

Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann

Biossíntese de Vitamina E nos estágios
intraeritrocitários de *P. falciparum*

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

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador:
Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

São Paulo
2010

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

INTRODUÇÃO

1.1 Histórico¹

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Malária

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Isoprenóides

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

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

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

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

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

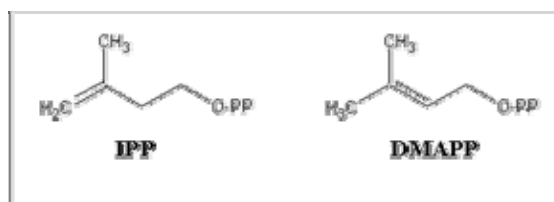


Figura 1. Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP.

1.3.1 Biosíntese de isoprenóides

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

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

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

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

hidroximetilbutenil difosfato sintase (GcpE) (45-46). Posteriormente, o HMBPP é convertido em IPP e DMAPP pela hidroximetilbutenil difosfato redutase (LytB) (46-48) (Figura 2).

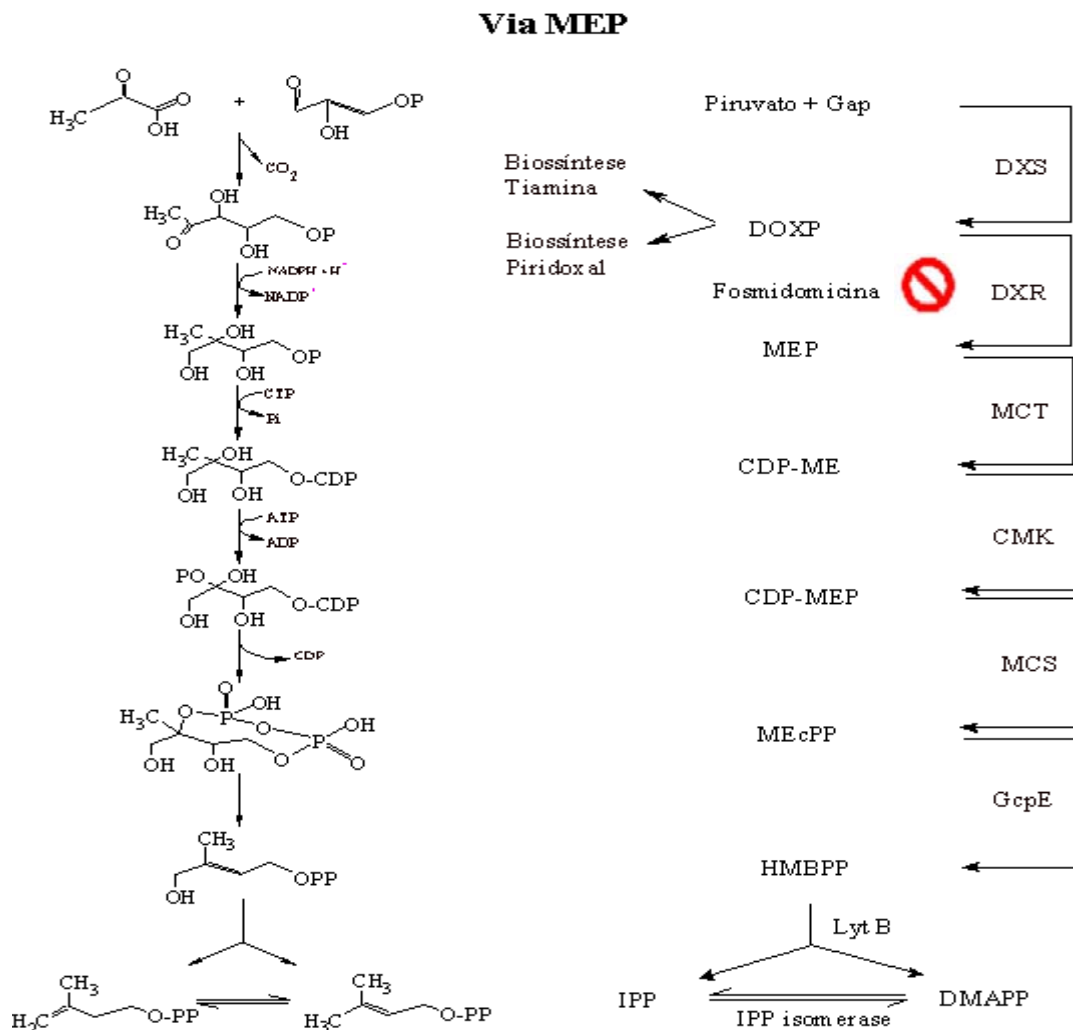


Figura 2. Via MEP. À esquerda estão as estruturas moleculares dos intermediários da via e à direita entre os nomes dos intermediários estão as enzimas. O símbolo está represento o local de atuação da fosmidomicina (DXR). Intermediários: GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DOXP, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato;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

1.3.2 Biossíntese secundária de isoprenóides

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

diferentes modificações para a formação dos diferentes produtos derivados da biossíntese de isoprenóides.

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

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

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

1.4 Biossíntese de isoprenóides em *Plasmodium falciparum*

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

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

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

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

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

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

1.5 Vitamina E

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

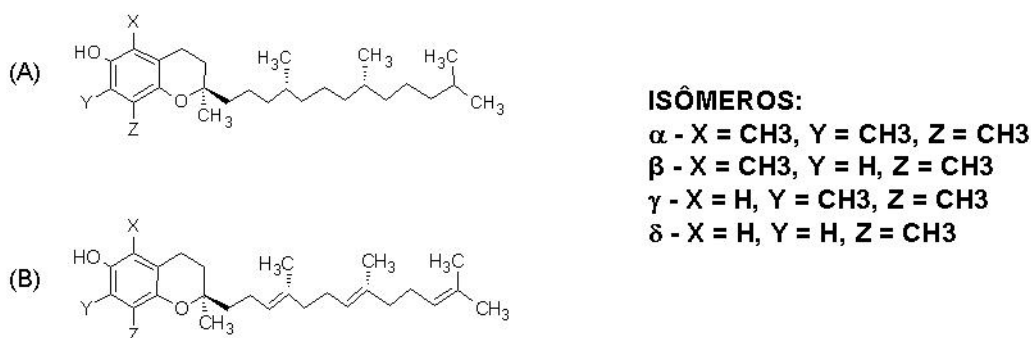


Figura 3. Classificação da vitamina E. (A) Tocoferóis. (B) Tocotrienóis.

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

Via do Chiquimato

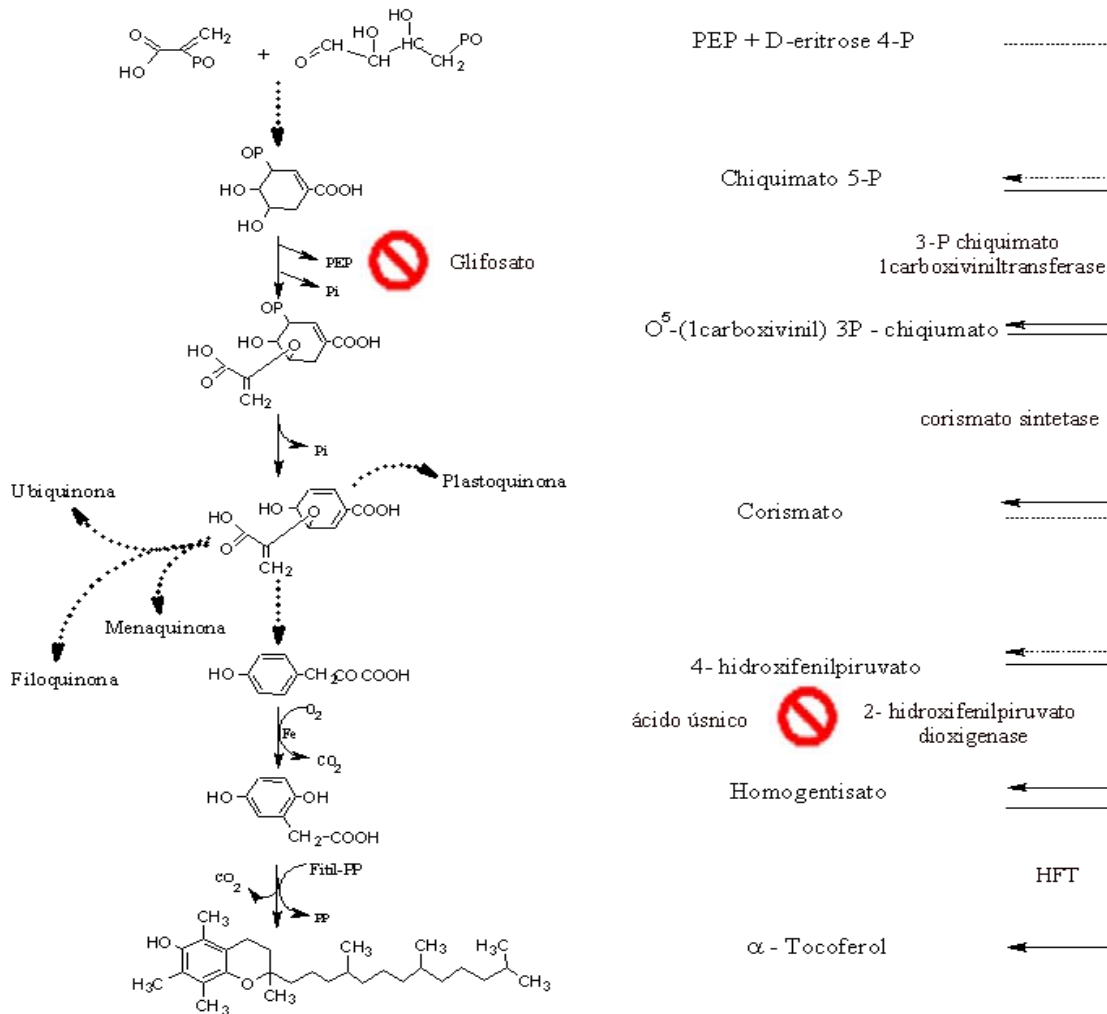



Figura 4. Via do Chiquimato. À direita estão representados os nomes de intermediários da via e o nome da respectiva enzima. À esquerda estão as formas moleculares. Os símbolos  e as setas tracejadas representam o local de inibição do glifosato, ácido úsnico e os intermediários omitidos, respectivamente.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

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

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

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

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

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

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

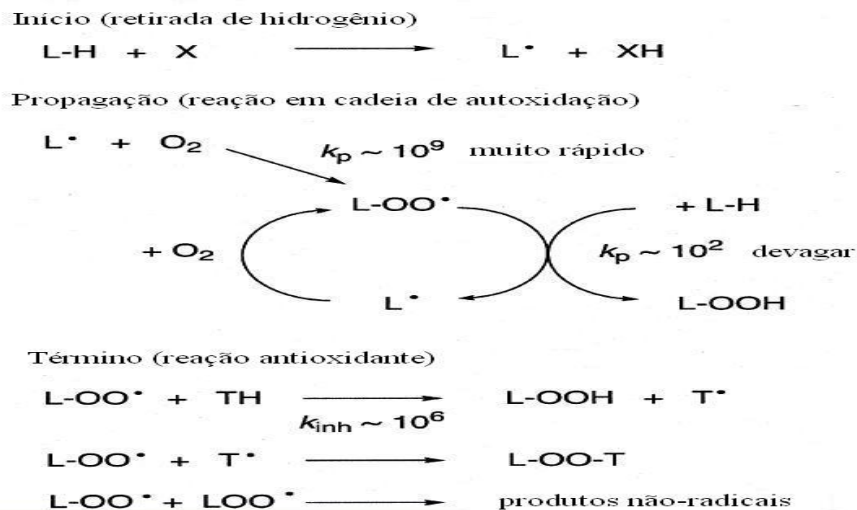


Figura 5. Início, propagação e término da reação em cadeia de autooxidação. A retirada de um hidrogênio de um metileno bis-alílico de um ácido graxo poliinsaturado (L-H) pode ser realizada por vários agentes (X), incluindo íons metálicos, radiações UV, superóxido, radicais sintéticos iniciadores. A reação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

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

1.6 Justificativas e Objetivos

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

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

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

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

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

Com base nas informações acima os objetivos dessa dissertação foram:

- Caracterizar bioquimicamente a via metabólica de vitamina E nas formas intraeritrocitárias de *P. falciparum*;
- Observar o efeito do ácido úsnico na biossíntese de vitamina E e no crescimento de *P. falciparum*;
- Determinar a possível função biológica/fisiológica da vitamina E nos estágios intraeritrocitários do parasita.
- Identificar em *P. falciparum* genes/seqüências candidatos a codificadores de enzimas responsáveis da biossíntese de vitamina E.

CONCLUSÕES

- A biossíntese de α -tocoferol ocorre nos três estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*;
- Foi confirmada, por espectrometria de massas, a estrutura molecular de α -tocoferol oriunda do estágio esquizonte;
- O ácido úsnico inibe a biossíntese de α -tocoferol e o crescimento do parasita, com IC₅₀ de $24,6 \pm 7 \mu\text{M}$;
- O α -tocoferol, nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*, atua como antioxidante lipofílico protegendo as membranas da lipoperoxidação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- 1 Camargo EP. Malária, maleita, paludismo. *Ciência e Cultura*. 2003;55(1):26-9.
- 2 Breman JG, Egan A, Keusch GT. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):4-7.
- 3 Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA. Malaria. *Lancet*. 2005 Apr 23-29;365(9469):1487-98.
- 4 Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. *Cmaj*. 2004 May 25;170(11):1693-702.
- 5 Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):1-11.
- 6 World Health Organization (WHO). WHO guidelines for the treatment of malaria [homepage on the Internet]. 2006. Available from: <http://www.who.int/en/> [2009 out. 16].
- 7 Eklund EH, Fidock DA. *In vitro* evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. *Int J Parasitol*. 2008 Jun;38(7):743-7.
- 8 Hetzel MW, Msechu JJ, Goodman C, Lengeler C, Obrist B, Kachur SP, et al. Decreased availability of antimalarials in the private sector following the policy change from chloroquine to sulphadoxine-pyrimethamine in the Kilombero Valley, Tanzania. *Malar J*. 2006;5:109.
- 9 Yoshikawa M, Motoshima K, Fujimoto K, Tai A, Kakuta H, Sasaki K. Pyridinium cationic-dimer antimalarials, unlike chloroquine, act selectively between the schizont stage and the ring stage of *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem*. 2008 Jun;16(11):6027-33.
- 10 Levander OA, Ager Jr. AL. Malarial parasites and antioxidant nutrients. *Parasitology*. 1993;107 (Suppl):S95-106.
- 11 D'Alexandri FL, Kimura EA, Peres VJ, Katzin AM. Protein dolichylation in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. 2006 Nov 27;580(27):6343-8.

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

- 12 Kawazu S, Ikenoue N, Takemae H, Komaki-Yasuda K, Kano S. Roles of 1-Cys peroxiredoxin in haem detoxification in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Febs J*. 2005 Apr;272(7):1784-91.
- 13 Kimura EA, Couto AS, Peres VJ, Casal OL, Katzin AM. N-linked glycoproteins are related to schizogony of the intraerythrocytic stage in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 1996 Jun 14;271(24):14452-61.
- 14 Seeber F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003 Jun;3(2):99-109.
- 15 Roberts CW, Roberts F, Lyons RE, Kirisits MJ, Mui EJ, Finnerty J, et al. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *J Infect Dis*. 2002 Feb 15;185 (Suppl 1):S25-36.
- 16 Roberts F, Roberts CW, Johnson JJ, Kyle DE, Krell T, Coggins JR, et al. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature*. 1998 Jun 25;393(6687):801-5.
- 17 Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, et al. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Mar;2(3):203-16.
- 18 Woodard CL, Li Z, Kathcart AK, Terrell J, Gerena L, Lopez-Sanchez M, et al. Oxindole-based compounds are selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* cyclin dependent protein kinases. *J Med Chem*. 2003 Aug 28;46(18):3877-82.
- 19 Go ML. Novel antiplasmodial agents. *Med Res Rev*. 2003 Jul;23(4):456-87.
- 20 Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Jun;61(12):1401-26.
- 21 Couto AS, Kimura EA, Peres VJ, Uhrig ML, Katzin AM. Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units. *Biochem J*. 1999 Aug 1;341(Pt 3):629-37.
- 22 de Macedo CS, Uhrig ML, Kimura EA, Katzin AM. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Jan 22;207(1):13-20.

- 23 Cassera MB, Gozzo FC, D'Alexandri FL, Merino EF, del Portillo HA, Peres VJ, et al. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):51749-59.
- 24 Cassera MB, Merino EF, Peres VJ, Kimura EA, Wunderlich G, Katzin AM. Effect of fosmidomycin on metabolic and transcript profiles of the methylerythritol phosphate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(3):377-83.
- 25 Moura IC, Wunderlich G, Uhrig ML, Couto AS, Peres VJ, Katzin AM, et al. Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Sep;45(9):2553-8.
- 26 Rodrigues Goulart H, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Aquino Duarte FA, Katzin AM. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jul;48(7):2502-9.
- 27 Tonhosolo R, D'Alexandri FL, Genta FA, Wunderlich G, Gozzo FC, Eberlin MN, et al. Identification, molecular cloning and functional characterization of an octaprenyl pyrophosphate synthase in intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2005 Nov 15;392(Pt 1):117-26.
- 28 Tonhosolo R, D'Alexandri FL, de Rosso VV, Gazarini ML, Matsumura MY, Peres VJ, et al. Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2009 Apr 10;284(15):9974-85.
- 29 Tonhosolo R, Gabriel HB, Matsumura MY, Cabral FJ, Yamamoto MM, D'Alexandri FL, et al. Intraerythrocytic Stages of *Plasmodium falciparum* Biosynthesize Menaquinone. *FEBS Lett*. 2010 Oct 28. In press.
- 30 van Dooren GG, Stimmler LM, McFadden GI. Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Jul;30(4):596-630.
- 31 Michal G. *Biochemical Pathways, An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. Nova York: John Wiley & Sons; 1999.
- 32 Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990 Feb 1;343(6257):425-30.
- 33 Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001 May 11;292(5519):1160-4.

- 34 Zhou D, White RH. Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J*. 1991 Feb 1;273(Pt 3):627-34.
- 35 Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2100-4.
- 36 Sprenger GA, Schorken U, Wiegert T, Grolle S, de Graaf AA, Taylor SV, et al. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):12857-62.
- 37 Hill RE, Himmeldirk K, Kennedy IA, Pauloski RM, Sayer BG, Wolf E, et al. The biogenetic anatomy of vitamin B6. A ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1996 Nov 29;271(48):30426-35.
- 38 Cane DE, Du S, Robinson JK, Hsiung Y, Spenser ID. Biosynthesis of vitamin B₆: Enzymatic conversion of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate to pyridoxol phosphate. *Journal of the American Chemical Society*. 1999;121(33):7722-23.
- 39 White RH. Stable isotope studies on the biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1978 Sep 5;17(18):3833-40.
- 40 Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 18;95(17):9879-84.
- 41 Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S, Seto H. Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Letters*. 1998;39(43):7913-16.
- 42 Richard SB, Bowman ME, Kwiatkowski W, Kang I, Chow C, Lillo AM, et al. Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol synthetase involved in mevalonate-independent isoprenoid biosynthesis. *Nat Struct Biol*. 2001 Jul;8(7):641-8.
- 43 Rohdich F, Wungsintaweekul J, Eisenreich W, Richter G, Schuhr CA, Hecht S, et al. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6451-6.
- 44 Rohdich F, Kis K, Bacher A, Eisenreich W. The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr Opin Chem Biol*. 2001 Oct;5(5):535-40.

- 45 Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK, et al. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gamma delta T cells in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 2001 Dec 7;509(2):317-22.
- 46 Hecht S, Eisenreich W, Adam P, Amslinger S, Kis K, Bacher A, et al. Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):14837-42.
- 47 Adam P, Hecht S, Eisenreich W, Kaiser J, Grawert T, Arigoni D, et al. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Sep 17;99(19):12108-13.
- 48 Cunningham Jr. FX, Lafond TP, Gantt E. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. J Bacteriol. 2000 Oct;182(20):5841-8.
- 49 Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. FEBS Lett. 1997 Jan 6;400(3):271-4.
- 50 Disch A, Schwender J, Muller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular *algae* and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. Biochem J. 1998 Jul 15;333(Pt 2):381-8.
- 51 Putra SR, Disch A, Bravo JM, Rohmer M. Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gram-negative bacteria and mycobacteria. FEMS Microbiol Lett. 1998 Jul 1;164(1):169-75.
- 52 Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. Biosci Biotechnol Biochem. 2002 Aug;66(8):1619-27.
- 53 Ralph SA, Foth BJ, Hall N, McFadden GI. Evolutionary pressures on apicoplast transit peptides. Mol Biol Evol. 2004 Dec;21(12):2183-94.
- 54 Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, et al. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. Science. 1999 Sep 3;285(5433):1573-6.
- 55 Wiesner J, Borrmann S, Jomaa H. Fosmidomycin for the treatment of malaria. Parasitol Res. 2003 Jun;90(Suppl 2):S71-6.

- 56 Missinou MA, Borrmann S, Schindler A, Issifou S, Adegnika AA, Matsiegui PB, et al. Fosmidomycin for malaria. *Lancet*. 2002 Dec 14;360(9349):1941-2.
- 57 Reichenberg A, Wiesner J, Weidemeyer C, Dreiseidler E, Sanderbrand S, Altincicek B, et al. Diaryl ester prodrugs of FR900098 with improved *in vivo* antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001 Mar 26;11(6):833-5.
- 58 Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res*. 1999 Jul;38(4):309-36.
- 59 Morell H, Clark MJ, Knowles PF, Sprinson DB. The enzymic synthesis of chorismic and prephenic acids from 3-enolpyruvylshikimic acid 5-phosphate. *J Biol Chem*. 1967 Jan 10;242(1):82-90.
- 60 Roche PA, Moorehead TJ, Hamilton GA. Purification and properties of hog liver 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch Biochem Biophys*. 1982 Jun;216(1):62-73.
- 61 Herrmann KM, Weaver LM. The Shikimate Pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1999 Jun;50:473-503.
- 62 McDowell LM, Schmidt A, Cohen ER, Studelska DR, Schaefer J. Structural constraints on the ternary complex of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from rotational-echo double-resonance NMR. *J Mol Biol*. 1996 Feb 16;256(1):160-71.
- 63 Sammons RD, Gruys KJ, Anderson KS, Johnson KA, Sikorski JA. Reevaluating glyphosate as a transition-state inhibitor of EPSP synthase: identification of an EPSP synthase-EPSP.glyphosate ternary complex. *Biochemistry*. 1995 May 16;34(19):6433-40.
- 64 McDowell LM, Klug CA, Beusen DD, Schaefer J. Ligand geometry of the ternary complex of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from rotational-echo double-resonance NMR. *Biochemistry*. 1996 Apr 30;35(17):5395-403.
- 65 Romagni JG, Meazza G, Nanayakkara NP, Dayan FE. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett*. 2000 Sep 1;480(2-3):301-5.
- 66 Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res*. 2005 Jan;49(1):7-30.
- 67 Wolf G. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *J Nutr*. 2005 Mar;135(3):363-6.

- 68 Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23(2):147-69.
- 69 Bohm F, Edge R, Lange L, Truscott TG. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *J Photochem Photobiol B.* 1998 Jul 31;44(3):211-5.
- 70 Bohm F, Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. *FEBS Lett.* 1998 Oct 9;436(3):387-9.
- 71 Palozza P, Krinsky NI. beta-Carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 1992 Aug 15;297(1):184-7.
- 72 Constantinescu A, Han D, Packer L. Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. *J Biol Chem.* 1993 May 25;268(15):10906-13.
- 73 Ho CT, Chan AC. Regeneration of vitamin E in rat polymorphonuclear leucocytes. *FEBS Lett.* 1992 Jul 20;306(2-3):269-72.
- 74 Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1992 Mar;33(3):385-97.
- 75 Ingold KU, Bowry VW, Stocker R, Walling C. Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jan 1;90(1):45-9.
- 76 Stoyanovsky DA, Osipov AN, Quinn PJ, Kagan VE. Ubiquinone-dependent recycling of vitamin E radicals by superoxide. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Nov 10;323(2):343-51.
- 77 Livrea MA, Tesoriere L. Interactions between vitamin A and vitamin E in liposomes and in biological contexts. *Methods Enzymol.* 1999;299:421-30.
- 78 Skinner-Adams T, Davis TM, Beilby J. Inhibition of growth *in vitro* of *Plasmodium falciparum* by vitamin E (alpha-tocopherol). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998 Jul-Aug;92(4):467-8.
- 79 Levander OA, Ager AL, Jr., Morris VC, May RG. Qinghaosu, dietary vitamin E, selenium, and cod-liver oil: effect on the susceptibility of mice to the malarial parasite *Plasmodium yoelii*. *Am J Clin Nutr.* 1989 Aug;50(2):346-52.

- 80 Levander OA, Ager Jr. AL, Morris VC, May RG. Menhaden-fish oil in a vitamin E-deficient diet: protection against chloroquine-resistant malaria in mice. *Am J Clin Nutr.* 1989 Dec;50(6):1237-9.
- 81 Trager W, Jenson JB. Cultivation of malarial parasites. *Nature.* 1978 Jun 22;273(5664):621-2.
- 82 Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 1979 Jun;65(3):418-20.
- 83 Braun-Breton C, Jendoubi M, Brunet E, Perrin L, Scaife J, Pereira da Silva L. *In vivo* time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1986 Jul;20(1):33-43.
- 84 Gueguen S, Herbeth B, Siest G, Leroy P. An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. *J Chromatogr Sci.* 2002 Feb;40(2):69-76.
- 85 Chatzimichalakis PF, Samanidou VF, Papadoyannis IN. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004 Jun 15;805(2):289-96.
- 86 Bekker M, Kramer G, Hartog AF, Wagner MJ, de Koster CG, Hellingwerf KJ, et al. Changes in the redox state and composition of the quinone pool of *Escherichia coli* during aerobic batch-culture growth. *Microbiology.* 2007 Jun;153(Pt 6):1974-80.
- 87 Lanina SA, Toledo P, Sampels S, Kamal-Eldin A, Jastrebova JA. Comparison of reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols. *J Chromatogr A.* 2007 Jul 20;1157(1-2):159-70.
- 88 Van Pelt CK, Haggarty P, Brenna JT. Quantitative subfemtomole analysis of alpha-tocopherol and deuterated isotopomers in plasma using tabletop GC/MS/MS. *Anal Chem.* 1998 Oct 15;70(20):4369-75.
- 89 Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften.* 2002 Apr;89(4):137-46.
- 90 Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Nov;39(11):2541-3.

- 91 Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Candan M, Yanikoglu A, et al. Insecticidal activity of major lichen compounds, (-)- and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. Parasitol Res. 2008 May;102(6):1277-9.
- 92 Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Yaluff G, et al. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1997 Jan;116(1):51-4.
- 93 Verotta L, Appendino G, Bombardelli E, Brun R. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study. Bioorg Med Chem Lett. 2007 Mar 15;17(6):1544-8.
- 94 De Carvalho EA, Andrade PP, Silva NH, Pereira EC, Figueiredo RC. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: an ultrastructural study. Micron. 2005;36(2):155-61.
- 95 Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. Planta Med. 1995 Apr;61(2):113-5.
- 96 Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R, et al. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. Minerva Ginecol. 1999 Jun;51(6):255-60.
- 97 Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, et al. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1995 Aug;43(8):1388-90.
- 98 Meazza G, Scheffler BE, Tellez MR, Rimando AM, Romagni JG, Duke SO, et al. The inhibitory activity of natural products on plant p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Phytochemistry. 2002 Jun;60(3):281-8.
- 99 Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. Antimicrob Agents Chemother. 1979 Dec;16(6):710-8.
- 100 McGuire SO, James-Kracke MR, Sun GY, Fritsche KL. An esterification protocol for *cis*-parinaric acid-determined lipid peroxidation in immune cells. Lipids. 1997 Feb;32(2):219-26.

- 101 Soding J, Biegert A, Lupas AN. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1;33:244-8.
- 102 Keller Y, Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B. Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis--evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur J Biochem.* 1998 Jan 15;251(1-2):413-7.
- 103 Chakrabarti D, Azam T, DelVecchio C, Qiu L, Park YI, Allen CM. Protein prenyl transferase activities of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 Aug 1;94(2):175-84.
- 104 Collakova E, DellaPenna D. Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis sp.* PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2001 Nov;127(3):1113-24.
- 105 Ayi K, Cappadoro M, Branca M, Turrini F, Arese P. *Plasmodium falciparum* glutathione metabolism and growth are independent of glutathione system of host erythrocyte. *FEBS Lett.* 1998 Mar 13;424(3):257-61.
- 106 Simoes AP, van den Berg JJ, Roelofsen B, Op den Kamp JA. Lipid peroxidation in *Plasmodium falciparum*-parasitized human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1992 Nov 1;298(2):651-7.
- 107 Davis TM, Binh TQ, Danh PT, Dyer JR, St John A, Garcia-Webb P, et al. Serum vitamin A and E concentrations in acute *falciparum* malaria: modulators or markers of severity? *Clin Sci (Lond).* 1994 Nov;87(5):505-11.
- 108 Das BS, Thurnham DI, Das DB. Plasma alpha-tocopherol, retinol, and carotenoids in children with *falciparum* malaria. *Am J Clin Nutr.* 1996 Jul;64(1):94-100.
- 109 Fujita T, Ogbonna JC, Hideo H, Aoyagi H. Effects of reactive oxygen species on α -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Journal of Applied Phycology.* 2008;21:185-91.
- 110 Ogbonna JC, Ichige E, Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Mar;58(4):532-8.
- 111 Ogbonna JC, Ichige E, Tanaka H. Regulating the ratio of photoautotrophic to heterotrophic metabolic activities in photoheterotrophic culture of *Euglena gracilis* and its application to α -tocopherol production. *Biotechnology Letters.* 2002;24:953-8.

- 112 Munne-Bosch S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol.* 2005 Jul;162(7):743-8.
- 113 Munne-Bosch S, Schwarz K, Alegre L. Enhanced Formation of alpha-Tocopherol and Highly Oxidized Abietane Diterpenes in Water-Stressed Rosemary Plants. *Plant Physiol.* 1999 Nov;121(3):1047-52.
- 114 Maeda H, Sakuragi Y, Bryant DA, Dellapenna D. Tocopherols protect *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 from lipid peroxidation. *Plant Physiol.* 2005 Jul;138(3):1422-35.
- 115 Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M, Pollard M, DellaPenna D. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell.* 2004 Jun;16(6):1419-32.
- 116 Falk J, Munne-Bosch S. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J Exp Bot.* 2010 Jun;61(6):1549-66.
- 117 Cheng SC, Burton GW, Ingold KU, Foster DO. Chiral discrimination in the exchange of alpha-tocopherol stereoisomers between plasma and red blood cells. *Lipids.* 1987 Jul;22(7):469-73.
- 118 Biswas T, Pal JK, Naskar K, Ghosh DK, Ghosal J. Lipid peroxidation of erythrocytes during anemia of the hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem.* 1995 May 24;146(2):99-105.
- 119 Sen G, Mukhopadhaya R, Ghosal J, Biswas T. Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol enhances antioxidant reserve of erythrocytes during anemia in visceral leishmaniasis. *Life Sci.* 2000 Nov 17;67(26):3181-90.