo de Brown et al., 2002 (93) mostrou que bactéria *E. coli* quando superexpressas com genes cox10 e cox15 clonados de *B. subtilis* produzem heme O e heme A. Sabendo que *B. subtilis* produz heme A, e conhecendo um método para obter heme O de bactérias *E. coli* quando

---

[v] Adequações de volumes e massas foram necessárias pela estrutura do laboratório.

superexpressas com genes cox10 e induzidas, pensamos que está metodogia aplicada com superexpressão de cox15 seria uma possível fonte alternativa de heme A, já que, enfrentamos dificuldades para obter essa molécula de extrato de coração.

Entretanto, apesar dos esforços e de observarmos heme A em extrato de coração bovino, não detectamos heme A nem em extratos de coração de camundongo, nem em extrato de bactérias transformadas e induzidas e, tão pouco em extrato de parasita. Sendo assim, não podemos afirmar se há ou não uma via de biossíntese de heme A em *P. falciparum*. Apesar de não observarmos heme A em extrato de parasitas, demos continuidade ao estudo das enzimas responsáveis pela farnelisação de heme, HOS, e também da enzima responsável pela adição de um grupo formilo (H—C=O) ao heme farnesilado, HAS.

Para isso, após o estudo *in silico*, construímos vetores que possuíam as seguintes características: marcador GFP, para a localização da enzima por fluorescência; DD24 ou glmS, os quais permitiriam um ensaio para verificar se as enzimas são ou não essenciais; e com um plasmídeo p426.MET25 que permitiria comprovar a função por complementação em levedura (descrito no item 5.31).

6.2.10 Localização e função das enzimas candidatas a Cox10 e Cox15

Para localização e para verificar se os genes cox10 e cox15 são essenciais, foram desenhados oligonucleotídeos com base no genoma de *P. falciparum*, estes foram utilizados para execução de PCR, as sequências amplificadas e sequenciadas foram inseridas em plasmídeos adequados.

Após a obtenção de clones pGEM recombinantes com sequência cox10 e 15 idêntica àquela obtida do plasmoDB, subclonamos os fragmentos cox10 e cox15 em pTEX150-HA/Stre3, pTEX150-GFP/HA, pTEX150-DD24/HA e para complementação em leveduras utilizamos o plasmídeo p426.MET25.

Após a verificarmos as construções para localização por digestão com EcoR1 e BamH1 realizamos a Maxiprep e o processo de transfecção para formação das linhagens: pCox10-HA/Stre3, pCox15-HA/Stre3, pCox10-GFP/HA, pCox15-GFP/HA, pCox10-DD24/HA e pCox15-DD24/HA. Conseguimos 4 linhagens com o plasmídeo integrado, são elas: pCox10-HA/Stre3 confirmados por Western Blot (Figura 40), pCox10-GFP/HA,

pCox15-GFP/HA e pCox15-DD24/HA confirmados por microscopia de fluorescência (Figura 41).

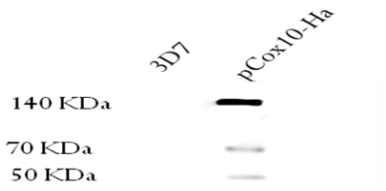

Figura 40 - pCox10-HA/Stre3,75KDa, confirmados por Western Blot utilizando antiHA para detecção de proteínas contendo o epítopo HA. A proteína presente indica que a transfecção foi realizada com sucesso e a proteína esta sendo produzida.
Fonte: Elaborada pelo autor.

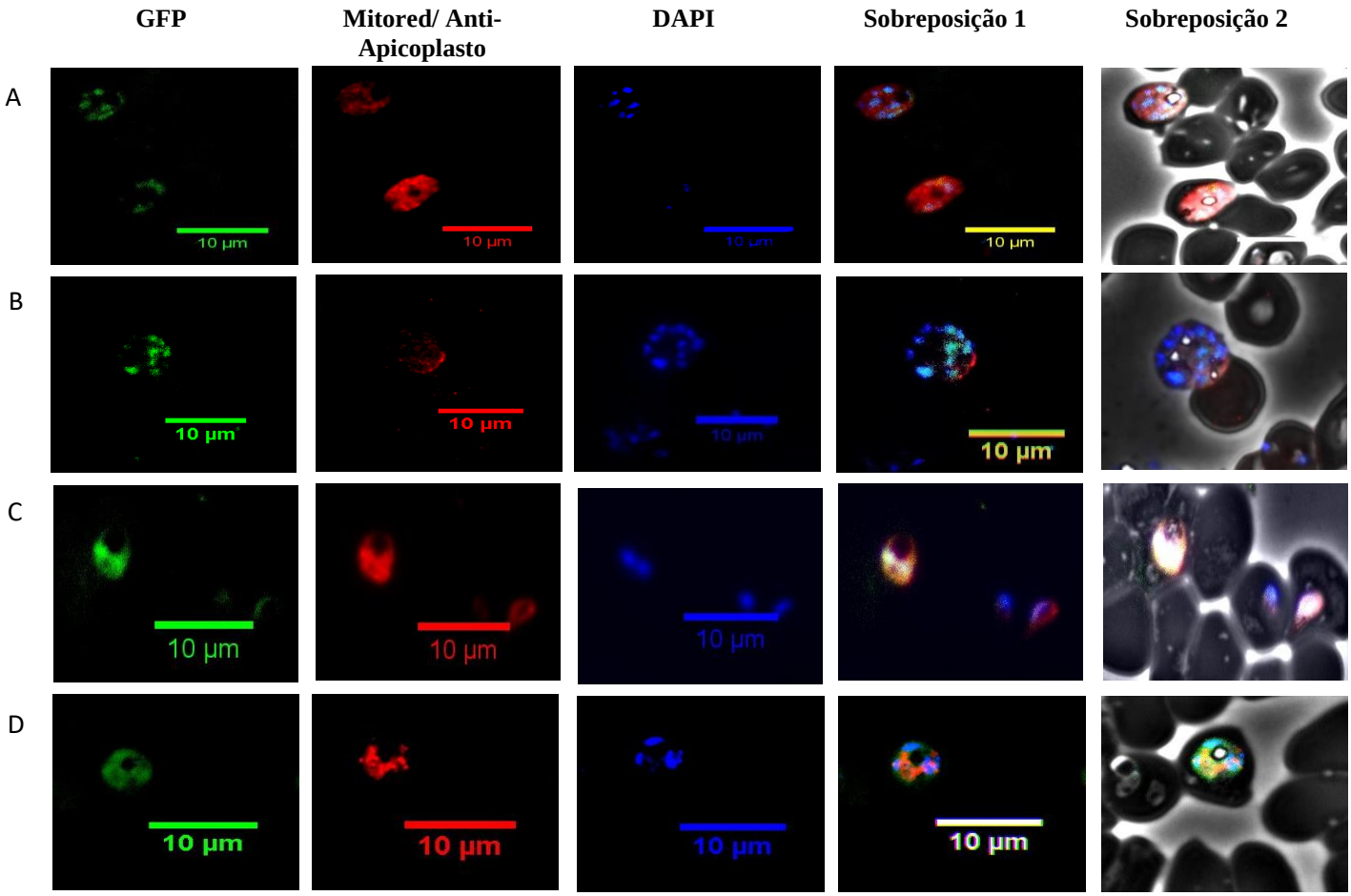

Figura 41 - Localização das enzimas candidatas a cox10 (A e B) e cox15 (C e D). Parasitas transfectados com plasmídeo pCox10-GFP/HA e pCox15-GFP/HA marcados com Mitored e DAPI (cox10 - A e cox 15 - C), ou com anticorpo para apicoplasto, formulado segundo Tonkin et al., 2006 (139) e desenvolvido pela FastaBio **,** (cox10 - B e cox15 - D) e DAPI. As imagens de cox10 mostram uma área maior de sobreposição de GFP, ou seja, da proteína em questão, com a mitocôndria (Mitored) e núcleo (DAPI), enquanto, as imagens de cox15 mostram uma sobreposição da área de GFP com a mitocôndria (Mitored) maior que a área sobreposta com núcleo (DAPI) e apicoplasto (anti-apicoplasto). Fotos Zeiss LSM-780 NLO, Microscópio confocal multifótons.
Fonte: Elaborada pela autora.

Como o apicoplasto está intimamente ligado à mitocôndria, não sendo possível a separação das duas organelas, evidenciando uma possível interação entre ambas (25), utilizamos para a localização um marcador de mitocôndria e um anticorpo anti-apicoplasto, formulado segundo Tonkin et al., 2006 (139) e desenvolvido por FastBio, assim, conseguiríamos distinguir em qual organela estão localizadas as enzimas.

Utilizando de microscopia de fluorescência verificamos a localização das enzimas candidatas a cox10 e cox15: pCox10-GFP/HA apresentou área de sobreposição maior com a mitocôndria e núcleo, Figura 41 A e B, ou seja, a área sobreposta com a mitocôndria e núcleo foi maior do que com e apicoplasto; pCox15-GFP/HA possui uma área sobreposta com a mitocôndria, Figura 41 C, maior do que com apicoplasto e núcleo, Figura 41 D. Essa localização é quantificada na tabela 2.

A biogênese mitocondrial é um processo complexo que requer a expressão sintonizada a partir de genomas nucleares e mitocondriais. Mais de 99% das proteínas mitocondriais são codificadas pelo núcleo e sintetizadas no citoplasma. A classificação de mRNAs que codificam proteínas mitocondriais pode representar provavelmente um passo chave para assegurar a funcionalidade dos correspondentes polipéptidos no interior da organela. Neste caso, uma fase cotranslacional pode auxiliar a importação dos precursores (137).

Em humanos o citocromo c oxidase (cox), componente terminal da cadeia respiratória mitocondrial, é um complexo constituído por 3 subunidades catalíticas codificadas por genes mitocondriais e múltiplas subunidades estruturais codificadas por genes nucleares. As subunidades codificadas mitocondrialmente funcionam na transferência de elétrons, e as subunidades codificadas no núcleo podem funcionar na regulação e montagem do complexo. Este gene nuclear codifica cox10, que não é uma subunidade estrutural, mas é requerido para a expressão de cox funcional e funções na maturação do heme A (140).

Entretanto, apesar do gene cox10 ser codificado no núcleo, ou seja, ser um gene nuclear, inclusive em *Saccharomyces cerevisiae*, o produto é localizado na mitocôndria e é necessários para a síntese de citocromo oxidase (141). O que nos leva a pensar que a localização de cox10 é na mitocôndria.

A tabela 2, apresenta o resultado da análise do sítio de direcionamento das enzimas por três programas (Predotar, Targetp, Mitoprot), realizado com a colaboração da Dra. Julia Cricco. Para .*T cruzi* e *T. brucei* ambas as enzimas possuem probabilidade maior de estarem

na mitocôndria. Entretanto, para *P. falciparum* e *S. cerevisiae,* cox10 não apresenta uma probabilidade conclusiva e cox15 em dois programas apresentou maior probabilidade de estar na mitocôndria, dados que corroboram com o obtido por microscopia de fluorêscencia.

		Predotar		Targetp		Mitoprot	
	Enzima	Lugar	Prob	Lugar	Prob	Lugar	Prob
T.cruzi	Cox10	Mit	0,88	Mit	0,839	Mit	0,869
	Cox15	Mit	0,69	Mit	0,96	Mit	0,94
T.brucei	Cox10	Mit	0,9	Mit	0,96	Mit	0,958
	Cox15	Mit	0,82	Mit	0,928	Mit	0,905
Sc	Cox10	Mit	0,52	Mit	0,51	Mit	0,667
		outro lugar	0,47	outro lugar	0,425		
	Cox15	Mit	0,6	Mit	0,89	Mit	1
		outro lugar	0,4				
		outro lugar	0,68	Mit	0,426		
Pf	Cox10(La)	outro lugar	0,99	outro lugar	0,777	Mit	0,351
		outro lugar	0,99	outro lugar	0,859		
	Cox10(Co)	outro lugar	0,99	outro lugar	0,9	Mit	0,02
		outro lugar	0,99	outro lugar	0,95		
	Cox15	Mit	0,15	outro lugar	0,88	Mit	0,92
		outro lugar	0,83				

Tabela 2 – Analise para predizer a localização de COX10 e COX15 a partir de diferentes sequencias gênicas *P. falciparum* (Pf), *T. cruzi, T. brucei* e *S. cerevisiae (Sc)* por diferentes programas: Predotar, Targetp e Mitoprot, estes programas analisam a sequência do sitio de direcionamento das enzimas. Pfcox10 (La - sequência truncada e Co – sequência completa) apresenta maior probabilidade de estar localizada em outra organela e não na mitocôndria. Pf Cox15 analisado com Mitoprot prevê com probabilidade de 0,92, sua localização na mitocôndria.

Podemos concluir com a análise *in silico* que: cox10 e cox15 são as candidatas a terem função HOS e HAS e e estão localizadas na mitocôndria, precisávamos confirmar a função e se são essênciais

6.2.11 Função de cox10 e 15 por Complementação em leveduras

Para função por complementação, foram utilizadas estirpes de *S. cerevisiae* com as deleções dos ORF Δcox10 e Δcox15 gerados a partir de DY5113. As estirpes de levedura foram transformadas, utilizando o acetato de lítio, com plasmídeo p426.MET25 acrescidos dos fragmentos com sequência cox10 e 15 idêntica àquela obtida do plasmoDB e também com genes sintéticos otimizados para leveduras .

As construções cox15 e cox10 em plasmídeo p426.MET25 foram levadas para o laboratório de Biologia e Bioquímica de *T. cruzi* da Faculdade de Ciências Bioquímicas e

Farmacêuticas da Universidade de Rosário na Argentina onde demos início ao processo de complementação em leveduras com genes de *P. falciparum*, utilizando a estratégia mostrada na Figura 19.

6.2.12 Δcox15 e os resultados esperados

As células foram cultivadas em meio rico (YP, extrato de levedura 1%, peptona a 2%): completo, ou sem os nutrientes adequados para o plasmídeo de seleção, neste caso meio sem uracila. A competência respiratória das estirpes é determinada utilizando testes de crescimento em placas contendo 2% de glicose ou 2% glicerol-3% de etanol como fontes de carbono, as quais foram incubadas em 30ºC de 3 à 5 dias (123).

Leveduras podem obter energia (ATP), utilizando glicose como substrato, por respiração ou fermentação. Entretanto, quando o substrato é o glicerol a obtenção de energia é exclusiva por processo de respiração. Ou seja, a placa contendo glicose é utilizada como controle de crescimento de *S. cerevisiae*, pois, independente da complementação a levedura irá crescer e produzir ATP por fermentação Entretanto, como utilizamos meio com glicose sem uracila, só crescem as leveduras transformantes, devido a característica oriunda do plasmideo de seleção. Diferente do que ocorre em meio glicerol, neste a levedura só produz ATP se houver complementação (não apenas transformação), para que, ocorra o processo de respiração.

Obtivemos leveduras transformantes, já que, conseguiram crescer leveduras em meio com glicose sem uracila, característica obtida do plasmídeo, porém, não cresceram em meio glicerol-EtOH 3%, portanto não houve complementação funcional.

Em relação a cox10, uma explicação é que esta possui domínio adicional apresentado por *P. falciparum* (não presente em versões de outros organismos). Outra explicação do insucesso para ambas as candidatas cox10 e cox15 pode ser o *codon-usage* muito diferente de *P. falciparum* comparado com *S. cerevisae* (122). Porém, como abordagens alternativas para expressar proteínas de *P. falciparum* em sistemas heterologos têm sido investigadas com sucesso limitado (122), foram construídos genes sintéticos com códons otimizados para levedura, que foram usados para complementação em *S. cerevisae*, e assim mostrar a atividade esperada.

Dando início a novos testes, focamos no gene sintético Pfcox15 clonado no vetor pUCIDT, já que, conseguimos caracterizar o produto heme O. Para isso, no laboratório de

Biologia e Bioquímica de *T. cruzi* da Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas da Universidade de Rosário na Argentina, com ajuda da aluna de doutorado Brenda A. Cirulli, demos continuidade ao estudo de complementação utilizando além da construção realizada com gene de *P. falciparum* o gene sintético otimizado para leveduras.

O gene foi re-clonado no vetor de expressão para leveduras pRS426M25, para transformação de *E.coli* DH5α. Minipreps de transformantes foram linearizadas com XhoI, para enfim a digestão parcial com BamHI e a purificação do inserto (Figura 42).

O vetor de clonagem pRS426M25 foi transformado em *E.coli* DH5α. Minipreps das transformantes foram verificadas por enzimas de restrições e por sequenciamento, com isso observamos a presença de um segundo sítio BamHI no gene.

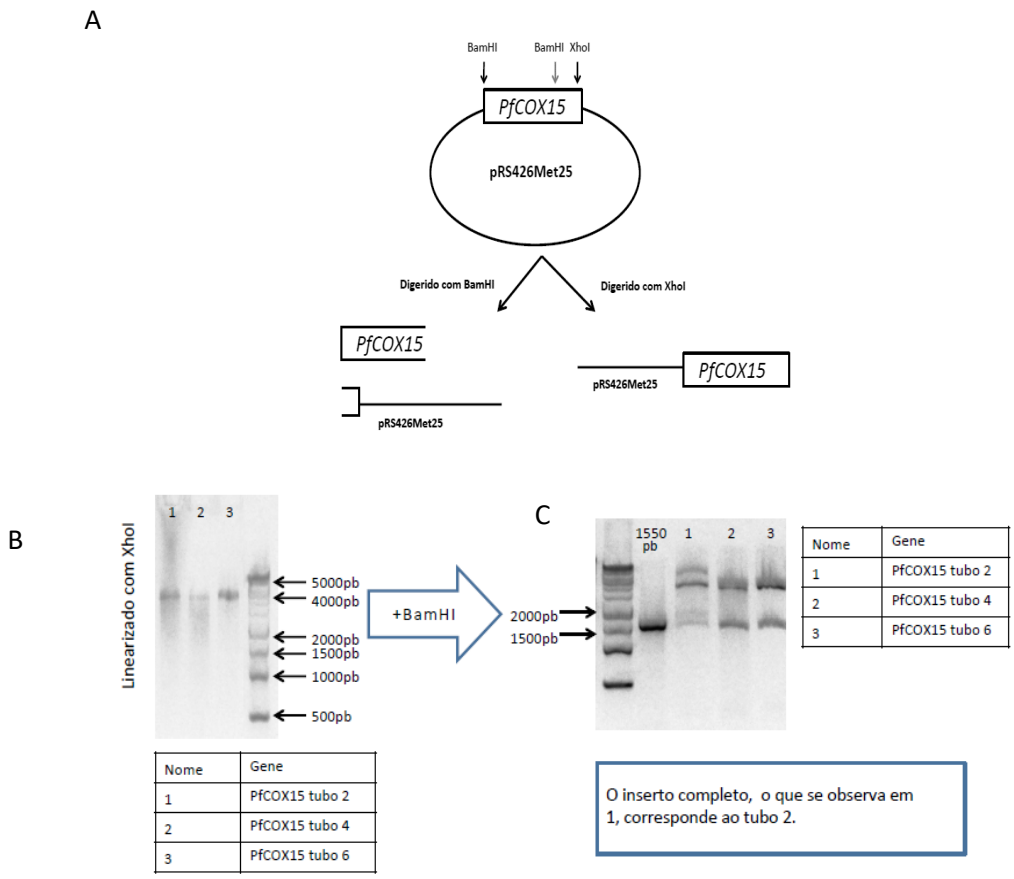

Figura 42 - A- esquema de análise da sequência de Pfcox15 inserida em pRS426M25 na presença de enzima de restrição BamHI e XhoI, as utilizadas para gerar o gene sintético. B- Resultado obtido pela linearização com XhoI das colônias obtidas de bactérias transformantes, C- Resultado obtido após a digestão parcial com BamHI, indicando a presença de cox15.
Fonte: Elaborada pela autora.

Verificada a sequência correta, voltamo-nos para transformar quimicamente levedura *S. cerevisiae* cox15Δ com pRS425M25-Pfcox15 sintético. Realizamos dois testes:

1) ensaio de complementação em levedura (Figura 43).

2) medida do consumo de oxigênio (Figura 44).

Para medir consumo de oxigênio utilizamos o equipamento YSI MODEL 5300 Biological Oxygen Monitor en AIRE. Cultivamos as células de leveduras (neste caso todas as transformantes obtidas) em meio seletivo (sem uracila) com 2% de glicose, 10mL, durante 12 hs. As células foram obtidas por centrifugação e lavadas 3 vezes com solução de Glicerol a 3% para serem ressuspendidas em 1 mL de glicerol 3%.

Para realizarmos as determinações de consumo de O_2 , temos como padrão: 2 mL de glicerol a 3% registra 100% de O_2. As amostras são adicionadas num volume de 50 ou 100 µl numa diluição 1:100 de células em glicerol 3% , para podermos registrar o consumo de O_2, o tempo pode variar de 2 a 5 min dependendo da velocidade de consumo, e após a incubação no tempo estimado adicionamos azida sódica para inibir o consumo.

Em ambos os ensaios não observamos atividade por expressão de Pfcox15, isto é, não observamos crescimento das células de leveduras transformadas com pRS426M25-Pfcox15 sintético e tão pouco o consumo de O_2.

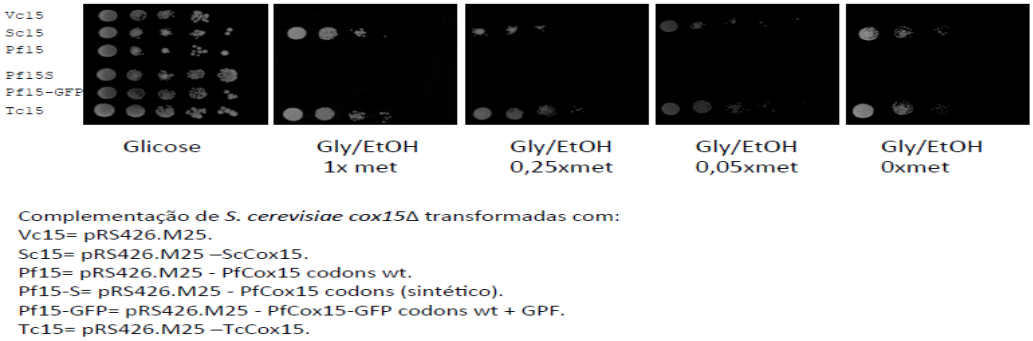

Figura 43 - Teste de complementação e de função de leveduras cox15Δ por pRS-Pfcox15. Leveduras transformantes crescem em meio com glicose sem uracila, devido a fonte alternativa de carbono. As leveduras transformantes por pRS-Pfcox15 não cresceram em meio glicerol-EtOH 3% com metionina, não havendo complementação funcional. A metionina para *T. cruzi* potencializa a complementação.
Fonte: Elaborada pela autora.

Como não temos nenhuma maneira de detectar a proteína por Western Blot, já que não temos anticorpos específicos e nem o marcador, realizamos um ensaio de resgate de plasmídeo em *S. cerevisiae* transformadas com pRS426M25-Pfcox15 sintético. Este ensaio mostra se a levedura foi realmente transformada.

Para este resgate, o DNA total da levedura (genômico e plasmídeo) foi extraído para transformação de *E. coli* DH5α. Obtivemos plasmídeos purificados a partir de bactérias transformantes e verificamos por uso de enzima de restrição a liberação de um fragmento

com o tamanho esperado, confirmando que as leveduras foram transformadas com o vetor correto.

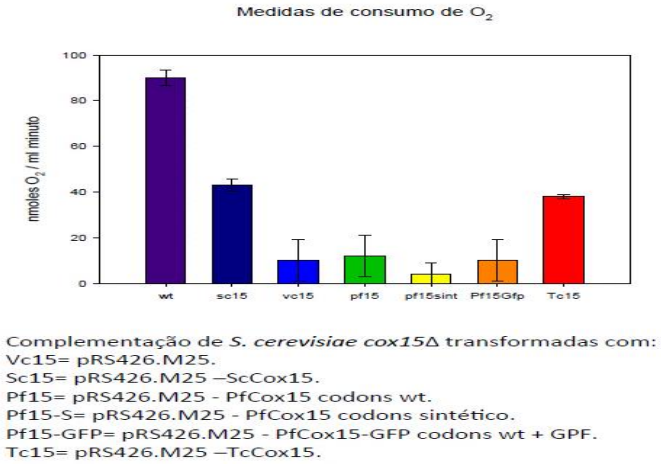

Figura 44: Medidas de consumo de oxigênio, em glicerol 3%, de *S. cerevisiae* DY5113 (WT) e DY5113 cox15Δ, transformadas com vetor controle pRS426.M25 (VC15), pRS426M25.Sccox15 (Sc15), pRS426M25.Pfcox15 códons wild type (Pf15), pRS426M25.Pfcox15 códons sintéticos (Pf15sint), pRS426M25.Pfcox15-GFP (Pf15-GFP) y pRS426M25.Tccox15 (Tc15). Apenas a complentação com cox15 de *T. cruzi* apresentou um consumo de oxigênio. Cox15 de *P. falciparum* mesmo sintético otimizado para levedura não apresentou consumo de oxigênio.
Fonte: Elaborada pela autora.

Além dos genes sintéticos, utilizamos, ainda no laboratório de Biologia e Bioquímica de *T. cruzi* na Argentina e com ajuda da aluna de doutorado Brenda A. Cirulli, as construções pfcox10.6His, pfcox15.6His e ambas fusionadas com GFP, com isso foi possível examinar a presença do gene de interesse nas leveduras transformadas, uma estratégia para verificar se a complementação não ocorre pela ausência do gene.

Apesar dos esforços não conseguimos verificar a função das enzimas por complementação, como já foi dito, as explicações podem ser: a cox10 por possuir um domínio adicional apresentada por *P. falciparum* e não presente entre outros organismos; e para ambas as enzimas candidatas cox10 e cox15 pode ser o *codon-usage* de *P. falciparum* muito diferente comparado com *S. cerevisae* (118) , *P. falciparum* apresenta mais de 80% de AT em sua sequência o que dificultou até a produção de genes sintéticos.

Sendo assim, pensamos em utilizar o transfectantes glmS para verificar por marcação metabólica, a função de cox15 e cox10. Entretanto, esse será um resultado futuro.

7 Considerações finais e Conclusão

7.1 Considerações finais

Neste estudo, demonstramos que o *P. falciparum* tem uma via de biossíntese ativa para produção de heme O, bem como para heme B, utilizando duas metodologias: marcação metabólica com dois precursores diferentes; e por espectrometria de massas confirmamos a presença de ambos os produtos em extrato de parasita purificado. Não conseguimos observar a biossíntese de heme A nem a presença deste em extrato de parasitas.

Neste estudo, não tivemos indícios de uma via para formação de giberelina por marcação metabólica, bem como por teste de recuperação.

Além disso, observamos que INA e UNP são responsáveis pela inibição da farnesilação de heme B, já que, por marcação metabólica vimos uma diminuição na biossíntese de heme O em extrato de parasita tratado com ambas as drogas.

Sugerimos também que a culturas tratadas com INA e UNP mostram uma diminuição da atividade mitocondrial, tal diminuição no potencial da mitocôndria pode estar ligada a heme O, sendo assim responsável pela morte dos parasitas. Em relação ao teste *in vivo* com INA, não obtivemos atividade antimalárica em camundongos infectados com *P. berghei* Anka GFP.

As análises *in silico* das enzimas responsáveis pela formação de heme O e heme A nos permite predizer que as candidatas a cox10 e cox15 possuem domínios conservados quando alinhadas a sequencias de outros organismos, e também mostra uma relação estreita destas com as de outros organismos através da árvore filogenética. Infelizmente ainda não temos resultados para a função, apesar dos esforços, e tão pouco sabemos se as enzimas são essenciais ou não. Entretanto, sabemos que a localização de ambas enzimas, HOS e HAS, é na mitocôndria. O que a torna HOS mais interessante, é o fato de e talvez assim como *E. coli* o *Plasmodium* utilize heme O como um produto final e não como intermediário.

A maior dependência da função da via de hemes nos estágios intraeritrocíticos pode abrir portas para direcionar outras etapas para o tratamento da malária. Finalmente, os mecanismos reguladores que governam o metabolismo do heme e, de fato, grande parte da progressão do desenvolvimento de parasitas, permanecem mal compreendidos e são uma fronteira para a descoberta futura.

7.2 Conclusão

Podemos concluir que o parasita biossintetiza heme O e que a inibição da formação de heme farnesilado, por INA e UNP, leva a uma diminuição da parasitemia. INA e UNP parecem afetar o potencial de mitocôndria, o que seria fácil de compreender já que, inibem a formação de um componente da cadeia mitocondrial. Conseguimos por estudo *in silico* verificar que cox10 e cox15 de *P. falciparum* tem função HOS e HAS e identificamos a localização das enzimas, HOS e HAS na mitocôndria. Assim, este caminho pode se tornar um importante alvo para novos medicamentos e deve ser investigado mais a fundo. Não identificamos uma via de biossíntese de G4 e G3 por *Plasmodium.*

Referências Bibliográficas[vi]

1. Farooq U, Mahajan RC. Drug resistance in malaria. Vol. 41, Journal of Vector Borne Diseases. 2004. p. 45–53.
2. Kondrachine A V., Trigg PI. Global overview of malaria. Vol. 106, Indian Journal of Medical Research. 1997. p. 39–52.
3. WHO. World malaria report 2014 [Internet]. Vol. WHO/HTM/GM, World Health. 2014. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/%5Cnhttp://www.who.int/iris/bitstream/10665/97008/1/9789241564694_eng.pdf%5Cnhttp://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_no_profiles.pdf?ua=1
4. World Health Organization. World malaria report 2013. World Health [Internet]. 2013;WHO/HTM/GM:238. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/%5Cnhttp://www.who.int/iris/bitstream/10665/97008/1/9789241564694_eng.pdf%5Cnhttp://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_no_profiles.pdf?ua=1
5. Malária volta a AL 10 anos depois do último caso [Internet]. 2015. Available from: http://www.cremal.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=21606:2015-03-25-14-24-08&catid=3
6. de Pina-Costa A, Brasil P, di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF e S, et al. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(5):618–33.
7. Descrição da Doença [Internet]. [cited 2014 Mar 27]. Available from: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11342-descricao-da-doenca
8. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: A prospective study in Papua, Indonesia. Vol. 5, PLoS Medicine. 2008. p. 0890–9.
9. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science (80-) [Internet]. 1976;193(4254):673–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1126/science.781840
10. Rey L. No TitleParasitologia. Ed Guanabara Koogan. 1991;286–328.
11. Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. Vol. 23, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2013. p. 2829–43.
12. França TCC, Dos Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. Vol. 31, Quimica Nova. 2008. p. 1271–8.
13. Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH. A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. Vol.

[vi] De acordo com o Estilo Vancouver

16, Parasitology Today. 2000. p. 427–33.

14. Banting G, Benting J, Lingelbach K. A minimalist view of the secretory pathway in Plasmodium falciparum. Trends Cell Biol. 1995;5(9):340–3.

15. Bozdech Z, Llinás M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of Plasmodium falciparum. PLoS Biol. 2003;1(1).

16. McFadden GI, Waller RF. Plastids in parasites of humans. Bioessays [Internet]. 1997;19(11):1033–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9394626

17. Lim L, McFadden GI. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. Philos Trans R Soc B Biol Sci [Internet]. 2010 Mar 12;365(1541):749–63. Available from: http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2009.0273

18. Köhler S, Delwiche C, Denny P, Tilney L, Webster P, Wilson R, et al. A Plastid of Probable Green Algal Origin in Apicomplexan Parasites. Science [Internet]. 1997;275(5305):1485–9. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.275.5305.1485

19. Sato S, Tews I, Wilson RJM. Impact of a plastid-bearing endocytobiont on apicomplexan genomes. Vol. 30, International Journal for Parasitology. 2000. p. 427–39.

20. Roos DS, Crawford MJ, Donald RGK, Fraunholz M, Harb OS, He CY, et al. Mining the Plasmodium genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci [Internet]. 2002;357(1417):35–46. Available from: http://rstb.royalsocietypublishing.org.gate1.inist.fr/content/357/1417/35.abstract%5Cnhttp://rstb.royalsocietypublishing.org.gate1.inist.fr/content/357/1417/35.long

21. Nair SC, Brooks CF, Goodman CD, Sturm A, McFadden GI, Sundriyal S, et al. Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in Toxoplasma gondii. J Exp Med [Internet]. 2011;208(7):1547–59. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3135366/pdf/JEM_20110039.pdf

22. Mazumdar J, H Wilson E, Masek K, A Hunter C, Striepen B. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in Toxoplasma gondii. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(35):13192–7.

23. Yeh E, DeRisi JL. Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage plasmodium falciparum. PLoS Biol. 2011;9(8).

24. Kutner S, Breuer W V., Ginsburg H, Aley SB, Cabantchik ZI. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of Plasmodium falciparum: Association with parasite development. J Cell Physiol. 1985;125(3):521–7.

25. Kirk K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. Physiol Rev. 2001;81(2):495–537.

26. Wiback SJ, Palsson BO. Extreme Pathway Analysis of Human Red Blood Cell

Metabolism. Biophys J. 2002;83(2):808–18.

27. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, et al. The Human Serum Metabolome. Flower D, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Feb 16;6(2):e16957. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0016957

28. Waller RF, Ralph SA, Reed MB, Su V, Douglas JD, Minnikin DE, et al. A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in Plasmodium falciparum. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(1):297–301.

29. van Dooren GG, Kennedy AT, McFadden GI. The use and abuse of heme in apicomplexan parasites. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2012;17(4):634–56. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22320355

30. Goulart HR, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Duarte FAA, Katzin AM. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in Plasmodium falciparum. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(7):2502–9.

31. Tonhosolo R, D'Alexandri FL, de Rosso V V, Gazarini ML, Matsumura MY, Peres VJ, et al. Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum. J Biol Chem [Internet]. 2009;284(15):9974–85. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2665121&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

32. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature [Internet]. 2002;419(6906):498–511. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3836256&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

33. 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;285(5433):1573–6.

34. Surolia N, Surolia a. Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of Plasmodium falciparum. Nat Med. 2001;7(2):167–73.

35. Ramya TNC, Mishra S, Karmodiya K, Surolia N, Surolia A. Inhibitors of nonhousekeeping functions of the apicoplast defy delayed death in Plasmodium falciparum. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(1):307–16.

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

37. Fidock D a. Drug discovery: Priming the antimalarial pipeline. Nature. 2010;465(7296):297–8.

38. Mueller I, Genton B, Betuela I, Alpers MP. Vaccines against malaria: perspectives from Papua New Guinea. Hum Vaccin. 2010;6(January):17–20.

39. Tu Y. Artemisinin - A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). Angew Chemie - Int Ed. 2016;55(35):10210–26.

40. Owens B. No TitleNobel Prize goes to antiparasitic drug discoverers. World Rep. 2015;1443.

41. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, et al. Malaria: Progress, perils, and prospects for eradication. Vol. 118, Journal of

Clinical Investigation. 2008. p. 1266–76.

42. Sun C, Li J, CaoY Long G ZB. Two distinct and competitive pathways confer the cellcidal actions of artemisinins. Microb Cell. 2015;2:14–25.

43. Wang J, Huang L, Li J, Fan Q, Long Y, Li Y, et al. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. PLoS One. 2010;5(3).

44. Mercer AE, Copple IM, Maggs JL, O'Neill PM, Park BK. The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials. J Biol Chem. 2011;286(2):987–96.

45. Wang J, Zhang C-J, Chia WN, Loh CCY, Li Z, Lee YM, et al. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in Plasmodium falciparum. Nat Commun [Internet]. 2015 Dec 22;6:10111. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms10111

46. Li J, Zhou B. Biological actions of artemisinin: Insights from medicinal chemistry studies. Molecules. 2010;15(3):1378–97.

47. Xie SC, Dogovski C, Hanssen E, Chiu F, Yang T, Crespo MP, et al. Haemoglobin degradation underpins the sensitivity of early ring stage Plasmodium falciparum to artemisinins. J Cell Sci [Internet]. 2016;129(2):406–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26675237%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4732288

48. Chugh M, Sundararaman V, Kumar S, Reddy VS, Siddiqui WA, Stuart KD, et al. Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in Plasmodium falciparum. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2013 Apr 2;110(14):5392–7. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1218412110

49. Kannan R, Sahal D, Chauhan VS. Heme-artemisinin adducts are crucial mediators of the ability of artemisinin to inhibit heme polymerization. Chem Biol. 2002;9(3):321–32.

50. Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD. Principios de Bioquímica. Psychological Science. 2008. 971 p.

51. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID a, East JM, Lee a G, Kimura M, et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. Nature. 2003;424(6951):957–61.

52. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. Molecules [Internet]. 2010;15(3):1705–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20336009

53. Shemin D, Russell CS, Abramsky T. The succinate-glycine cycle. I. The mechanism of pyrrole synthesis. J Biol Chem [Internet]. 1955 Aug;215(2):613–26. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13242558

54. Porra RJ, Klein O, Wright PE. The proof by 13C-NMR spectroscopy of the predominance of the C5 pathway over the Shemin pathway in chlorophyll biosynthesis in higher plants and of the formation of the methyl ester group of chlorophyll from glycine. Eur J Biochem [Internet]. 1983 Feb 15;130(3):509–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6130943

55. Varadharajan S, Dhanasekaran S, Bonday ZQ, Rangarajan PN, Padmanaban G. Involvement of delta-aminolaevulinate synthase encoded by the parasite gene in de

novo haem synthesis by Plasmodium falciparum. Biochem J [Internet]. 2002 Oct 15;367(Pt 2):321–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119044

56. Nagaraj VA, Prasad D, Rangarajan PN, Padmanaban G. Mitochondrial localization of functional ferrochelatase from Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasitol. 2009;168(1):109–12.

57. Nagaraj VA, Prasad D, Arumugam R, Rangarajan PN, Padmanaban G. Characterization of coproporphyrinogen III oxidase in Plasmodium falciparum cytosol. Parasitol Int. 2010;59(2):121–7.

58. Dhanasekaran S, Chandra NR, Sagar BKC, Rangarajan PN, Padmanaban G. δ-Aminolevulinic acid dehydratase from Plasmodium falciparum: Indigenous versus imported. J Biol Chem. 2004;279(8):6934–42.

59. Padmanaban G, Rangarajan PN. Heme metabolism of Plasmodium is a major antimalarial target. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2000;268(3):665–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679261

60. Padmanaban G, Rangarajan PN. Emerging targets for antimalarial drugs. Expert Opin Ther Targets [Internet]. 2001;5(4):423–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540258

61. Nagaraj VA, Sundaram B, Varadarajan NM, Subramani PA, Kalappa DM, Ghosh SK, et al. Malaria Parasite-Synthesized Heme Is Essential in the Mosquito and Liver Stages and Complements Host Heme in the Blood Stages of Infection. PLoS Pathog. 2013;9(8).

62. Sigala PA, Goldberg DE. The peculiarities and paradoxes of Plasmodium heme metabolism. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2014;68:259–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25002093

63. Reichlin M. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands. Science (80-) [Internet]. 1972;178(4058):296 LP-296. Available from: http://science.sciencemag.org/content/178/4058/296.abstract

64. Rodgers KR. Heme-based sensors in biological systems. Vol. 3, Current Opinion in Chemical Biology. 1999. p. 158–67.

65. Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH. Heme-Containing Oxygenases. Chem Rev. 1996;96(7):2841–88.

66. Mense SM ZL. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. Cell Res. 2016;16:681–692.

67. Gray HB, Winkler JR. Electron Transfer in Proteins. Annu Rev Biochem. 1996;65:537–61.

68. Zeidler J, Lichtenthaler HK. Biosynthesis of 2-methyl-3-buten-2-ol emitted from needles of Pinus ponderosa via the non-mevalonate DOXP/MEP pathway of isoprenoid formation. Planta [Internet]. 2001 Jun;213(2):323–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469599

69. Zhou D, White RH. Early steps of isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli. Biochem J. 1991;273 (Pt 3:627–34.

70. Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahm H. Glyceraldehyde

3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. J Am Chem Soc. 1996;118(11):2564–6.

71. Disch a, Schwender J, Müller 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;333 (Pt 2:381–8.

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

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

74. 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;95(5):2100–4.

75. Sprenger GA, Schörken U, Wiegert T, Grolle S, de Graaf AA, Taylor S V, 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 [Internet]. 1997 Nov 25;94(24):12857–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371765

76. Cane DE, Du S, Robinson JK, Hsiung Y, Spenser ID. Biosynthesis of Vitamin B6: Enzymatic Conversion of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate to Pyridoxol Phosphate. J Am Chem Soc. 1999;121(33):7722–3.

77. 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;271(48):30426–35.

78. Hazra A, Chatterjee A, Begley TP. Biosynthesis of the thiamin thiazole in Bacillus subtilis: Identification of the product of the thiazole synthase-catalyzed reaction. J Am Chem Soc. 2009;131(9):3225–9.

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

80. 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 terpenoid biosynthesis. Tetrahedron Lett. 1998;39(43):7913–6.

81. Richard SB, Ferrer JL, Bowman ME, Lillo AM, Tetzlaff CN, Cane DE, et al. Structure and mechanism of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase: An enzyme in the mevalonate-independent isoprenoid biosynthetic pathway. J Biol Chem. 2002;277(10):8667–72.

82. Rohdich F, Wungsintaweekul J, Eisenreich W, Richter G, Schuhr C a, 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;97(12):6451–6.

83. Rohdich F, Kis K, Bacher A, Eisenreich W. The non-mevalonate pathway of

isoprenoids: Genes, enzymes and intermediates. Vol. 5, Current Opinion in Chemical Biology. 2001. p. 535–40.

84. 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 ???? T cells in Escherichia coli. FEBS Lett. 2001;509(2):317–22.

85. Cunningham F.X. J, Lafond TP, Gantt E. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. J Bacteriol. 2000;182(20):5841–8.

86. 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;98(26):14837–42.

87. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. N Engl J Med [Internet]. 1976;295(6):302–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/778616

88. 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;279(50):51749–59.

89. Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2012 Sep;1823(9):1604–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554985

90. Barros MH, Nobrega FG, Tzagoloff A. Mitochondrial ferredoxin is required for heme a synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2002;277(12):9997–10002.

91. Zhuang J, Reddi AR, Wang Z, Khodaverdian B, Hegg EL, Gibney BR. Evaluating the roles of the heme a side chains in cytochrome c oxidase using designed heme proteins. Biochemistry. 2006;45(41):12530–8.

92. Hederstedt L, Lewin A, Throne-Holst M. Heme A synthase enzyme functions dissected by mutagenesis of Bacillus subtilis CtaA. J Bacteriol. 2005;187(24):8361–9.

93. Brown KR, Allan BM, Do P, Hegg EL. Identification of novel hemes generated by heme A synthase: Evidence for two successive monooxygenase reactions. Biochemistry. 2002;41(36):10906–13.

94. Brown BM, Wang Z, Brown KR, Cricco J a, Hegg EL. Heme O synthase and heme A synthase from Bacillus subtilis and Rhodobacter sphaeroides interact in Escherichia coli. Biochemistry. 2004;43(42):13541–8.

95. Nobrega MP, Nobrega FG, Tzagoloff A. COX10 codes for a protein homologous to the ORF1 product of Paracoccus denitrificans and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. J Biol Chem [Internet]. 1990 Aug 25;265(24):14220–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2167310

96. Wang Z, Wang Y, Hegg EL. Regulation of the heme a biosynthetic pathway

Differential regulation of heme a synthase and heme O synthase in saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2009;284(2):839–47.

97. Bestwick M, Khalimonchuk O, Pierrel F, Winge DR. The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10. Mol Cell Biol [Internet]. 2010 Jan;30(1):172–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841065

98. Svensson B, Lübben M, Hederstedt L. Bacillus subtilis CtaA and CtaB function in haem A biosynthesis. Mol Microbiol. 1993;10(1):193–201.

99. Glerum DM, Muroff I, Jin C, Tzagoloff A. COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. J Biol Chem [Internet]. 1997 Jul 25;272(30):19088–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228094

100. Bestwick M, Khalimonchuk O, Pierrel F, Winge DR. The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10. Mol Cell Biol. 2010 Jan;30(1):172–85.

101. Antonicka H, Leary SC, Guercin GH, Agar JN, Horvath R, Kennaway NG, et al. Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. Hum Mol Genet. 2003;12(20):2693–702.

102. Barros MH, Tzagoloff A. Regulation of the heme A biosynthetic pathway in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett. 2002;516(1–3):119–23.

103. Huy NT, Kamei K, Kondo Y, Serada S, Kanaori K, Takano R, et al. Effect of antifungal azoles on the heme detoxification system of malarial parasite. J Biochem [Internet]. 2002;131(3):437–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872173

104. Toyama T, Tahara M, Nagamune K, Arimitsu K, Hamashima Y, Palacpac NMQ, et al. Gibberellin biosynthetic inhibitors make human malaria parasite Plasmodium falciparum cells swell and rupture to death. PLoS One. 2012;7(3).

105. Rademacher W. Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [Internet]. 2000;51:501–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012200

106. Dantas A, Queiroz J, Vieira E, Almeida V. Effect of gibberellic acid and the biostimulant stimulate® on the initial growth of tamarind. Rev Bras Frutic. 2012;34(1):8–14.

107. Davies PJ. Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action! Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! 2010. 1-802 p.

108. Wang Z, Brown KR, Brown BM, Cricco JA, Hegg EL. Studies of Heme A Synthase in Bacillus subtilis and Rhodobacter sphaeroides: Evidence for Protein-Protein Interactions between Heme A Synthase and Heme O Synthase. Abstr Jt Reg Meet Northwest Rocky Mt Sect Am Chem Soc Logan, UT, United States, June 6-9. 2004;GEN-163.

109. Trager W, Jenson JB. Cultivation of malarial parasites. Nature [Internet]. 1978;273(5664):621–2. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/351412

110. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of Plasmodium falciparum

erythrocytic stages in culture. J Parasitol [Internet]. 1979;65(3):418–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/383936

111. Goodyer ID, Johnson J, Eisenthal R, Hayes DJ. Purification of mature-stage Plasmodium falciparum by gelatine flotation. Ann Trop Med Parasitol [Internet]. 1994 Apr;88(2):209–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8067816

112. Karl S, Davis TME, St Pierre TG. Parameterization of high magnetic field gradient fractionation columns for applications with Plasmodium falciparum infected human erythrocytes. Malar J [Internet]. 2010;9:116. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2877061/

113. Barthe P, Bulard C. Bound and Free Abscisic Acid Levels in Dormant and After-ripened Embryos of Pyrus malus L. cv. Golden delicious. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie [Internet]. 1978 Dec;90(3):201–8. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044328X78802323

114. Bhalla K, Singh SB, Agarwal R. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing Fusarium strains. Environ Monit Assess. 2010;167(1–4):515–20.

115. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated Quantitative Assessment of Antimalarial Activity In Vitro by a Semiautomated Microdilution Technique. Antimicrob Agents Chemother. 1979;16(6):710–8.

116. Aslett M, Aurrecoechea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. Nucleic Acids Res. 2009;38(SUPPL.1).

117. Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Curr Protoc Bioinformatics [Internet]. 2002;Chapter 2:Unit 2.3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18792934

118. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30(12):2725–9.

119. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Bioinformatics. 1992;8(3):275–82.

120. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol [Internet]. 2016;msw054. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904

121. Sambrook J, W Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb NY [Internet]. 2001;999. Available from: http://books.google.com/books?id=YTxKwWUiBeUC&printsec=frontcover%5Cnpapers2://publication/uuid/BBBF5563-6091-40C6-8B14-06ACC3392EBB

122. LaCount DJ, Schoenfeld LW, Fields S. Selection of yeast strains with enhanced expression of Plasmodium falciparum proteins. Mol Biochem Parasitol. 2009;163(2):119–22.

123. Mumberg D, Muller R, Funk M. Regulatable promoters of saccharomyces cerevisiae: Comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. Nucleic Acids Res. 1994;22(25):5767–8.

124. de Azevedo MF, Gilson PR, Gabriel HB, Simões RF, Angrisano F, Baum J, et al.

Systematic Analysis of FKBP Inducible Degradation Domain Tagging Strategies for the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. Templeton TJ, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Jul 16;7(7):e40981. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0040981

125. Prommana P, Uthaipibull C, Wongsombat C, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y, Knuepfer E, et al. Inducible Knockdown of Plasmodium Gene Expression Using the glmS Ribozyme. PLoS One. 2013;8(8).

126. Hasenkamp S, Wong EH, Horrocks P. An improved single-step lysis protocol to measure luciferase bioluminescence in Plasmodium falciparum. Malar J [Internet]. 2012;11(1):42. Available from: http://www.malariajournal.com/content/11/1/42

127. Fidock D a, Wellems TE. Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1997;94(20):10931–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9380737

128. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins J a, Breaker RR. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. Nature. 2004;428(6980):281–6.

129. Furtado GC, Moura IC, Pudles J, Alvarez JM, D'Império Lima MR. Plasmodium chabaudi chabaudi: a monoclonal antibody raised against soluble antigens present in the plasma of infected mice recognizes a 250-kDa schizont glycoprotein that is secreted during schizogony. Exp Parasitol [Internet]. 1999 Jan;91(1):97–100. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920048

130. Buchensky C, Almirón P, Mantilla BS, Silber AM, Cricco JA. The Trypanosoma cruzi proteins TcCox10 and TcCox15 catalyze the formation of heme A in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Vol. 312, FEMS Microbiology Letters. 2010. p. 133–41.

131. Vial HJ, Philippot JR, Wallach DFH. A reevaluation of the status of cholesterol in erythrocytes infected by Plasmodium knowlesi and P. falciparum. Mol Biochem Parasitol. 1984;13(1):53–65.

132. Waters AP, Higgins DG, McCutchan TF. Plasmodium falciparum appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(April):3140–4.

133. Zilversmit M and SP. Malaria Parasites -The Tree of Life [Internet]. Plasmodium. Malaria Parasites. 2008. p. Tree of Life Plasmodium. Available from: http://tolweb.org/Plasmodium/68071/2008.05.05

134. Ke H, Sigala PA, Miura K, Morrisey JM, Mather MW, Crowley JR, et al. The heme biosynthesis pathway is essential for Plasmodium falciparum development in mosquito stage but not in blood stages. J Biol Chem [Internet]. 2014 Dec 12;289(50):34827–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352601

135. Shenar N, Sommerer N, Martinez J, Enjalbal C. Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides. J Mass Spectrom. 2009;44(5):621–32.

136. Smith CM, Jerkovic A, Truong TT, Foote SJ, McCarthy JS, McMorran BJ. Griseofulvin impairs intraerythrocytic growth of Plasmodium falciparum through ferrochelatase inhibition but lacks activity in an experimental human infection

study. Sci Rep [Internet]. 2017 Feb 8;7:41975. Available from: http://www.nature.com/articles/srep41975

137. Pasini EM, van den Ierssel D, Vial HJ, Kocken CHM. A novel live-dead staining methodology to study malaria parasite viability. Malar J [Internet]. 2013;12(1):190. Available from: http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-190

138. Kinoshita H, Tohira Y, Sugiyama H, Sawada M. Studies on the metabolism of Inabenfide (a new plant growth regulator) in rats I. Characterization of metabolites in rats. Xenobiotica [Internet]. 1987 Jan 30;17(8):925–39. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00498258709044191

139. Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI. N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in Toxoplasma gondii. Mol Biochem Parasitol. 2006;150(2):192–200.

140. Murakami T, Reiter LT, Lupski JR. Genomic Structure and Expression of the Human Heme A:Farnesyltransferase (COX10) Gene. Genomics [Internet]. 1997 May;42(1):161–4. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088875439794711X

141. Tzagoloff A, Nobrega M, Gorman N, Sinclair P. On the functions of the yeast COX10 and COX11 gene products. Biochem Mol Biol Int [Internet]. 1993;31(3):593–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8118433

142. Eastman RT, Fidock D a. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2009;7(12):864–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2239

143. Sun C, Li J, Cao Y, Long G, Zhou B. Two distinct and competitive pathways confer the cellcidal actions of artemisinins. Microb Cell [Internet]. 2015 Jan 5;2(1):14–25. Available from: http://microbialcell.com/researcharticles/two-distinct-and-competitive-pathways-confer-the-cellcidal-actions-of-artemisinins/

144. Muangphrom P, Seki H, Fukushima EO, Muranaka T. Artemisinin-based antimalarial research: application of biotechnology to the production of artemisinin, its mode of action, and the mechanism of resistance of Plasmodium parasites. Vol. 70, Journal of Natural Medicines. 2016. p. 318–34.

145. Borrmann S, Issifou S, Esser G, Adegnika A a, Ramharter M, Matsiegui P-B, et al. Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of Plasmodium falciparum malaria. J Infect Dis. 2004;190(9):1534–40.

146. Chakrabarti D, Silva T Da, Barger J, Paquette S, Patel H, Patterson S, et al. Protein farnesyltransferase and protein prenylation in Plasmodium falciparum. J Biol Chem. 2002;277(44):42066–73.

147. 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;285(5433):1573–6.

148. 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;45(9):2553–8.

149. Eisenreich W, Bacher a, Arigoni D, Rohdich F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. Cell Mol Life Sci. 2004;61(12):1401–26.

150. Flesch G, Rohmer M. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Eur J Biochem [Internet]. 1988;175(2):405–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14210.x

151. Lim L, McFadden GI. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010;365(1541):749–63.

152. Cheesman MR, Oganesyan VS, Watmough NJ, Butler CS, Thomson AJ. The Nature of the Exchange Coupling between High-Spin Fe(III) Heme o 3 and Cu B (II) in Escherichia c oli Quinol Oxidase, Cytochrome b o 3 : MCD and EPR Studies. J Am Chem Soc [Internet]. 2004 Apr;126(13):4157–66. Available from: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja038858m

153. Radfar A, Méndez D, Moneriz C, Linares M, Marín-García P, Puyet A, et al. Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels. Nat Protoc. 2009;4(12):1899–915.

154. Pasvol G, Wilson RJ, Smalley ME, Brown J. Separation of viable schizont-infected red cells of Plasmodium falciparum from human blood. Ann Trop Med Parasitol [Internet]. 1978 Feb;72(1):87–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/350172

155. Doménech-Carbó A, MacIuk A, Figadère B, Poupon E, Cebrián-Torrejón G. Solid-state electrochemical assay of heme-binding molecules for screening of drugs with antimalarial potential. Anal Chem. 2013;85(8):4014–21.

156. Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. The spread of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in the Greater Mekong Subregion: a molecular epidemiology observational study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2017 Feb; Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309917300488

157. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. N Engl J Med [Internet]. 2009;361(5):455–67. Available from: http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0808859#t=article

158. Jordão FM, Kimura EA, Katzin AM. Isoprenoid biosynthesis in the erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(June):134–41.

159. Yoshida Y. Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents. Curr Top Med Mycol [Internet]. 1988;2:388–418. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3288361

160. Reedy CJ, Elvekrog MM, Gibney BR. Development of a heme protein structure–electrochemical function database. Nucleic Acids Res. 2008;36:307–13.

Anexos

I - Biosynthesis of heme O in intraerythrocytic stages of P. falciparum *and inhibitors of this pathway*

Raquel M. Simão-Gurge[1]; Gerhard Wunderlich[1]; Julia Cricco[2]; Antonio Doménech-Carbó[3]; Gerardo Cebrián-Torrejón[3]; Fernando G. Almeida[1]; Brenda A. Cirulli[2]; Alejandro M. Katzin[1]

[1]Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil. [2]Institute of Molecular and Cellular Biology of Rosario (IBR), National Council of Scientific and Technical Research CONICET-Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences, National University of Rosario, Argentina. [3]Departament of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Spain.

Corresponding author: Alejandro Miguel Katzin.

E-mail address: amkatzin@icb.usp.br

Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

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

Abstract

A number of antimalarial drugs interfere in the electron transport and heme-related reactions, however, the biosynthesis of heme has not been fully elucidated in *Plasmodium* parasites. Herein, we characterized the steps that lead to the farnesylation of heme. After identification of a gene encoding for heme O synthase, we measured heme O synthesis in blood stage parasites by incorporation of radioactive precursors and identification by mass spectrometry. Heme O synthesis was inhibited by inabenfide and uniconazole–P, coincidently, parasite growth was also affected after addition of these drugs. We conclude that heme O synthesis is essential for the growth of *P. falciparum*.

Keywords: heme O, farnesylation, isoprenoid, *P. falciparum* and HOS

Introduction

Malaria is one of the most important tropical diseases and the World Health Organization counts malaria as one of the top ten causes of worldwide deaths. 200 million clinical cases occur inflicting the death of approximately 600 thousand persons every year(3). Currently, the main options in relation to disease consist of artemisinin-based compounds treatment (ACTs). That is, artemisinin in combination with other drugs such as lumefantrine or atovaquone and are the most effective ways to treat malaria(142).

Two mechanisms of action of artemisinin have been suggested: the mitochondrial dysfunction and nonspecific heme degradation(143). In the nonspecific heme degradation, two activation models (i.e., a reductive scission model and an open peroxide model) have been proposed and both of them lead to the generation of an active carbon-centered radical(144). However, emergence of rapid drug resistance to existing antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum* induce the need to search for novel targets as well as leads derived from original molecules with improved activity against validated drug targets.

One target for the evaluation of potential antimalarial is the isoprenoid synthesis, which occurs via the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway in *P. falciparum*, some plants, and most bacteria(88,145–148). In contrast, most animal cells, several eubacteria, archaea, and fungi synthesize isoprenoid precursors through the mevalonate pathway(149,150). In *P. falciparum* the biosynthesis of the first intermediates of isoprenoid synthesis occurs in the apicoplast, an organelle present in several protozoan parasites of the subphylum Apicomplexa(151).

In eukaryotic cells one of the intermediates of the isoprenoid pathway, farnesyl-pyrophosphate (FPP), is covalently added to the heme B backbone to generate heme O. Heme O is an essential molecule for several living organisms and the first intermediate in heme A synthesis. Both, heme O and heme A, are critical components of the mitochondrial electron transport chain (heme O as cofactor for terminal oxidases in *E. coli* and heme A acting as cofactor of several bacterial and all eukaryotic cytochrome c oxidases)(152), catalyzing the reduction of H_2O to O_2(29,152).

Previous studies have demonstrated that antifungal as azoles such as ketoconazole (Keto), myconazole (Myco), and clotrimazole (CLT), effectively inhibit the growth of *P. falciparum in vitro,* and the mechanism involved is related to the inhibition of heme polymerization and the degradation of reduced glutathione-dependent heme(103). A

different study showed that two other antifungals, inabenfide (INA) and uniconazole–P (UNP), inhibit activities in both apicomplexan parasites, *P. falciparum* and *Toxoplasma gondii*(104). These drugs act by inhibiting isoprenic products in plants, however, in *P. falciparum* the mode of action of these drugs is unknown.

The aim of this work was to determine the presence of an active biosynthesis pathway of heme O and to analyze the effect of potential inhibitors.

Materials and methods

P. falciparum culture

The *P. falciparum* clone 3D7 was cultured *in vitro* according to the method of Trager and Jensen(109) where human sera was substituted by Albumax I (0.5%)(153). A gas mixture of 5% CO_2, 5% O_2, and 90% N_2 was injected into bottles of 75 cm^3. The cultures (approximately 15% parasitemia) were initially synchronized in ring stages (1–10h after invasion) by two treatments with 5% (w/v) D-sorbitol solution in water. The parasites were maintained in culture until the development of trophozoites (20–24h after reinvasion) or schizonts (30–35h after reinvasion) and then synchronized with Plasmagel®(154).

Metabolic labeling

Synchronous cultures of *P. falciparum* were labeled with [1-(n)-^{3}H]-geranylgeranyl pyrophosphate ([1-(n)-^{3}H]-GGPP) (3.125 µCi/mL, 16.5 Ci/mmol, Amersham, Bioscience, UK) or [1-(n)-^{3}H]-farnesyl pyrophosphate ([1-(n)-^{3}H]-FPP) (3.125 µCi/mL, 14.0 Ci/mmol, Amersham, Bioscience, UK) or [1-(n)-^{14}C]-glycine (112.7 µCi/mL, 112.7 mCi/mmol, Amersham, Bioscience, UK) in normal RPMI 1640 medium at trophozoite stages (20% parasitemia) for 10–14 h and were then recovered at schizont stages. Subsequently, the parasite cultures were centrifuged at 800xg for 10 min at 22°C. The intraerythrocytic stages were purified by magnetic columns(112) and submitted to different extraction methods to gibberellin or heme B/heme O, further described below. As a control, the same procedure was carried out with uninfected erythrocytes.

Extraction of Gibberellin

For extraction of gibberellin, schizont stages labelled with [1-(n)-^{3}H]-GGPP as described above were purified by magnetic columns and homogenized with solution 1.0 M Tris-HCl pH 7.2 plus 2% Triton X-100 and incubated for one hour, at 4ºC. After centrifugation (25 min, 8.000x*g* a 4°C), the supernatant was adjusted to pH 2.5. The separation procedure

between the remaining aqueous extract and the diethyl-ether phase was conducted using the method described by Barthe and Bulard, 1978(113) and this fraction was denominated PfexG.

RP-HPLC

The separation of Gibberellin by gradient RP-HPLC was adapted from the isocratic system described by Bhalla and Singh, 2010(114), where the solvent is initially 100% acetonitrile (ACN) and 100% H_2O, at a flow of 0.5 ml/min for 45 min at 30°C in column YMC C18 ODS-A – 5 µ 300 Å 3.0 mm x 150 mm. The wavelength used for analysis is 206 nm and commercial gibberellin 4 (GA4) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany- 48870) was used as standard.
PfexG was co-injected with standard GA4 and were chromatographed by RP-HPLC. The samples were dried at 50°C and were resuspended in 0.5 mL of liquid scintillation liquid (Betaplate Scint, Perkin Elmer, Finland) and analyzed in a Beckman® scintillator unit.

In silico analysis

The genome of *P. falciparum* was obtained from *Plasmodium* Genomic Resource DataBase (http://plasmodb.org/plasmo/). Sequences from the 'Tritryps' genome projects were obtained at GeneDB (http://www.genedb.org/) and TriTrypDB (http://tritrypdb.org/tritrypdb/)(116). The *S. cerevisiae* sequence *ScCOX10* (YPL172C) was obtained from the *Saccharomyces* Genome Database (www.yeastgenome.org). The *E. coli* sequence (NC_000913.3), *B. subtilis* sequence (NC_000964.3), *A. thaliana* sequence (NM_130015.3) and *Homo sapiens* sequence (NM_001303.3) were obtained from NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

For multiple amino acid sequence alignments, Clustal w 2.0.12 software was used(117). The similarity and identity percentages were calculated using the *Ident and Sim* software (http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html).

The transmembrane domain predictions for Cox10 enzymes were generated using the software for topology prediction TMHMM 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/).

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 6 software(118).

Heme O Standard Preparation

Heme O is not commercially accessible. The expression vector pET3a containing the CtaB sequence of *Bacillus subtilis* was used to transform *E. coli* strain BL21 in order to preparation heme O. Heme O extraction of transformed bacteria was done with acetone and hydrochloric acid and heme O was separated on Sep-Pak Vac C18 columns (Waters Corporation, Milford, Massachusetts USA), further described below. The purity of the fractions eluted by 80% ACN and DMSO from the bacterial extract was checked by mass spectrometry as described below.

Extraction of heme B and heme O

For extraction of heme B and O, schizont stages labelled with [1-(n)-^{3}H]-FPP or [1-(n)-^{14}C]-glycine and purified by magnetic columns or bacterial transform, were lysed with 0.1% saponin and resuspended in 0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 10% sucrose. After resuspension, a mixture of acetone/HCl (95:5) was added in a proportion - 40% of the lysate/60% acetone/HCl and kept on ice for 90 min. Then, the solution with parasite or bacterial was centrifuged at 8.000xg for 10 min at 4°C to extract heme B and heme O. Uninfected erythrocytes labeled with the same radioactive tracers and processed in equal conditions were used as control. In total, 1x 10^{9} schizont stage parasites and the same quantity of uninfected erythrocytes were processed in the same way for analysis in mass spectrometry.

Separation of heme B and heme O

The separation of hemes was performed using Waters Sep-Pak® C18 Vac columns. The column was pre-washed with 2 mL of 25% ACN. The supernatant from the heme extraction was collected and passed through this column. Then, the column was washed with 5mL of 25% ACN. After washing, 80% ACN was used to elute heme B and DMSO was used to elute heme O. For bacteria, the volume of solvents used was three times higher.

Mass Spectrometry

MALDI-TOF

The samples were analyzed in a MALDI-TOF Autoflex speed smartbeam mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using FlexControl software (version 3.3, Bruker Daltonics). Spectra were recorded in the positive reflector mode (laser frequency, 500 Hz; extraction delay time, 130 ns; ion source 1 voltage, 19.0 kV; ion source

2 voltage, 16.8 kV; lens voltage, 7.9 kV; reflector 1 21.0 kV; reflector 2 9.35 kV; mass range, 500 to 2500 Da). For each spectrum 5000 shots, in 500-shot steps, were summed from different positions of the target, collected and analyzed. All spectra were calibrated by using Peptide Calibration Standard (Bradykinin [M+H]+ = 757.3991, Angiotensin II [M+H]+ = 1046.5418, Angiotensin I [M+H]+ = 1296.6848, Substance P [M+H]+ = 1347.7354, Bombesin [M+H]+ = 1619.8223, Renin Substrate [M+H]+ = 1758.9326, ACTH clip 1-17 [M+H]+ = 2093.0862, ACTH clip 18-39 [M+H]+ = 2465.1983) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

For MS/MS experiments, the instrument was set to LIFT mode (laser frequency, 200 Hz; extraction delay time, 120 ns; ion source 1 voltage, 6.0 kV; ion source 2 voltage, 5.3 kV; lens voltage, 3.0 kV; reflector 1, 27.0 kV; reflector 2, 11.6 kV; lift 1, 19.0 kV and lift 2, 4.40 kV) and 2000 shots were summed in 500-shot steps for each acquired spectrum.

LC-MS/MS

Heme samples were analyzed in a LC-MS system composed by an ACCELA 600 quaternary pump LC connected to a triple quadrupole mass spectrometer TSQ Quantum Max (Thermo Scientific, Bremen, Germany) via an ESI ionization source.

The separation was performed using a Hypersil Gold C18 Column (100 × 2.1 mm, i.d., 5 μm - Thermo Scientific, Bremen, Germany). The column temperature was kept at 25°C. Injection volume was 5 μL.

The mobile phase used to separate the compounds consisted of water with 0.02% of acetic acid (A) and ACN with 0.02% of acetic acid (B). The composition of solvent B varied as follows: 0-2 min, held at 10%; 2-20 min, from 10 to 90% linear gradient; 20-30 min, held at 10%. The flow rate was 0.2 mL/min.

TSQ Quantum Max mass spectrometer was operated on product ion MS scan mode, in positive polarity. The MS operating parameters were spray voltage 3500 V, vaporizer temperature 375°C, sheath gas pressure 60 (arbitrary units), ion sweep gas pressure 2.0 (arbitrary units), auxiliary gas pressure 55 (arbitrary units); capillary temperature 224°C, capillary offset 35 V.

Electrochemical study

Electrochemical measurements were performed at 298±1 K in a thermostatic cell with a CH 660I equipment. A BAS MF2012 glassy carbon working electrode (GCE) (geometrical

area 0.071 cm^2), a platinum wire auxiliary electrode and an AgCl (3M NaCl)/Ag reference electrode were used in a conventional three-electrode arrangement. Cyclic and square wave voltammetry (CV and SWV, respectively) were used as detection modes. Eventually, derivative convolution of data was performed in order to increase peak resolution.

Thin films of lyophilized erythrocytes, parasitized erythrocytes, treated with INA 2,0 µM or UNP 20 µM and untreated, were prepared on glassy carbon electrodes following the previously reported procedure(155). Essentially, 20 µL of dispersed erythrocyte material (1mg/mL) in ethanol was applied and the solvent was allowed to evaporate. As a result, a uniform, fine coating was adhered to the basal electrode. Aqueous, 0.10 M potassium phosphate buffered saline (PBS) at a physiological pH 7.2, previously degassed by bubbling Argon for 10 min, was used as a supporting electrolyte.

Inhibition tests with INA and UNP

Toyama et al(104) determine the IC_{50} for INA and UNP. Three concentrations of each a lower and higher concentration as well as the value of the IC_{50} were evaluated and confirmed in our laboratory, and two controls, one without the drug and another with the vehicle were used.

Another test was conducted in order to evaluate whether the inhibition of parasite growth caused by INA and UNP was reversible. For this, different concentrations of gibberellin (G4) were added to cultures.

After confirmation of IC_{50}, the parasite culture was treated with the drugs (INA 2.0 µM and UNP 20 µM,) for a total of 48 h and labeled with radioactive precursor [1-(n)-^{3}H]-FPP or [U-^{14}C]-glycine for the last 12 h in the presence of INA and UNP. Biosynthesis of heme B and heme O were analyzed in Waters Sep-Pak® C18 Vac columns. The same amounts of treated and untreated parasites were applied on the column.

The resulting samples were processed as described above, air-dried at 50°C and resuspended in 0.5 mL of scintillation liquid (Betaplate Scint, Perkin Elmer, Finland) and analyzed in a Beckman® scintillator unit.

Statistical Analysis

For variables with normal distribution, Student's t-test was applied to compare means between untreated infected erythrocytes and INA or UNP treated infected erythrocytes. Statistical analyses were realized using GraphPad PRISM® 5.3 software.

Results and discussion

Unfortunately, reports of looming resistance to artemisinin and its derivatives is a major concern(156,157) and turns urgent not only the contention of artemisinin non-responsive parasites but also the elucidation of exploitable drug targets and the concurrent development of new drugs. For this, a thorough study of the parasite biochemistry is essential.

Therefore our group has been studying the biosynthesis of derivatives of the isoprenoid pathway in *P. falciparum*(158). Despite the fact that the intraerythrocytic parasite lives in an environment that is particularly rich in heme, it has maintained its own heme synthesis pathway. However, unlike heme, heme O and/or heme A cannot be obtained from the host and are essential in other organisms, this which makes the characterization of heme farnesylation so attractive.

For the characterization of heme O, we identified a gene encoding a protein with sequence homology to the heme O synthase (HOS) in the genome of *P. falciparum*, an enzyme required for farnesylation of heme. In order to prove that the identified gene really encodes a functional HOS, we conducted experiments to detect metabolites of this enzyme.

The sequence identified in the *P. falciparum* genome which encodes a putative HOS, PF3D7_1435000, shares more than 60% amino acid similarity to previously characterized enzymes from other organisms. Furthermore, the residues considered relevant for catalytic activity of HOS were conserved in the *P. falciparum* sequence; these are N364, R380, R384 and H488(100,130). The sequence was scanned for potential transmembrane regions and 7 were identified in PF3D7_1435000, similar also to other HOS (data not shown). A phylogenetic tree (supplemental data) showing the evolutionary relationship between different HOS sequences revealed a close relationship between *P. falciparum* and *S. cerevisiae* enzymes. Enzyme Cox10 from *S. cerevisiae* has been characterized and demonstrated that it has HOS activity. These data strongly suggest PF3D7_1435000 encodes for a HOS in *P. falciparum*.

We then characterized heme O by metabolic labeling with [1-(n)-^{3}H]-FPP (direct precursor for the formation of heme O) and with [U-^{14}C]-glycine (initial precursor of the heme pathway). Detection of radiolabeled heme O and heme B from schizonts showed that there is active synthesis of heme B and heme O (Figure 1), unlike what happened in non-

parasitized erythrocytes. Like heme B biosynthesis was already known, we used this data as a positive control of the experiment(93).

In order to confirm the presence of heme O in unlabeled parasites extracts, two different analyses were performed using mass spectrometry (Figure 2 and 3). For this purpose, a LC-MS method was developed, as described in the methods section, setting the instrument to perform the product ions for the compound including m/z 839, as shown in Figure 2B. The presented spectrum is extracted from the peak at retention time 11.58 and the two most intense ion products are m/z 737 and m/z 671.

Complementarily, a MALDI-TOF/TOF analysis was carried out and the result is presented at Figure 3. In this spectrum, the ion m/z 839 is also present confirming the presence of heme O in the parasite extract sample.

It is important to mention that we have used two different types of instruments and consequently, two different ionization methods, Electrospray (ESI) for the LC-MS method and MALDI. Besides, the fragmentation pattern is different in these instruments, that is the reason we have different ion products(135) for the same parent ion m/z 839 of heme O.

Additionally, Mass Frontier (Thermo Scientific TM) software was used to predict the possible structures for the ions products obtained from ion m/z 839. The structures obtained are in agreement with experimental data and are shown in Figure 4.

Once by comparing: the acquired spectra from extracts of transformed bacteria expressing the *Bacillus subtilis* CtaB protein, which corresponds to heme O synthase; and spectra from parasites extract, we observed in both samples the ion m/z 617 corresponding to heme B (supplementary data), positive control of our experiments, showing that mass spectrometric analysis is a reliable methodology.

During the experiments to characterize the production of heme O in *P. falciparum* we confirmed the heme biosynthetic pathway (we use this data as a positive control). However, this heme biosynthetic pathway is not essential for the parasite in the asexual stage according to Ke et al., 2014(134). The reason why the parasite has this pathway still active in the asexual stage is intriguing because: heme-free may be toxic to the parasite; and heme biosynthesized endogenously in the parasites is much lower than its production via hemoglobin digestion. Maybe it needs to keep this pathway active due to the essentiality of heme to form the farnesylated heme.

Another possibility is it possible that “blood-heme” can´t come out of the digestive vacuole due to the complexed Fe^{2+} which is too toxic to even enter in a transporter. However in a study of the role of the dual heme sources in malaria parasite growth and development were knocked out the first enzyme, δ-aminolevulinate synthase (ALAS), and the last enzyme, ferrochelatase (FC), in the heme-biosynthetic pathway of *Plasmodium berghei* (Pb). The wild-type and knockout (KO) parasites had similar intraerythrocytic growth patterns in mice. It was carried out *in vitro* radiolabeling of heme in Pb-infected mouse reticulocytes and *Plasmodium falciparum*-infected human RBCs using [4-^{14}C]-aminolevulinic acid (ALA) and found that the parasites incorporated both host hemoglobin-heme and parasite-synthesized heme into hemozoin and mitochondrial cytochromes. The similar fates of the two heme’s sources suggest that they may serve as backup mechanisms to provide heme in the intraerythrocytic stages(61).

Having shown the existence of heme O synthesis, we set out to discover if the drug INA and UNP which perturb organelle structure and food vacuole morphology in schizonts(104) specifically interferes with heme or heme O synthesis.

In plants, INA and UNP interrupts ent-kaurene oxidase (KO), a member of the cytochrome P450 monooxygenase family (CYP), catalyzes three successive oxidations of the 4-methyl group of ent-kaurene giving kaurenoic acid, a key step in gibberellins (GAs) biosynthesis(159).

Since a number of plant-exclusive isoprenic metabolites have also been found in *P. falciparum*, we investigated the possible route of gibberellin biosynthesis. However, we were unable to find hints of gibberellin synthesis The results obtained by metabolic-labeling and recovery test where culture is treated with INA or UNP and enriched with product theoretically inhibited, in this case GA4 were negative (data not shown),. For this reason we decided to investigate whether INA and UNP, drugs that affect the parasite growth, would interfere with the heme pathway like others antifungals do.

Thereunto, we starting teste for observed if INA and UNP were inhibiting the heme B/or heme O biosynthesis. We conducted an electrochemical oxidation/reduction test to verify if these drugs were interfering in any way with heme. Figure 5 compares the cyclic voltammograms recorded at paraffin-impregnated graphite electrodes modified with healthy and *Plasmodium*-infected erythrocytes immersed into PBS at pH 7.2. The voltammetric response of the uninfected erythrocyte sample is dominated by a main couple

with peaks at –0.34 (cathodic, C_1) and –0.26 V (anodic, A_1) which can be attributed to the Fe(III)-heme/Fe(II)-heme one-electron interconversion with a high degree of reversibility.

The voltammetry of *Plasmodium*-infected erythrocytes exhibits remarkable differences. As shown in Figure 5b, in initial cathodic scan voltammograms the peak C_1 becomes diminished and accompanied by cathodic peaks at –0.60 (C_2) and –0.75 V (C_3). In the subsequent reverse scan, the peak A_1 is accompanied by a broad anodic peak at –0.15 V (A_2). This voltammetry can be interpreted in terms of the appearance of a Fe(III)/Fe(II) couple (C_2/A_2) corresponding to Fe-heme species, resulting from the *Plasmodium* infection, different from those responsible of the C_1/A_1 couple, as judged upon comparison of electrochemical responses depicted in Figure 6, where square wave voltammograms of uninfected erythrocytes and *Plasmodium*-infected erythrocytes are depicted.

The midpeak potential of the C_2/A_2 couple was ca. 150 mV negatively shifted relative to the midpeak potential of the C_2/A_2 couple, a value consistent with the assignment of the former to heme O(160)

The effect of the INA and UNP on *Plasmodium*-infected erythrocytes is illustrated in Figure 7, where square wave voltammograms of paraffin-impregnated graphite electrodes modified with: a) uninfected erythrocytes plus INA, b) uninfected erythrocytes plus UNP; c) *Plasmodium*-infected erythrocytes plus INA; d) *Plasmodium*-infected erythrocytes plus UNP, are shown. Healthy erythrocytes display the typical features of uninfected erythrocytes (see Figure 5a), consisting of a main peak at ca. –0.35 V (C_1), whereas the samples of infected erythrocytes treated with INA and UNP show this peak accompanied by the signal C_2. The relevant point to emphasize is that the voltammograms of these samples clearly differ from that of the untreated infected erythrocytes. When comparing Figure 7c, 7d with Figure 5b, one can see that in the former the C_2 peak is significantly lowered. These results suggest that INA and UNP interfere in the heme pathway blocking the synthesis of heme O, and that this mechanism causes decreased parasitemia over 48 hours.

We conclude that the drugs interfere in the heme group, as demonstrated by electrochemistry. In order to confirm this result, we conducted a metabolic assay with schizonts labeled with [1-(n)-^{3}H]-FPP or [U-^{14}C]-glycine treated with INA and UNP at a concentration below the IC_{50}. This assured that in the end of the treatment there was a number of viable parasites, but the concentration used was still sufficient to partially inhibit

parasite growth (Figures 8 and 9). Each extract of labeled schizonts was analyzed by Waters Sep-Pak® C18 Vac columns. Although there was a tendency of inhibition, INA and UNP did not interfere in heme B biosynthesis (figure 8B). This was evidenced by the difference in the incorporation of radioactive precursors, for heme B biosynthesis, in parasites treated with the drugs which was not significant in relation to the untreated ones. Since the parasites are able to acquire heme from the host it would not be a hindrance to the parasite(29). This means that if the parasite's heme biosynthesis is inhibited there would be no effect assuming that the parasite would recover heme from the host.

However, in the presence of INA and UNP: electrochemical analysis showed interference in the formation of heme O and metabolic labeling with the track precursor (figure 8A and 9) showed that there was a significant reduction in the biosynthesis of heme O, which implies that the decline of parasitaemia in the culture treated with INA and UNP is due to the prevention of heme O formation. INA and UNP treatment led to a significant decrease in the production of heme O, shown both by labeling with [1-(n)-^{3}H]-FPP or [U-^{14}C]-glycine, and this indicates that perhaps farnesylation is inhibited.

Conclusion

In this study, we demonstrated that *P. falciparum* has an active biosynthetic pathway for the production of heme O as well as heme B. Further, we provided evidence that INA and UNP are responsible for the inhibition of heme B farnesylation. In consequence, with less heme O, a decrease in parasitemia is observed. We propose that this pathway is a valid target for new drugs. The regulatory mechanisms that orchestrate heme metabolism of parasites remain poorly understood and are a frontier for future discovery.

Acknowledgements

The authors would like to thank S.Wendel (Sírio Libanês Hospital, NESTA) for the gift of erythrocytes and John Wright of Michigan State University for the gift the expression vector pET3a containing the CtaB sequence of *Bacillus subtilis* R.M.S.G. is fellow from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). This research was supported by grants from FAPESP and CNPq.

Author Contributions

AMK, GW and JC conceived and supervised the study; RMSG, BAC, FGA, GCT and ADDC designed experiments; RMSG, BAC, FGA, GCT and ADDC performed experiments; JC, GCT and ADDC provided new tools and reagents; RMSG, BAC, FGA, GCT and ADDC analyzed data; RMSG, AMK and GW wrote the manuscript; RMSG, AMK, GW, JC, BAC, FGA, GCT and ADDC made manuscript revisions.

References

1. WHO. *World malaria report 2014*. *World Health* **WHO/HTM/GM,** (2014).
2. Eastman, R. T. & Fidock, D. a. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat. Rev. Microbiol.* **7,** 864–874 (2009).
3. Sun, C., Li, J., Cao, Y., Long, G. & Zhou, B. Two distinct and competitive pathways confer the cellcidal actions of artemisinins. *Microb. Cell* **2,** 14–25 (2015).
4. Muangphrom, P., Seki, H., Fukushima, E. O. & Muranaka, T. Artemisinin-based antimalarial research: application of biotechnology to the production of artemisinin, its mode of action, and the mechanism of resistance of Plasmodium parasites. *Journal of Natural Medicines* **70,** 318–334 (2016).
5. Borrmann, S. *et al.* Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of Plasmodium falciparum malaria. *J. Infect. Dis.* **190,** 1534–1540 (2004).
6. Cassera, M. B. *et al.* The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum. *J. Biol. Chem.* **279,** 51749–51759 (2004).
7. Chakrabarti, D. *et al.* Protein farnesyltransferase and protein prenylation in Plasmodium falciparum. *J. Biol. Chem.* **277,** 42066–42073 (2002).
8. Jomaa, H. *et al.* Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285,** 1573–1576 (1999).
9. Moura, I. C. *et al.* Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in Plasmodium falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45,** 2553–2558 (2001).
10. Eisenreich, W., Bacher, a, Arigoni, D. & Rohdich, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **61,** 1401–1426 (2004).
11. Flesch, G. & Rohmer, M. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. *Eur. J. Biochem.* **175,** 405–411 (1988).
12. Lim, L. & McFadden, G. I. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **365,** 749–763 (2010).
13. Cheesman, M. R., Oganesyan, V. S., Watmough, N. J., Butler, C. S. & Thomson, A. J. The Nature of the Exchange Coupling between High-Spin Fe(III) Heme o 3 and Cu B (II) in Escherichia c oli Quinol Oxidase, Cytochrome b o 3 : MCD and EPR Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **126,** 4157–4166 (2004).
14. van Dooren, G. G., Kennedy, A. T. & McFadden, G. I. The use and abuse of heme in apicomplexan parasites. *Antioxid. Redox Signal.* **17,** 634–56 (2012).
15. Huy, N. T. *et al.* Effect of antifungal azoles on the heme detoxification system of malarial parasite. *J. Biochem.* **131,** 437–44 (2002).
16. Toyama, T. *et al.* Gibberellin biosynthetic inhibitors make human malaria parasite Plasmodium falciparum cells swell and rupture to death. *PLoS One* **7,** (2012).
17. Trager, W. & Jenson, J. B. Cultivation of malarial parasites. *Nature* **273,** 621–2 (1978).
18. Radfar, A. *et al.* Synchronous culture of Plasmodium falciparum at high parasitemia levels. *Nat. Protoc.* **4,** 1899–1915 (2009).
19. Pasvol, G., Wilson, R. J., Smalley, M. E. & Brown, J. Separation of viable schizont-

infected red cells of Plasmodium falciparum from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72,** 87–8 (1978).

20. Karl, S., Davis, T. M. E. & St Pierre, T. G. Parameterization of high magnetic field gradient fractionation columns for applications with Plasmodium falciparum infected human erythrocytes. *Malar. J.* **9,** 116 (2010).
21. Barthe, P. & Bulard, C. Bound and Free Abscisic Acid Levels in Dormant and After-ripened Embryos of Pyrus malus L. cv. Golden delicious. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **90,** 201–208 (1978).
22. Bhalla, K., Singh, S. B. & Agarwal, R. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing Fusarium strains. *Environ. Monit. Assess.* **167,** 515–520 (2010).
23. Aslett, M. *et al.* TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* **38,** (2009).
24. Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **Chapter 2,** Unit 2.3 (2002).
25. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30,** 2725–2729 (2013).
26. Doménech-Carbó, A., MacIuk, A., Figadère, B., Poupon, E. & Cebrián-Torrejón, G. Solid-state electrochemical assay of heme-binding molecules for screening of drugs with antimalarial potential. *Anal. Chem.* **85,** 4014–4021 (2013).
27. Imwong, M. *et al.* The spread of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in the Greater Mekong Subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect. Dis.* (2017). doi:10.1016/S1473-3099(17)30048-8
28. Dondorp, A. M. *et al.* Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *N. Engl. J. Med.* **361,** 455–67 (2009).
29. Jordão, F. M., Kimura, E. A. & Katzin, A. M. Isoprenoid biosynthesis in the erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106,** 134–141 (2011).
30. Bestwick, M., Khalimonchuk, O., Pierrel, F. & Winge, D. R. The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10. *Mol. Cell. Biol.* **30,** 172–85 (2010).
31. Buchensky, C., Almirón, P., Mantilla, B. S., Silber, A. M. & Cricco, J. A. The Trypanosoma cruzi proteins TcCox10 and TcCox15 catalyze the formation of heme A in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiology Letters* **312,** 133–141 (2010).
32. Brown, K. R., Allan, B. M., Do, P. & Hegg, E. L. Identification of novel hemes generated by heme A synthase: Evidence for two successive monooxygenase reactions. *Biochemistry* **41,** 10906–10913 (2002).
33. Shenar, N., Sommerer, N., Martinez, J. & Enjalbal, C. Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides. *J. Mass Spectrom.* **44,** 621–632 (2009).
34. Ke, H. *et al.* The heme biosynthesis pathway is essential for Plasmodium falciparum development in mosquito stage but not in blood stages. *J. Biol. Chem.* **289,** 34827–37 (2014).
35. Nagaraj, V. A. *et al.* Malaria Parasite-Synthesized Heme Is Essential in the Mosquito and Liver Stages and Complements Host Heme in the Blood Stages of Infection. *PLoS Pathog.* **9,** (2013).
36. Yoshida, Y. Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents. *Curr Top Med Mycol* **2,** 388–418 (1988).
37. Reedy, C. J., Elvekrog, M. M. & Gibney, B. R. Development of a heme protein structure–electrochemical function database. *Nucleic Acids Res.* **36,** 307–313 2008).

Figures

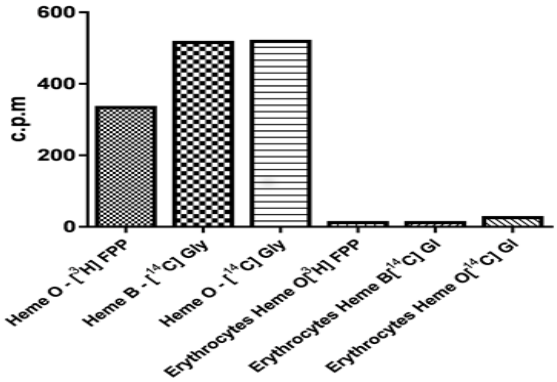

Figure 1: Biosynthesis of heme O by *P. falciparum*. The extract of parasitized erythrocytes and non-parasitized erythrocytes were labeled with [1-(n)-^{3}H]-FPP or with [U-^{14}C]-glycine, purified by affinity column and analyzed by a scintillator. Thus it was possible to observe that: the fraction eluted by 80% ACN which separates heme B, presents radioactive incorporation of glycine; and the fraction eluted by DMSO from which we obtain heme O, presents radioactive incorporation for both radioactive precursors. **Heme O-[^{3}H]FPP**: extract of parasitized erythrocytes labeled with [1-(n)-^{3}H]-FPP and eluted with DMSO; **Heme B-[^{14}C]Gly**: extract of parasitized erythrocytes labeled with [U-^{14}C]-glycine eluted with 80% ACN; **Heme O-[^{14}C]Gly**: extract of parasitized erythrocytes labeled with [U-^{14}C]-glycine eluted with DMSO; **Erythrocytes Heme O-[^{3}H]FPP**: extract erythrocytes labeled with [1-(n)-^{3}H]-FPP and eluted with DMSO; **Erythrocytes Heme B-[^{14}C]Gl**: extract of erythrocytes labeled with [U-^{14}C]-glycine eluted with 80% ACN; **Erythrocytes Heme O-[^{14}C]Gl**: extract of erythrocytes labeled with [U-^{14}C]-glycine eluted with DMSO.

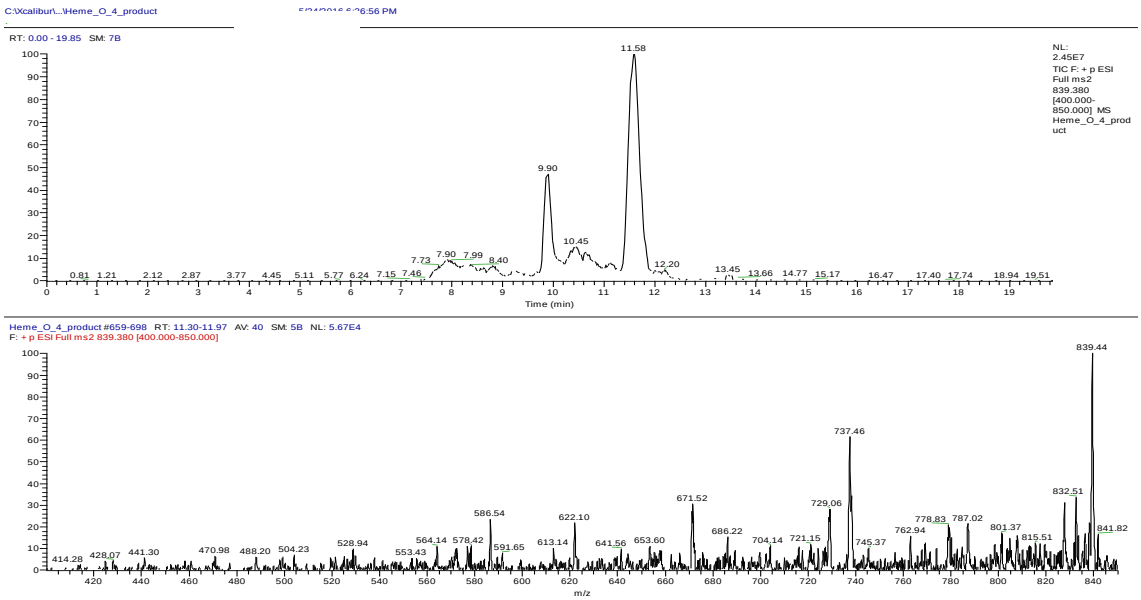

Figure 2 (A) and (B): LC/MS analysis of parasite extracts. The *heme were separated by Waters Sep-Pak C18 Vac columns and eluted with 80% ACN and DMSO, respectively, to separate the products heme B and O*, showing the m/z of heme O (arrow, 839.405, compatible with its calculated mass).

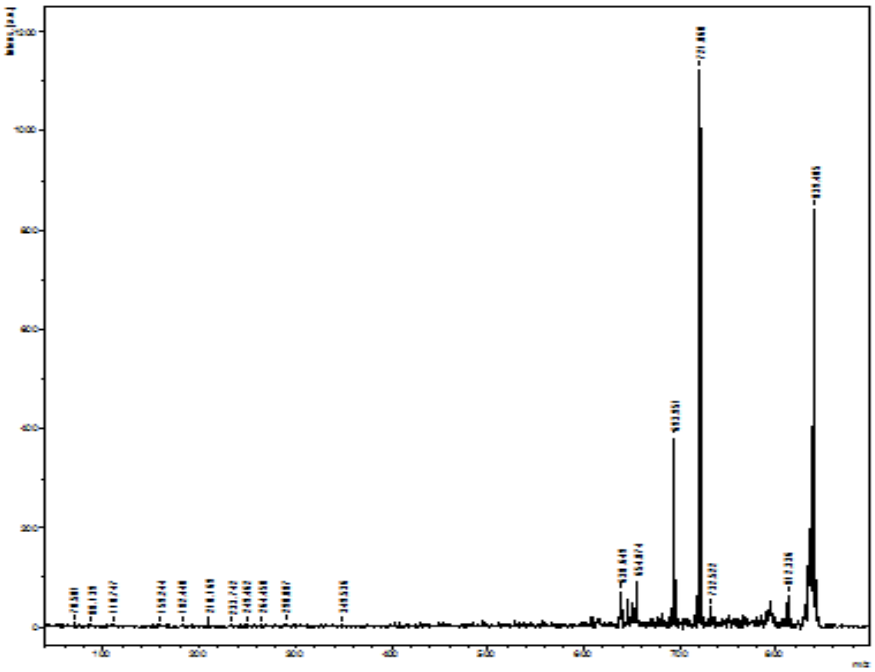

Figure 3: MALDI-TOF/TOF analysis of parasite extracts. The *hemes were separated by Waters Sep-Pak C18 Vac columns and eluted with 80% ACN and DMSO, respectively, to separate the products heme B and O*, showing a peak with the mass of 839.405 compatible with heme O.

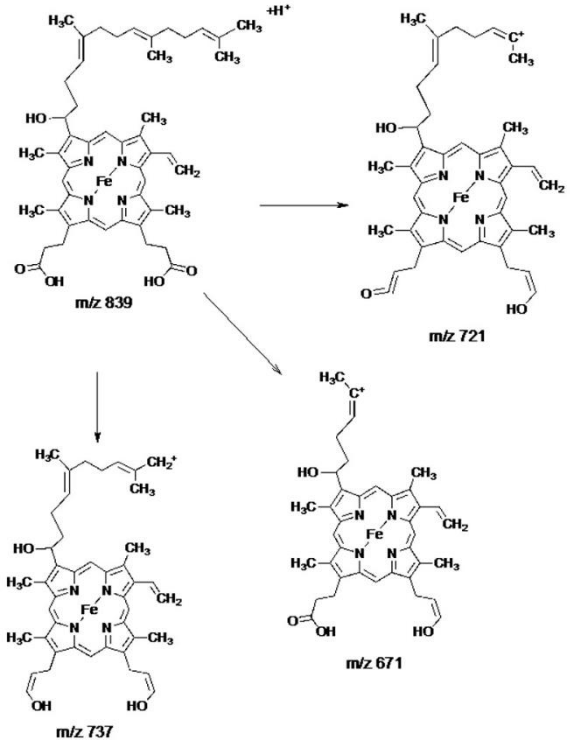

Figure 4: Predicted heme O product ion structures. The structures generated by Mass Frontier software (Thermo Scientific TM).

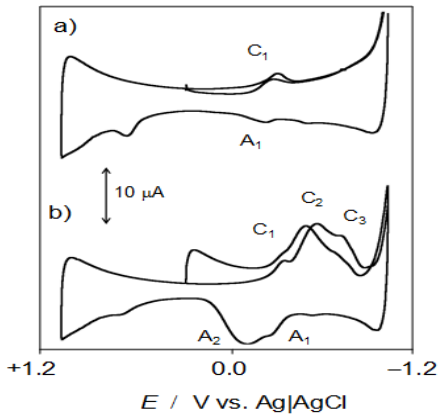

Figure 5: Cyclic voltammograms of paraffin-impregnated graphite electrodes modified with: a) erythrocytes uninfected and b) *P. falciparum*-infected erythrocytes in contact with 0.1 M PBS at pH 7.4. Potential scan rate 50mV/s. Semi-derivative convolution was performed for increasing signal resolution.

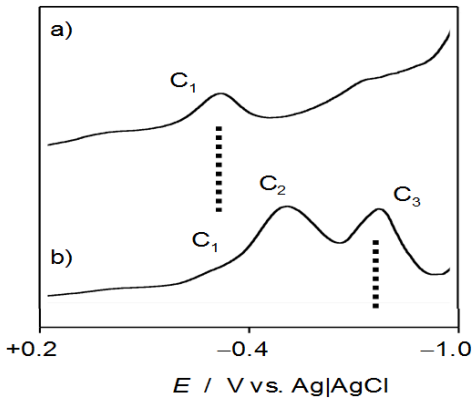

Figure 6: Square wave voltammograms of paraffin-impregnated graphite electrodes modified with: a) uninfected erythrocytes, b) *P. falciparum*-infected erythrocytes. Potential scan initiated at +0.2V in the negative direction; potential step increment was 4mV; square wave amplitude 25mV at a frequency of 5 Hz.

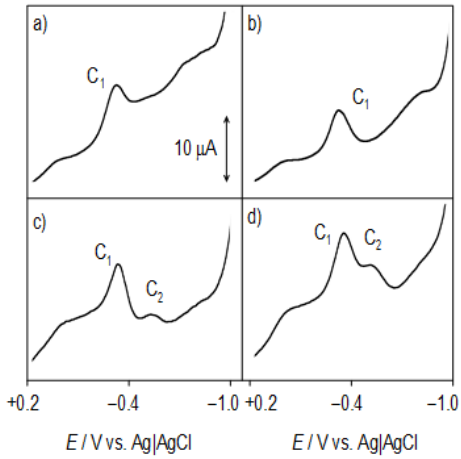

Figure 7: Square wave voltammograms of paraffin-impregnated graphite electrodes modified with: a) uninfected erythrocytes plus INA, b) uninfected erythrocytes plus UNP 20.0µM; c) *Plasmodium*-infected erythrocytes plus INA 2.0 µM; d) *Plasmodium*-infected erythrocytes plus UNP in contact with 0.1 M PBS at pH 7.4. Potential scan initiated at +0.2V in the negative direction; potential step increment 4mV; square wave amplitude 25mV; frequency 5Hz.

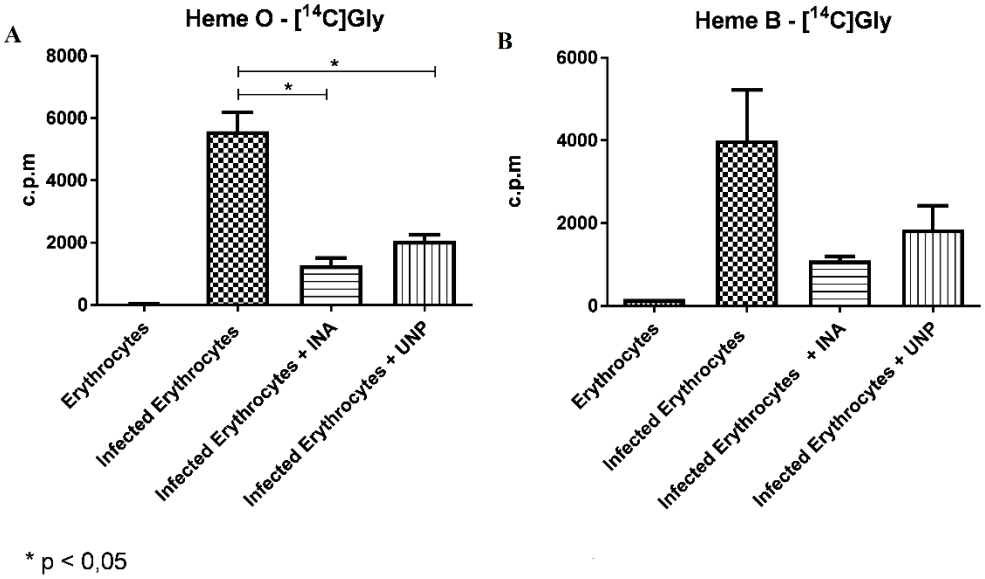

Figure 8: Inhibition of heme O biosynthesis in parasites treated for 48h with INA or UNP. Cultures of *P. falciparum* treated with INA 2.0 µM or 20 µM UNP and labelled with [U-^{14}C]-glycine. The extract of labeled schizonts was analyzed by Waters Sep-Pak® C18 Vac columns. (A) heme O was detected in untreated parasite (**Infected Erythrocytes**) and in parasite treated with INA (**Infected Erythrocytes+INA**) the inhibition was around 76% ($p<0.05$) and in parasite treated with UNP (Infected **Erythrocytes+UNP**) the inhibition was around 64% ($p<0.05$), **Erythrocytes**: uninfected erythrocytes; (B) heme B was detected in untreated parasite (**Infected Erythrocytes**) and in parasite treated with INA (**Infected Erythrocytes+INA**) the inhibition was around 75% and in parasite treated with UNP (Infected **Erythrocytes+UNP**) the inhibition was around 54%, No significant differences were observed in the inhibition of heme B, **Erythrocytes**: uninfected erythrocytes.

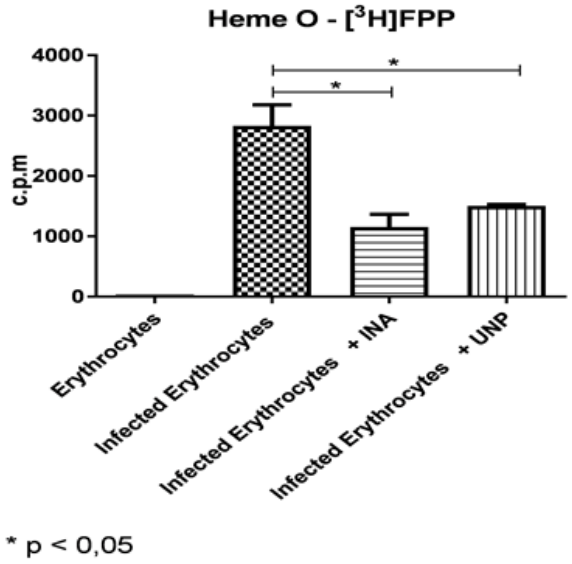

Figure 9: Inhibition of heme O biosynthesis in parasites treated for 48h with INA or UNP. Cultures of *P. falciparum* treated with INA 2.0 µM or 20 µM UNP and labelled with [^{3}H]-FPP. The extract of labeled schizonts was analyzed by Waters Sep-Pak® C18 Vac columns. Heme O was detected in untreated parasite **(Infected Erythrocytes**) and in parasite treated with INA (**Infected Erythrocytes+INA**) the inhibition was around 58% ($p<0.05$) and in parasite treated with UNP (Infected **Erythrocytes+UNP**) the inhibition was around 52.5% ($p<0.05$), **Erythrocytes**: uninfected erythrocytes.

II – Preliminary studies of biosynthesis of heme O and heme A in intraerythrocytic stages of P. falciparum.

Simão-Gurge *et al. Malaria Journal* 2014, **13**(Suppl 1):P82
http://www.malariajournal.com/content/13/S1/P82

MALARIA JOURNAL

POSTER PRESENTATION Open Access

Preliminary studies of biosynthesis of heme O and heme A in intraerythrocytic stages of *P. falciparum*

Raquel Simão-Gurge[1*], Julia Cricco[2], Gerhard Wunderlich[1], Emilia Kimura[1], Brenda Cirulli[2], Alejandro Katzin[1]

From Challanges in malaria research: Core science and innovation
Oxford, UK. 22-24 September 2014

Background

Intermediates of the isoprenoid metabolism can bind to heme groups. Heme is critical and its derivatives, heme O and heme A, are the main compounds of aerobic respiration. They are synthesized by farnesylation of heme groups by "heme O synthase" (HOS or Cox10) and "heme A synthase" (HAS or Cox15). The identification of heme O and heme A and characterization of enzymes involved in their synthesis are important for exploring the possible products biosynthesized by the parasite derived from the MEP pathway. Importantly, hemes A and O are essential molecules for numerous living organisms, since they are critical components of the mitochondrial electron transport chain, catalyzing the reduction of O_2 to H_2O. Additionally, the heme group is an important target of drugs such as artemisinin and quinolines.

Methods

The characterization of heme O in *P. falciparum* was done by two different methods using metabolic labeling with [^{3}H] FPP and [^{14}C] Glycine followed by extraction and separation through a C18 column permitting to observe heme O as well as heme B biosynthesis. The plasmodial orthologs of HOS (PfCox10) and HAS (PfCox15) genes were identified by their homology to HOS and HAS enzymes from other organisms. We then genetically tagged both genes with GFP and HA coding sequences and visualized transfectants by fl uorescence microscopy.

Results and conclusion

We observed production of heme O and heme B in blood stage parasites. Visualization tagged PfCox10 and PfCox15 suggested that both enzymes were most probably localized in the mitochondria although PfCox10 presented an unusual extension at its N-terminus.

Authors' details
[1]University of São Paulo, São Paulo, Sp, Brazil. [2]The National University of Rosario, Rosario, Argentina.

Published: 22 September 2014

doi:10.1186/1475-2875-13-S1-P82
Cite this article as: Simão-Gurge *et al.*: Preliminary studies of biosynthesis of heme O and heme A in intraerythrocytic stages of *P. falciparum*. *Malaria Journal* 2014 13(Suppl 1):P82.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

[1]University of São Paulo, São Paulo, Sp, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Simão-Gurge et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.