

Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann

Estudo da função de vitamina E e da biossíntese de
vitamina K1 em *Plasmodium falciparum*

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin

São Paulo
2015

RESUMO

Sussmann, RAC. Estudo da função da vitamina E e da biossíntese de vitamina K1 em *Plasmodium falciparum* [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Dentre as doenças infecciosas que acometem o homem, a malária apresenta o maior índice de mortalidade com mais de 500 mil mortes registradas em 2013. Para agravar a situação de saúde pública, foi descrito o surgimento de resistência às drogas usadas na terapêutica da doença. Torna-se necessário a identificação e o estudo de novos alvos antimaláricos. A via MEP se mostra como um potencial alvo para o desenvolvimento de drogas contra *P. falciparum* uma vez que está ausente em humanos. A fim de aprofundar o conhecimento dessa via no parasita, nossos objetivos foram avaliar a função da vitamina E biossintetizada pelo parasita e caracterizar a biossíntese de vitamina K1 e o metabolismo de fitol. Esse estudo determinou que a vitamina E biossintetizada pelo parasita atua no sistema redox do parasita, empregando análises por citometria de fluxo com sondas sensíveis ao estresse oxidativo. Caracterizamos por técnicas cromatográficas (RP-HPLC e GC) e/ou de espectrometria de massas do produto da oxidação do tocoferol. Por outro lado, empregando marcações metabólicas com precursores radioativos, mostramos que a biossíntese de vitamina K1 é ativa no parasita e detectamos sua forma reduzida: a hidrofiloquinona. Por fim, utilizando marcações metabólicas e análises por RP-HPLC, observamos que existe uma via de reaproveitamento de fitol em *P. falciparum* assim como em plantas, uma vez que esse composto é fosforilado e usado para a biossíntese das vitaminas E e K1. O estudo abre oportunidades para um desenvolvimento racional de novos antimaláricos e aprofunda o conhecimento na biologia do parasita.

Palavras chave: Malária. *Plasmodium falciparum*. Sistema redox. Vitamina E. Vitamina K1. Antimaláricos.

ABSTRACT

Sussmann, RAC. Estudy of vitamin E function and of vitamin K1 biosynthesis in *Plasmodium falciparum* [Ph. D. Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Among the infectious diseases that affect humans, malaria has the highest mortality rate with more than 500 000 deaths in 2013. The public health situation gets worsen because it has been described the emergence of resistance to common drugs used in the treatment of disease. It is necessary to identify and study of new antimalarial targets. The MEP pathway is a potential target for drug development against *Plasmodium falciparum* once it is absent in humans. In order to deepen the understanding of this pathway in the parasite, our objectives were to evaluate the function of vitamin E biosynthesized by the parasite and characterize the biosynthesis of vitamin K1 and the phytol metabolism. This study determined that vitamin E biosynthesized by the parasite operates in the redox system of the parasite using flow cytometric analysis with susceptible probes to oxidative stress. We characterize by chromatographic techniques (RP-HPLC and GC) and/or mass spectrometry the oxidation product of tocopherol. On the other hand, employing metabolic labeling with radioactive precursors, we show the biosynthesis of vitamin K1 is active on parasite and we detected its reduced form: the hidrophylloquinone. Finally, using metabolic labeling with radioactive precursors and RP-HPLC analysis, we demonstrate that there is a phytol salvage pathway in *P. falciparum* as well as plants, since this compound is phosphorylated and used for the biosynthesis of vitamins E and K1. The study opens opportunities for the rational development of new antimalarials and deepens knowledge on parasite biology.

Keywords: Malaria. *Plasmodium falciparum*. Redox system. Vitamin E. Vitamin K1. Antimalarials.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve Histórico¹

Maleita, paludismo, impaludismo, febre terçã ou quartã são nomes dados à malária, uma doença parasitária que acomete o homem. Não se sabe ao certo, porém, existem referências que datam de 4000 a.C. a febres sazonais e intermitentes em textos médicos e religiosos entre os chineses, babilônicos e indianos que relacionavam os sintomas à presença de maus espíritos e à punição de deuses [1].

O grego Hipócrates, o pai da medicina, foi o primeiro a descartar a superstição e a relacionar a doença às estações do ano ou ao local freqüentado pelos doentes. No século V a.C., ele foi o primeiro a diferenciar a malária das demais enfermidades febris, descrevendo detalhadamente o seu quadro clínico e suas complicações. Durante mais de 1500 anos, pouco foi acrescentado ao conhecimento sobre a doença e seu tratamento.

Em 1716, o italiano Giovanni Maria Lancisi observou a presença de pontos negros no cérebro e no fígado de pessoas que morreram devido às complicações relacionadas à malária e associou a doença com as emanções de pântanos. Sugeriu que a doença era causada por vermes ou insetos que habitavam as regiões pantanosas e que podiam infectar o sangue humano. A doença então recebeu o nome de “mal ária”, que significa ar insalubre ou mal ar e passou a ser chamada de malária mais tarde [2].

A partir do século XVII, aumentou a preocupação com a doença, pois aumentavam também o número de casos. Até meados de 1900, mais de 80% da população mundial era afligida pela malária, exceto nas regiões polares e subpolares [1].

Em 1880, o médico do exército francês Charles Louis Alphonse Laveran observou formas ovaladas com os mesmos pontos negros presentes no sangue de pacientes com malária e considerou que havia encontrado o parasita causador da doença. O nome *Plasmodium* apareceu pela primeira vez três anos mais tarde, descrito por Marchiafava e Celli, que observaram formas ovóides no interior de hemácias de pacientes com malária. O médico britânico Ronald Ross descreveu o modo de transmissão em 1897, ao encontrar formas do parasita no interior de um mosquito que havia se alimentado de sangue de um portador da doença. O quadro completo do ciclo de desenvolvimento do parasita 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. Após vários

¹ Todas as informações apresentadas no item 1.1 foram obtidas dos sites www.sucen.sp.gov.br; www.rph.wa.gov.au; www.who.int; www.malaria.org; dos artigos Camargo, E.P. Malária, maleita, paludismo. *Ciência e Cultura*, 2003;55(1):26-29 [1], Coluzzi, M., G. Corbellini, and A. Celli, [*The malariology centenary (1898-1998)*]. 1898]. *Parassitologia*, 1998;40(4):361-76 [2] e Trager, W. & Jensen, J. B. *Human malaria parasites in continuous culture*. *Science*. 1976;193(4254):673-5 [3].

estudos, conseguiram identificar todas as formas evolutivas nos dois hospedeiros. Somente em 1976, William Trager conseguiu cultivar *P. falciparum in vitro* [3], abrindo uma nova era de estudo da doença.

1.2 A Biologia de Plasmódios

Os parasitas que causam a malária pertencem ao filo *Apicomplexa*, ordem *Coccidiida*, subordem *Haemosporidiidea*, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. São descritas atualmente cerca de 150 espécies de parasitas pertencentes ao gênero *Plasmodium*, infectando vários vertebrados como aves, répteis e primatas superiores. Apenas cinco dessas espécies podem infectar o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. kowlesi* e *P. ovale*. A primeira é a espécie responsável pela forma mais grave da doença que pode levar ao óbito e a última é restrita no continente africano.

O ciclo de vida dos plasmódios é complexo e necessita de dois hospedeiros; um vertebrado e outro invertebrado (Figura 1).

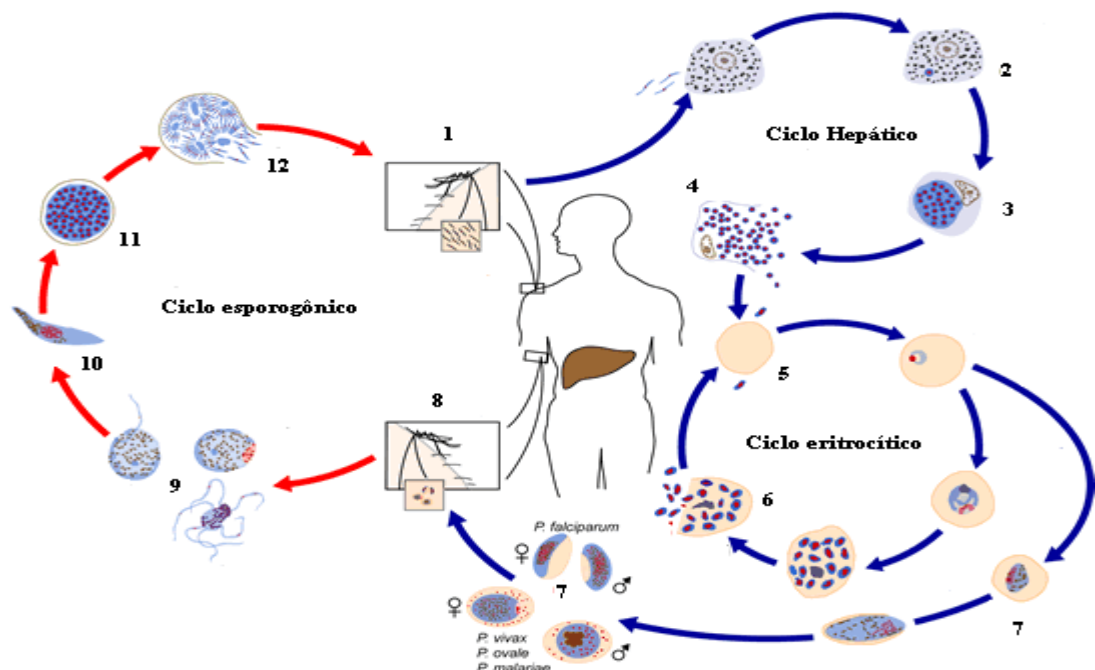


Figura 1- Ciclo de vida de plasmódios humanos. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea de anofelino infectada inocula esporozoítas no hospedeiro vertebrado (1). Os esporozoítas invadem os hepatócitos (2) e se diferenciam em esquizontes (3), os quais rompem a célula e liberam merozoítas na corrente sanguínea (4). Depois do ciclo hepático, o parasita inicia o ciclo eritrocítico. Os merozoítas invadem os eritrócitos (5) e novamente se diferenciam em esquizontes (6) e liberam mais merozoítas (6). Alguns parasitas se diferenciam em gametócitos (7) que podem ser ingeridos por uma fêmea de anofelino através do repasto sanguíneo (8). Após ingeridos pelo mosquito, as formas sexuais formam o zigoto (9) que por sua vez se diferencia na forma móvel, o oocineto (10), no intestino médio do inseto. Os oocinetos invadem a parede do intestino e se desenvolvem em oocistos (11). Nessa estrutura ocorre a esporogonia e formam-se esporozoítas (12) que são liberados e migram, através da hemolinfa, para as

glândulas salivares do mosquito. No momento da picada, os esporozoítas poderão ser inoculados no hospedeiro vertebrado e, assim, dar seguimento ao ciclo do parasita. Modificado de www.cdc.gov.

No ciclo do hospedeiro vertebrado, acontece a reprodução assexuada denominada esquizogonia. Esse ciclo é subdividido em ciclos hepático e eritrocítico [4]. Quando uma fêmea do mosquito vetor infectada pica o homem, ao realizar o repasto sanguíneo, transfere esporozoítas com sua saliva, os quais alcançam os vasos sanguíneos e tecidos adjacentes. Os esporozoítas que foram lançados nos arredores dos capilares sanguíneos começam a realizar movimentos circulares chamados de *gliding* [5], que possibilitam que eles adentrem nos capilares sanguíneos e, possivelmente, nos capilares do sistema linfático. Após 15-45 min, os esporozoítas que atingiram a corrente sanguínea alcançam o fígado e acabam por invadir as células hepáticas.

Após invadir o hepatócito, origina-se a fase hepática da doença, sendo difícil a detecção do parasita nesse período. Os esporozoítas se diferenciam em trofozoítas. Estes se multiplicam assexuadamente por esquizogonia, dando origem a trofozoítas teciduais e posteriormente a merozoítas. Ocorre então, o rompimento da membrana do hepatócito e a liberação dos merozoítas para a corrente sanguínea, que invadirão os eritrócitos.

O ciclo eritrocítico inicia-se quando merozoítas tissulares invadem os eritrócitos. Durante o desenvolvimento intraeritrocítico, o parasita apresenta os estágios anel ou trofozoíta jovem, trofozoíta maduro e esquizonte. No último estágio, ocorre mais um evento de esquizogonia dando origem a um determinado número de merozoítas por esquizonte, característico de cada espécie de plasmódio. Com a ruptura do esquizonte e do eritrócito, os merozoítas são liberados na corrente sanguínea e invadem novas hemácias dando continuidade ao ciclo eritrocítico.

Ao romper o eritrócito, são liberados merozoítas, meta-hemoglobina, proteínas plasmodiais e cristais de hemozoína ou pigmento malárico, que consistem em monômeros ou dímeros de Ferriprotoporfirina IX (FP). A hemozoína acumulada no citoplasma do eritrócito é liberada no plasma e posteriormente fagocitada pelas células de Kupffler, no fígado, ou pelos macrófagos, no baço e outros órgãos. O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes a cada 48 horas nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, a cada 24 horas nas infecções por *P. knowlesi* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae*. Os acessos febris característicos de cada espécie estão relacionados com esses ciclos de desenvolvimento. Depois de algum tempo e por fatores ainda desconhecidos, a forma anel se diferencia em gametócitos (masculino ou feminino). Os gametócitos não sofrem mais nenhuma divisão e podem ser encontrados no sangue periférico. Sua vida média pode ser de 60 dias.

A partir da formação dos gametócitos pode iniciar-se o ciclo no hospedeiro invertebrado. Enquanto o anofelino macho se alimenta de néctar e seiva de árvores, a fêmea necessita de sangue em sua alimentação para maturação dos ovos [4].

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do anofelino ingere gametócitos que irão evoluir no inseto. No intestino médio do mosquito, o parasita se reproduz sexuadamente por esporogonia. Depois de 24 horas após a fecundação, o zigoto se diferencia em oocineto e migra para a parede intestinal do inseto, alojando-se entre essas células e a membrana basal do epitélio. O oocineto se transforma em oocisto desenvolvendo uma grossa cápsula, à qual permite a passagem de nutrientes para a geração dos esporozoítas. O oocineto se rompe e libera os esporozoítas que alcançam a hemolinfa do inseto e migram para as glândulas salivares. No momento da picada, os esporozoítas poderão ser inoculados no hospedeiro vertebrado e, assim, dar seguimento ao ciclo do parasita.

1.3 Epidemiologia

Segundo o *World Malaria Report 2014* [6] publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foram relatados nas regiões onde ocorre a transmissão cerca de 200 milhões de casos e por volta de 584 mil mortes devido à malária em 2013. Dessas mortes, 90% estão concentradas na África e geralmente acometem crianças menores de cinco anos e gestantes [7-9]. Na Figura 2, são apresentados os casos confirmados de malária em 2013.

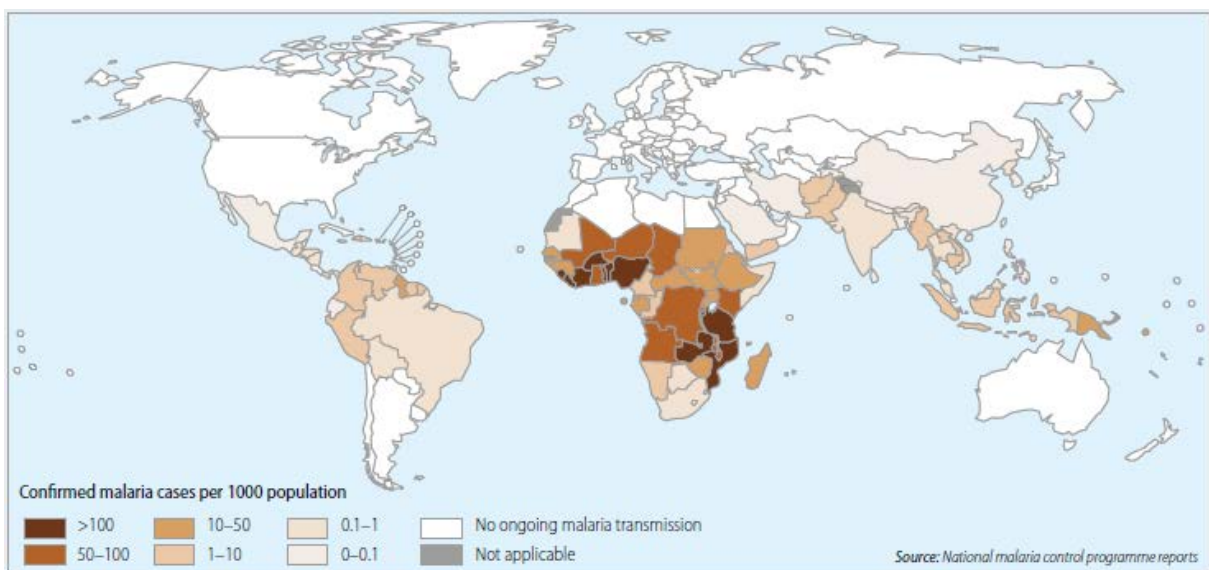


Figura 2- Casos confirmados de malária em 2013. A transmissão de malária ocorre nos cinco continentes em regiões tropicais e subtropicais. Os valores representam os casos confirmados de malária a cada mil habitantes. Modificado de *World Malaria Report 2014* [6].

A transmissão da malária ocorre apenas em regiões tropicais e subtropicais, afetando principalmente países subdesenvolvidos. A afecção está presente em cerca de cem países distribuídos por todos os continentes, passando pelas Américas do Sul e Central, além de México, Índia, sudeste da Ásia, Oriente Médio, Oceania e África. Existem aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão de malária.

Em 2013, segundo dados da OMS, foram registrados 308 mil casos de malária no Brasil (99% na região Norte) com 79 mortes. Atualmente, a área de risco de transmissão está localizada na chamada Amazônia Legal, compreendendo os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 3).

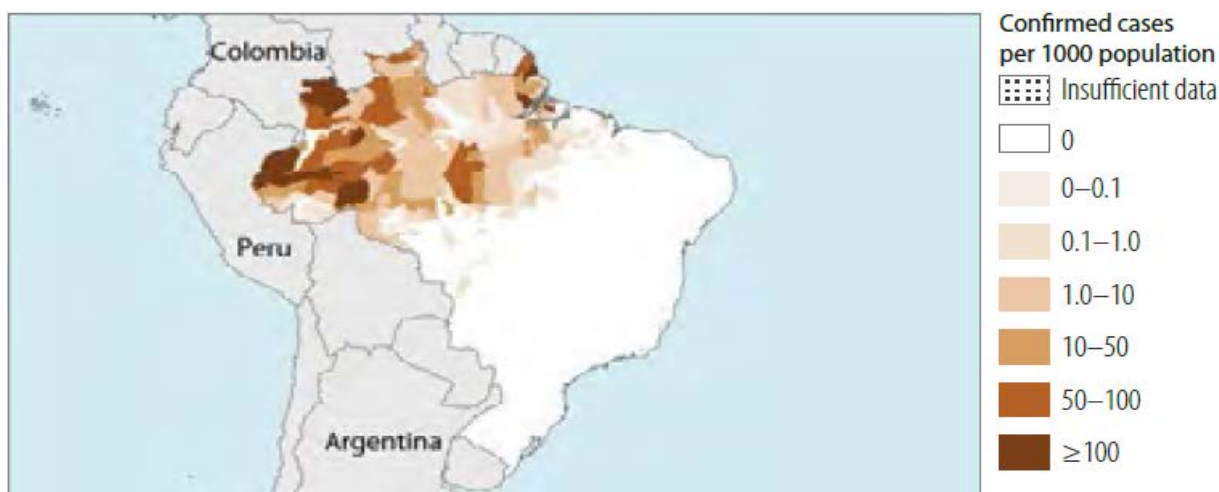


Figura 3- Casos confirmados de malária no Brasil em 2013. A transmissão de malária no Brasil está restrita à região da Amozônia Legal. Os valores representam os casos confirmados de malária a cada mil habitantes. Modificado de *World Malaria Report 2014* [6].

Essa transmissão não se distribui homoganeamente e aflige principalmente as populações que se estabeleceram com projetos agropecuários, de construção de rodovias, de hidroelétricas e de atividades de garimpo e mineração, desenvolvidas na região Amazônica. Esses movimentos populacionais desordenados são os principais fatores que dificultam o controle da malária.

No Brasil, a espécie mais abundante é o *P. vivax*, com uma prevalência de 79% dos casos, seguido pelo *P. falciparum*, com 20% dos casos e com menos de 1% de *P. malariae*. Podem ocorrer infecções com mais de uma espécie. Em 2001, foi criada no Brasil a Rede Amazônica de Vigilância de Resistência às drogas Antimaláricas (RAVREDA), hoje em parceria com a *Amazon Malaria Initiative* (AMI), e em 2003, foi criado o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Com essas iniciativas o Brasil vem tentando conter o

aumento dos casos de malária, trabalhando com novas associações de drogas e com uma melhor distribuição destas para as comunidades nas regiões endêmicas.

1.4 O combate à doença

Após o ciclo completo de desenvolvimento do parasito da malária no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* ter sido descrito pelos pesquisadores italianos, iniciou-se um combate de forma racional à doença.

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 parasita, 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, 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 OMS no período de 1957-1969. A proposta da campanha era de erradicação da transmissão em curto prazo baseada em quatro fases: 1) fase preparatória, com reconhecimento das áreas afetadas e do problema epidemiológico, e treinamento de pessoal; 2) fase de ataque, com controle do vetor por meio de aplicação de inseticidas nas casas e tratamento das pessoas; 3) fase de consolidação, com suspensão das medidas de controle e vigilância para possíveis surtos; 4) fase de manutenção e vigilância.

Essa campanha resultou na erradicação da malária nos Estados Unidos da América e na maior parte da Europa, juntamente com novas práticas de agricultura e construção de casas. 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 70, o sucesso do programa não foi mantido, sendo desativado, devido ao alto custo. Até meados de 1990, começaram a ocorrer mais de 300 milhões de casos de malária anualmente e mais de um milhão de mortes eram atribuídas diretamente à doença.

Com o sério problema de saúde pública, foi convocada em 1992, a Conferência Ministerial de Malária, em Amsterdã, Holanda. Foi apresentada uma nova estratégia global de

controle da doença. Mais tarde, em 1997, foi criada a *Multilateral Initiative on Malaria* (MIM), quando cientistas que trabalhavam com malária estabeleceram prioridades para um programa multidisciplinar de pesquisa em malária. A OMS criou em 1998 o *Roll Back Malaria* (RBM), o qual está em atividade até os dias de hoje e possui grandes ambições para o controle da malária até 2025.

Não existem vacinas eficazes para a malária até o momento [10, 11]. A escolha de qual antígeno do parasita e quais adjuvantes usar para desenvolver uma vacina são os maiores desafios, devido ao parasita apresentar vários estágios de desenvolvimento em diferentes tecidos e órgãos, polimorfismo e variação antigênica [8].

Compostos contra a malária eram utilizados na China há 3000 anos. Os incas, no século XVI, já usavam o extrato da casca da quina para o tratamento da malária. 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 atualmente na terapêutica da doença encontram-se os aminoquinolinos (cloroquina, amodiaquina, primaquina, quinina, quindina e mefloquina); os antifolatos (sulfadoxina); as diaminopirimidinas (pirimetamina); as lactonas sesquiterpênicas (artemisinina e seus derivados) e alguns antibióticos [12]. A artemisinina e seus derivados são hoje usados em combinação com as demais drogas como primeira-linha no tratamento da malária por não ter apresentado uma resistência disseminada. Entretanto, o que se vem observando é o aumento da resistência aos antimaláricos o que agrava a situação de saúde pública (Figura 4).

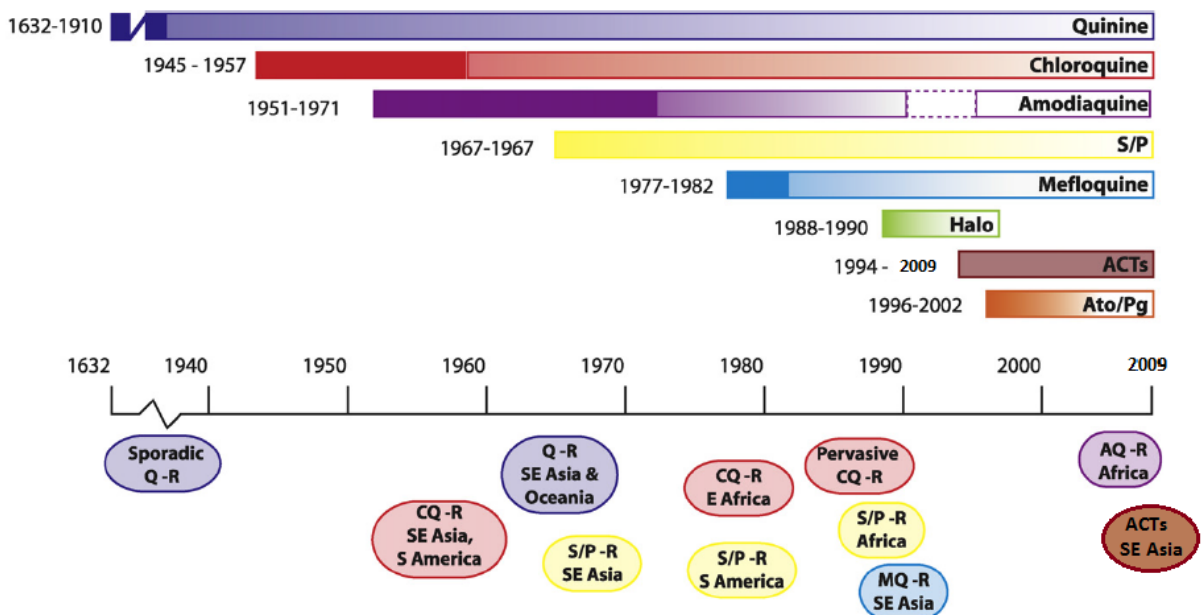


Figura 4- Emergência de resistência aos antimaláricos. As barras acima da linha do tempo representam um antimalárico ou combinações entre eles. Os anos à esquerda de cada barra representa o ano de introdução da droga como antimalárico, seguido pelo ano que houve o primeiro relato de resistência à mesma. Os balões abaixo da linha do tempo mostram o registro de resistência à droga e a região onde foi observada. ACTs, terapias combinadas com artemisinina; AQ, amodiaquina; Ato/Pg, atovaquona/proguanil; CQ, cloroquina; Halo, halofantrina; MQ, mefloquina; Q, quinina; R, resistência; S/P, sulfadoxina/ pirimetamina. Modificado de Ekland & Fidock, 2008 [13].

O uso contínuo de um antimalárico em parasitas parcialmente resistentes, confere uma vantagem seletiva de parasitas resistentes e favorece a sua transmissão. Foi descrito que na presença da droga, infecções parcialmente resistentes são acompanhadas por mais gametocitemia que aqueles que são sensíveis [14-16]. Além disso, a resistência aos medicamentos leva à recrudescência com taxas mais elevadas de gametócitos que infecções primárias. Assim, as cepas resistentes à droga geram mais gametocitemia e, portanto, maior potencial de transmissão do que as cepas sensíveis [17, 18]. Em algumas circunstâncias, gametócitos com genes resistentes podem ser mais infecciosos para mosquitos, produzindo um maior número de oocistos e uma infecção mais elevada de mosquitos que aqueles que transportam genes sensíveis [19]. Existem evidências de que as medidas de controle de mosquitos podem eliminar parasitas resistentes a drogas [20]. A existência de reprodução sexuada pelos plasmódios possibilita a recombinação gênica e, com isso, o surgimento de novas cepas resistentes às drogas, usadas para o controle da doença.

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. A crescente resistência às drogas utilizadas na terapêutica, principalmente de isolados de *P. falciparum*, leva à necessidade de estudos sobre novos antimaláricos [13, 21-23].

As linhas de pesquisa para o desenvolvimento de antimaláricos seguem áreas como: inativação da biossíntese de membranas [24-26]; vias metabólicas localizadas no apicoplasto [27-30]; quinases envolvidas no ciclo celular [31, 32]; biossíntese de isoprenóides [33-43] e vias metabólicas localizadas na mitocôndria do parasita [44]. Nosso grupo tem trabalhado nos últimos anos com a caracterização de produtos da biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* [34-43] resultantes da via alternativa 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) [33].

Nesse contexto, a biossíntese de isoprenóides nas formas intraeritrocíticas 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 parasita, é diferente da via de biossíntese de isoprenóides presente em humanos [23, 33]. Somado a isso, foi mostrado que essa via é essencial para o desenvolvimento do parasita e está localizada no apicoplasto [45].

Em 2011, Yeh e DeRisi [45] demonstraram que a única função essencial do apicoplasto é suprir a demanda de pirofosfato de isopentenila (IPP) no parasita. Os autores mostraram que o *P. falciparum* sobrevive a doses letais de fosmidomicina, inibidor da via MEP, quando disponibilizam IPP em meio de cultura. Testaram também se essa recuperação também acontecia quando o parasita era tratado com antibióticos que impediam a síntese proteica no apicoplasto como doxiciclina, clindamicina e cloranfenicol. Além de recuperar o crescimento do parasita, o tratamento contínuo com IPP e antibióticos, fez com que o *P. falciparum* perdesse a organela e seu genoma. Essa cepa depende de um suprimento contínuo de IPP exógeno, que se retirado, causa a morte do parasita [45].

1.5 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, dolicois, compostos isoprênicos ligados às proteínas e RNA, hormônios em animais e plantas, carotenóides, vitaminas e óleos essenciais [46].

Eles desempenham funções como a manutenção da fluidez de membrana e agem como hormônios ou sais biliares. São necessários para organismos fotossintéticos e possuem atividades antioxidantes (carotenóides e vitaminas). Ubiquinonas, menaquinonas, filoquinonas e plastoquinonas estão envolvidas no transporte de elétrons. Dolicois, 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 [46].

Em plantas, hormônios de baixo peso molecular como giberilinas, ácido abscísico e brassinolideos são fundamentais para o desenvolvimento desses organismos. O mesmo ocorre com hormônios sexuais esteroidais e corticosteróides em animais, todos derivados de isoprenóides. Muitos antibióticos, fitoalexinas, repelentes e até drogas alucinógenas e psicotrópicas possuem estruturas derivadas de compostos isoprênicos [46].

A unidade básica de todo isoprenóide é uma molécula de cinco carbonos de fórmula C_5H_8 IPP [47] e seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (Figura 5).

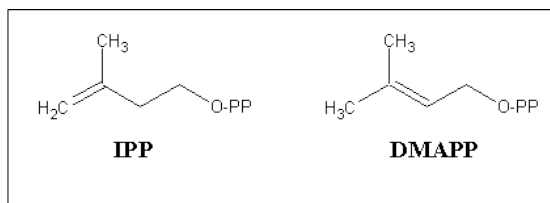


Figura 5- Estrutura das moléculas de IPP e DMAPP.

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.

1.5.1 Biossíntese de isoprenóides

A via do Ácido Mevalônico ou Mevalonato (MVA), também conhecida como “via clássica”, desde a 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 descarboxilação, 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) é o ponto principal de regulação dessa via [48] que catalisa a reação de 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) a mevalonato. Como esse 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 [49]. As enzimas, que atuam nas etapas de biossíntese dessa via, foram isoladas em uma grande variedade de organismos, incluindo animais e plantas. 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 $[^{13}C]$ acetato (um precursor da via do mevalonato) mostraram que essa molécula não era incorporada em ubiquinonas de *Escherichia coli* [50]. Tais dados somados ao fato de que mevinolina, um inibidor específico da enzima HMG-CoA redutase, não inibia o crescimento de *Escherichia coli* [50], 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-desoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase (DXS) formando 5-fosfato 1-desoxi-D-xilulose (DOXP) [51], enzima esta que é dependente de tiamina (vitamina B₁) [52]. A DOXP é o primeiro intermediário da via, mas não é exclusivo, sendo utilizado também para a biossíntese de piridoxal (vitamina B₆) [53, 54] e tiamina (vitamina B₁) [55]. Na etapa seguinte, a enzima 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR) catalisa simultaneamente o rearranjo intramolecular e redução da DOXP em MEP [56]. A enzima que catalisa essa etapa da via é inibida por um composto utilizado inicialmente como herbicida, chamado fosmidomicina (ácido fosfônico) [57]. Posteriormente, o MEP é ligado a uma molécula de trifosfato de citidina (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) [58]. 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) [59, 60]. O produto MEcPP é reduzido a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) pela enzima hidroximetilbutenil difosfato sintase (GcpE) [61, 62]. Posteriormente, o HMBPP é convertido em IPP e DMAPP pela hidroximetilbutenil difosfato redutase (LytB) [62-64] (Figura 6).

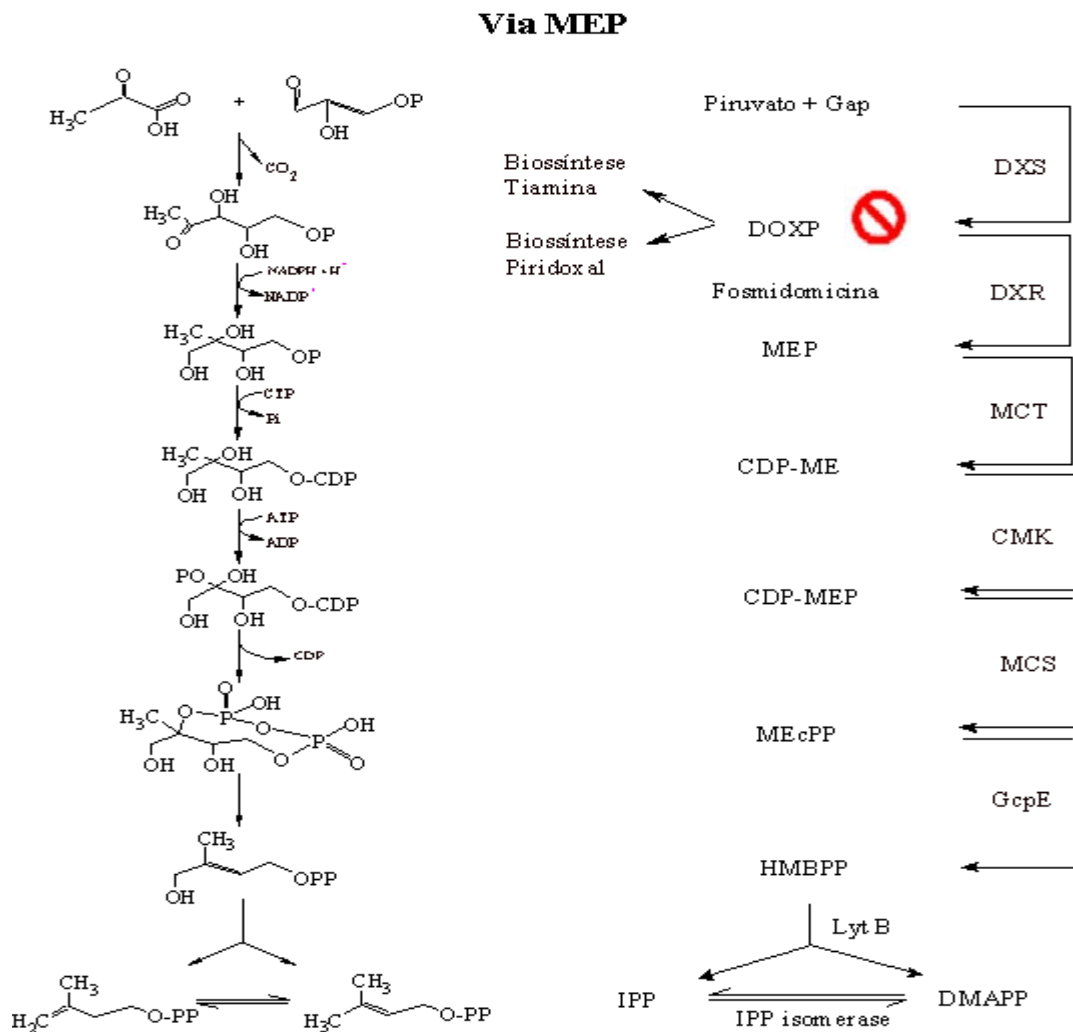


Figura 6- Via MEP. À esquerda estão as estruturas moleculares dos intermediários da via e à direita entre os nomes dos intermediários estão as enzimas. O símbolo representa o local de atuação da fosmidomicina (DXR). Intermediários: GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DOXP, 5-fosfato 1-desoxi-D-xilulose ; MEP, 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, pirofosfato de isopentenila; DMAPP, pirofosfato de dimetilalila. Enzimas: DXS, 1-desoxi-D-xilulose 5- fosfato sintase; DXR, 1-desoxi-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.

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 em plastídeos [65-68].

A organela presente em organismos do filo Apicomplexa - O Apicoplasto - se assemelha aos plastídeos de plantas [27, 30]. 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 [69].

1.5.2 Biossíntese secundária de isoprenóides

Após a síntese do IPP e do 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. O termo poliisoprenol é usado para prenóis com mais de quatro unidades isoprênicas.

Inicialmente, uma molécula de IPP reage com uma molécula DMAPP por meio de enzimas chamadas preniltransferases, dando origem ao pirofosfato de geranila (GPP, 10 carbonos). O GPP é ligado a um IPP, originando o pirofosfato de farnesila (FPP, 15 carbonos) que, por sua vez, reage com mais uma molécula de IPP, dando origem ao pirofosfato de geranilgeranila (GGPP, 20 carbonos). A partir desse ponto os isoprenóides podem ser ligados à proteínas, ao RNA ou à anéis aromáticos, formando prenilquiononas (ubiquinonas e vitaminas). Duas moléculas de GGPP podem ser condensadas no modo cabeça-cabeça e dar origem ao fitoeno, molécula-base para a biossíntese de carotenóides, formação de hormônios, dentre outros.

O GGPP pode ser reduzido pela geranilgeranil redutase [70], formando o pirofosfato de fitila (fítill-PP), o qual pode ser ligado a anéis aromáticos, formando vitaminas E [71] e filoquinona [72]. O fítill-PP pode ser condensado em um anel de cromanol ou de 1,4 dihidroxi-2-naftoato, provenientes da via do Chiquimato, para a formação das vitaminas E e K1, respectivamente (Figura 7).

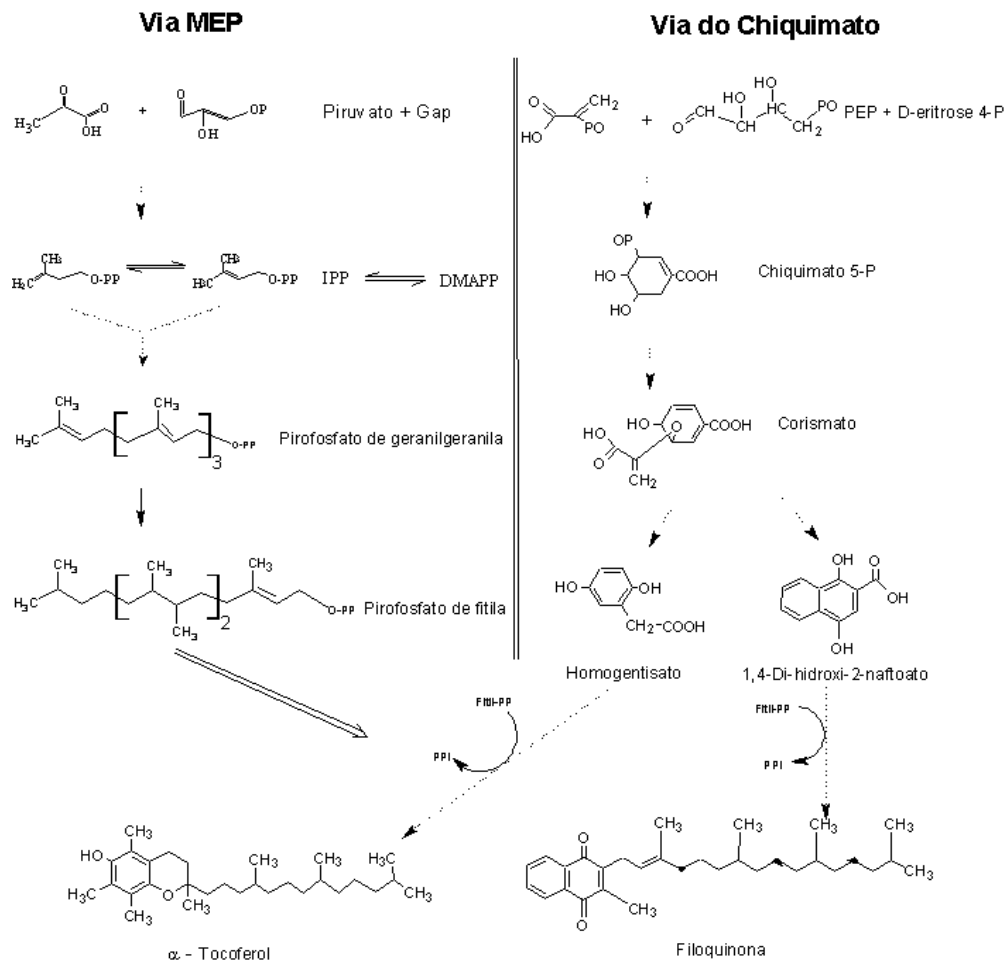


Figura 7- Via de biossíntese para as vitaminas E e K1. Ambas as vitaminas são provenientes das Vias MEP e Chiquimato com a diferença que o α -tocoferol recebe um anel de cromanol enquanto que a filoquinona recebe um anel de 1,4 dihidroxi-2-naftoato. Utilizamos como precursores o GGPP e o Fitol-PP. Abreviações: GAP, gliceraldeído 3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; IPP, Pirofosfato de isopentenila; DMAPP, pirofosfato de dimetilalila.

Em plantas superiores, a maior parte do fitil-PP é direcionado para a biossíntese de clorofila, pela enzima clorofila sintase e durante a senescência são formados clorofilídeos e fitol em sua degradação. O fitol é tóxico para as plantas em sua forma livre. Foi mostrada uma via alternativa para a biossíntese de fitil-PP a partir do fitol liberado na hidrólise da clorofila em *Arabidopsis thaliana* [73] (Figura 8).

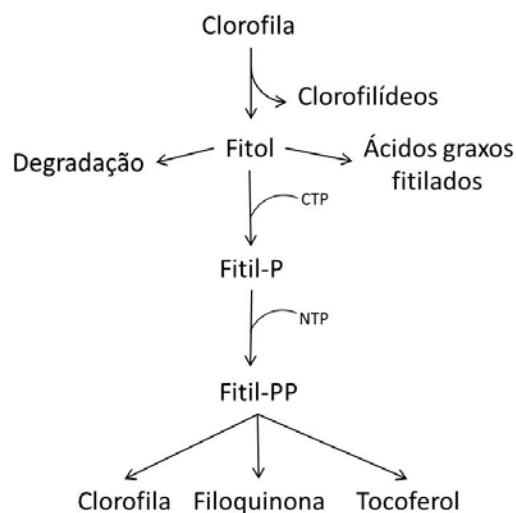


Figura 8- Esquema da via de reaproveitamento de fitol em *Arabidopsis thaliana*. O fitol é formado a partir da degradação da clorofila e pode ser degradado, ligado a ácidos graxos ou fosforilado para a formação de clorofila, filoquinona e tocoferol.

O fitol pode ser fosforilado e utilizado para biossintetizar novamente a clorofila, vitamina E, vitamina K₁ ou ser incorporado nos ácidos graxos da membrana de cloroplastos, possivelmente para evitar possíveis danos ao aparato fotossintético [73, 74].

Nos últimos 20 anos, estudos sobre isoprenilação de proteínas em *Arabidopsis thaliana* [75] e *Spinacia oleracea* (espinafre) [76] foram mostrados por meio de marcações metabólicas e análises por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), que além dos poliprenóis clássicos envolvidos na isoprenilação de proteínas como o GGPP, dolicois e FPP, também eluíam compostos radioativos com o mesmo tempo de retenção do padrão de fitol. Parmryd et al. [77] confirmaram que realmente se tratava da estrutura química de fitol por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC/MS).

1.6 Funções das prenilquinonas

As prenilquinonas possuem um anel aromático polar e uma cadeia isoprênica apolar. A cadeia isoprênica confere um caráter lipossolúvel e ancora em membranas lipídicas o grupo hidrofílico do anel aromático, que possui a atividade da prenilquinona. A maioria das prenilquinonas pertence às Naftoquinonas e Benzoquinonas.

Existem diversos sistemas onde as prenilquinonas atuam como transportadores de prótons e elétrons, por exemplo: ubiquinona atua na cadeia respiratória de células eucarióticas na membrana da mitocôndria [78], plastoquinona [79] e filoquinona atuam na fotossíntese de plantas na membrana de tilacóides de cloroplastos [80] e menaquinona e ubiquinona atuam na fotossíntese bacteriana [81]. Por possuírem a capacidade de transferir equivalentes redutores,

elétrons ou prótons em uma fase lipídica, diversos estudos têm focado a associação de prenilquinonas com a transdução de energia levando à formação de ATP.

Sendo facilmente reduzidas pelas dehidrogenases ligadas a membranas, as prenilquinonas também podem atuar como parte da maquinaria antioxidante da célula [82]. Dois mecanismos de ação para prevenção de danos exercidos pelas hidroquinonas podem ser apontados: a proteção baseada na redução direta de radicais lipídicos e de oxigênio pelos quinóis como α -tocoferol e ubiquinonas [47, 83, 84] ou a proteção baseada na reciclagem de antioxidantes [85, 86]. Por exemplo, a eficiência antioxidante da vitamina E (formada pela condensação de um anel de cromanol a uma cadeia de fitil-PP [71]) é ampliada por meio da reciclagem dos seus produtos oxidados, o tocoferoxila e tocoferolquinona. Esse processo, também chamado de ciclo redox do α -tocoferol, é importante na otimização da função antioxidante da vitamina E [83]. A reciclagem *in vitro* do α -tocoferol, a partir de seus radicais oxidados, pode ser mediada pela vitamina A [87, 88], vitamina C [85, 86, 89] e coenzima Q [90, 91]. Entretanto, existem dúvidas sobre a significância da reciclagem de tocoferoxila ou epoxitocoferoxila pelas vitaminas A e C *in vivo* [92].

Em plantas, a filoquinona é formada pela condensação de um anel de 1,4 dihidroxi-2-naftoato a uma cadeia de fitil-PP [72] e sua função está relacionada com transporte de elétrons no fotossistema I [93]. Recentemente foram levantadas outras hipóteses de funções para a filoquinona em plantas, além de transportadora de elétrons. Foi detectada a forma reduzida da vitamina K1, a hidrofiloquinona, em menores quantidades em folhas de *Arabidopsis* mantidas sob luz quando comparadas com as que foram mantidas no escuro. Os autores sugerem que a hidrofiloquinona provavelmente não esteja relacionada com o *pool* fotoativo de filoquinona e que esteja envolvida na cloro-respiração [94]. Outros estudos mostram que aproximadamente 50% do total de filoquinona não está associada ao fotossistema I e provavelmente participe do sistema antioxidante [72, 95].

Em vertebrados, a filoquinona e em especial a hidrofiloquinona servem como um cofator para certas carboxilases que convertem resíduos específicos de glutamato em proteínas alvo para γ -carboxiglutamatos (Gla) [96] as quais estão envolvidas na coagulação do sangue, homeostase óssea e na manutenção da integridade vascular [97, 98]. Como co-produto dessa carboxilação forma-se a filoquinona totalmente oxidada, a epoxi filoquinona, forma que é biologicamente inativa. Para acontecer a reciclagem da vitamina K1 (ou Ciclo da vitamina K1), a enzima vitamina K epoxi redutase (VKOR) reduz a forma epoxi em filoquinona e depois em hidrofiloquinona [99]. Essa atividade pode ser inibida pela warfarina [100-102].

1.7 Biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum*

Em 1999, Jomaa et al. [103] identificaram em *P. falciparum* os genes que codificam as enzimas-chave da via MEP, a DXS e a DXR. A primeira catalisa a condensação do D-gliceraldeído 3-fosfato e do piruvato formando o 5-fosfato 1-desoxi-D-xilulose, enquanto a segunda catalisa o rearranjo molecular e reduz esse produto nas formas isoprênicas básicas [46]. 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. Nos estudos em camundongos houve uma queda na parasitemia chegando a <1% e depois de oito dias estavam curados. Porém, quando o tratamento foi feito em quatro dias, observou-se recrudescência [103], indicando que a simples monoterapia com fosmidomicina ou seu análogo pode não ser suficiente para os casos clínicos de malária [61, 104, 105]. Em 2004, Cassera et al. [36] 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 intraeritrocíticos de *P. falciparum* biossintetizam isoprenóides que se ligam a proteínas. O estudo foi realizado por meio de marcações metabólicas com [³H]GGPP às quais apresentaram bandas marcadas radioativamente de proteínas com massas moleculares aproximados de 6-7 kDa, 21-28 kDa nos três estágios parasitários. Quando o precursor utilizado foi o [³H]FPP, além das bandas com massa molecular igual às marcadas com [³H]GGPP, uma nova banda de com peso molecular aproximado de 50 kDa foi detectada. Já, Moura et al. [38] fizeram experimentos de imunoprecipitação com anticorpos monoclonais anti-Ras e anti-Rap, que reconhecem as proteínas p21^{ras} e p21^{rap} do parasita, 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 [24].

O parasita 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 [35]. Em 2005, Tonhosolo et al. [40] 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. [39] testaram terpenos como nerolidol, o qual apresentou uma ação inibitória na biossíntese de dolicois e da

cadeia isoprênica ligada ao anel de benzoquinona das ubiquinonas. Recentemente, descrevemos o mecanismo de ação de um derivado natural de nerolidol, o 4-nerolidilcatecol (Anexo I). Com o intuito de iniciar estudos *in vivo* sobre a ação do nerolidol, desenvolvemos um método de detecção e quantificação em plasma de camundongos tratados com nerolidol (Anexo II). Futuramente, iremos avaliar o efeito desse terpeno na parasitemia de camundongos infectados por *P. berguei*.

Nosso grupo identificou, por marcação metabólica com [³H]GGPP em culturas assincrônicas, a presença de moléculas que eluíam em tempos de retenção diferentes às dos isoprenóides anteriormente caracterizados através do método de *Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Confirmou-se que esses compostos eram carotenóides biossintetizados por *P. falciparum* [41], compostos pela primeira vez caracterizados em parasitas. 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 [27, 30], 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.

Passamos a procurar produtos da via MEP, assim como carotenóides, até então ditos de biossíntese exclusiva de plantas, bactérias e fungos. Caracterizamos bioquimicamente a biossíntese de menaquinona-4 nos três estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum*. A droga Ro 48-8071 inibe a biossíntese dessa vitamina e o crescimento do parasita. A menaquinona-4 atua no transporte de elétrons na cadeia respiratória do parasita [42]. Além disso, existe um equilíbrio no *pool* de menaquinona-4 e ubiquinona, quando uma é inibida, a biossíntese da outra é aumentada, assim como mostrado em bactérias [81].

1.7.1 Estresse oxidativo e antioxidantes em *P. falciparum*

O plasmódio é sensível ao estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* e diversas drogas atuam no sistema redox do parasita como a cloroquina [106] e cercosporina [107]. Para minimizar os danos causados pelas espécies reativas, toda a bateria de enzimas antioxidantes e seus substratos encontrados nos parasitos e nas hemácias devem estar funcionalmente presentes [108]. Algumas enzimas relacionadas com o sistema da glutathiona já foram descritas em espécies de *Plasmodium* como a glutathiona sintase [109] e redutase [110], superóxido dismutase [111], glutamato desidrogenase [112] e glicose 6-fosfato desidrogenase [113]. Eritrócitos infectados perdem a habilidade de fazer a síntese *de novo* de glutathiona porque o

intermediário γ -glutamil-cisteína é depletado da célula [114]. Essa desvantagem é compensada pela exportação ativa de glutathiona oxidada, pelo parasita, no citoplasma do eritrócito, onde ela é reduzida pela glutathiona redutase da célula e pelas enzimas da via das pentoses, que são 25 vezes mais ativas [114]. Além disso, o parasita possui o sistema da tioredoxina funcional compreendendo tioredoxina redutase [115], tioredoxina [116], tioredoxina peroxidase [117], assim como 1-*cis*-peroxiredoxina [25].

A hemoglobina representa a maior fonte de aminoácidos para o parasita, entretanto sua degradação em um vacúolo digestivo acidificado resulta na produção do grupo heme tóxico FP e EROs. Para se proteger, o protozoário cristaliza a porção heme liberada durante a proteólise da hemoglobina em um pigmento insolúvel menos tóxico chamado hemozoína ou β -hematina [118]. Outros meios alternativos de detoxificação da FP incluem a degradação da FP [119], reações com a glutathiona [120] e proteínas que se ligam à FP [121]. Contudo, análises químicas de eritrócitos infectados indicam que a maioria da FP está localizada no vacúolo digestivo e pelo menos 90% está presente na forma hemozoína [122]. As EROs podem causar impressões digitais do estresse oxidativo nas membranas dos glóbulos vermelhos infectados, como a agregação de banda 3 [123] e o aumento dos lipoperóxidos [124]. O sistema de defesa antioxidante da hemácia é constituído, principalmente, por enzimas catalase, superóxido dismutase [125], glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, metahemoglobina redutase dependente de NADPH [126]; por vitaminas (vitamina E e ácido ascórbico) e glutathiona reduzida [127].

Produtos finais da via de isoprenóides como a vitamina E podem atuar como antioxidantes e na estabilização de membranas, como descritos em plantas [128] e cianobactérias [129], e estes dados nos fazem supor que a vitamina E, biossintetizada pelo parasita, poderia atuar dentro dos sistemas antioxidantes descritos acima.

O parasita biossintetiza α -tocoferol nos três estágios intraeritrocíticos. Culturas de *P. falciparum* tratadas com ácido úsnico tiveram o crescimento e a biossíntese de vitamina E inibidos [43]. Quando cultivamos os parasitas com uma tensão de oxigênio de 20%, ao invés de 5%, a biossíntese de α -tocoferol está aumentada quando comparada com os parasitas cultivados em condições normais [43]. Conseqüentemente, a lipoperoxidação também aumenta quando inibimos a biossíntese de vitamina E [43]. Fato esperado, uma vez que a principal função da vitamina E é evitar a autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados [84, 130].

Em tilacóides de espinafre, o α -tocoferol em conjunto com a vitamina K₁ e plastoquinona atuam como *scavenger* de superóxidos formados pelo fotossistema I, reduzindo

a difusão desse radical na superfície da membrana e inibindo a formação de peróxido de hidrogênio, resultando na proteção das membranas dos tilacóides contra a lipoperoxidação [131]. Foi mostrada por meio de marcações metabólicas com L-[U-¹⁴C] tirosina a presença de tocoferóis radioativos em frações sub-celulares como cloroplastos, mitocôndria e microsossomos de *Calendula officinalis* [132]. Resultados preliminares *in vitro* de nosso laboratório apontam que a vitamina E, biossintetizada pelo parasita, pode interferir na lipoperoxidação de eritrócitos infectados. Entretanto, esses resultados não nos mostram a sua real função, sendo necessária a demonstração dos seus produtos oxidados, tocoferoxila e tocoferolquinona e dos níveis de estresse oxidativo ao se inibir sua biossíntese, para comprovar nossa hipótese sobre o possível envolvimento da vitamina E na defesa antioxidante em *P. falciparum*.

1.8 Justificativas e Objetivos

A biossíntese de isoprenóides pela via MEP tem sido apontada como um importante alvo para o desenvolvimento de novos antimaláricos devido à importância dos produtos derivados dessa via direcionados para o metabolismo de qualquer célula eucariótica e, principalmente, ao fato de a via de biossíntese de isoprenóides no parasita ser diferente da existente em seu hospedeiro vertebrado.

Nosso grupo mostrou que o parasita é capaz de biossintetizar, a partir do IPP, o composto GGPP [133], um intermediário chave para a biossíntese das vitaminas E e K₁. O parasita biossintetiza α e γ -tocoferol nos três estágios intraeritrocitários e o ácido úsnico é capaz de inibir essa biossíntese [43]. Contudo, ainda não foi mostrado se a vitamina E, biossintetizada pelo parasita, é realmente empregada na defesa contra o estresse oxidativo provocado pelo seu metabolismo e pelo hospedeiro.

Temos evidências de que a via metabólica de filoquinona esteja ativa no parasita, porém é necessário identificar a via de biossíntese. A mesma poderá ser explorada para se estudar a função da vitamina no parasita e identificar possíveis alvos para antimaláricos.

O fato de o parasita biossintetizar vitamina E e possivelmente filoquinona, somado à detecção de um composto radioativo com o mesmo fator de retenção do fitol em análises por TLC de eritrócitos parasitados marcados com [³H]IPP, nos impele a estudar esse composto em *P. falciparum*, uma vez que o fitol apresenta um metabolismo bem regulado em *Arabidopsis sp* [73].

Com base nas informações descritas acima, os objetivos de trabalho foram:

- Determinar se a vitamina E atua na proteção contra o estresse oxidativo em *P. falciparum* identificando seus produtos oxidados;
- Medir os níveis de estresse oxidativo em *P. falciparum* quando a biossíntese de vitamina E é inibida;
- Caracterizar a via de biossíntese de filoquinona em *P. falciparum*;
- Detectar a presença de hidrofiloquinona e fitil-PP em *P. falciparum*;
- Verificar se a via de reaproveitamento de fitol é ativa em *P. falciparum*.

4 CONCLUSÕES

1. A vitamina E biossintetizada por *P. falciparum* atua no sistema redox do parasita, controlando os níveis de EROs no eritrócito infectado.
2. A biossíntese de vitamina K1 é ativa em *P. falciparum*.
3. A via de reaproveitamento de fitol para a biossíntese de vitamina E e K1 é ativa em *P. falciparum*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Camargo EP. *Malária, maleita, paludismo*. Ciência e Cultura. 2003;55(1):26-9.
2. Coluzzi M, Corbellini G, and Celli A. [The malariology centenary (1898-1998). 1898]. *Parassitologia*. 1998;40(4):361-76.
3. Trager W and Jensen JB. *Human malaria parasites in continuous culture*. *Science*. 1976;193(4254):673-5.
4. Rey L. *Parasitologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. 731 p.
5. Menard R. *The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way*. *Microbes Infect*. 2000;2(6):633-42.
6. World Health Organization. *World Malaria Report*. Geneva: WHO Press; 2014. 242 p.
7. Breman JG. *The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden*. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64(1-2 Suppl):1-11.
8. Greenwood BM et al. *Malaria*. *Lancet*. 2005;365(9469):1487-98.
9. Suh KN, Kain KC, and Keystone JS. *Malaria*. *Cmaj*. 2004;170(11):1693-702.
10. Moorthy VS, Good MF, and Hill AV. *Malaria vaccine developments*. *Lancet*. 2004;363(9403):150-6.
11. Polley SD, McRobert L, and Sutherland CJ. *Vaccination for vivax malaria: targeting the invaders*. *Trends Parasitol*. 2004;20(3):99-102.
12. World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria*. 3. ed. Geneva: WHO Press; 2015. 316 p.

* 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].

13. Ekland EH and Fidock DA. *In vitro* evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. *Int J Parasitol.* 2008;38(7):743-7.
14. Barnes KI et al. *Increased gametocytemia after treatment: an early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in falciparum malaria.* *J Infect Dis.* 2008;197(11):1605-13.
15. Hogh B et al. *The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector.* *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(2):176-82.
16. Robert V et al. *Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine.* *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(2):210-6.
17. Handunnetti SM et al. *Features of recrudescence of chloroquine-resistant Plasmodium falciparum infections confer a survival advantage on parasites and have implications for disease control.* *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(5):563-7.
18. Price R et al. *Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria.* *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(6):1019-23.
19. de Roode JC et al. *Host heterogeneity is a determinant of competitive exclusion or coexistence in genetically diverse malaria infections.* *Proc Biol Sci.* 2004;271(1543):1073-80.
20. Molyneux DH et al. *Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction.* *Parasitol Today.* 1999;15(6):238-40.
21. Hetzel MW 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.
22. Yoshikawa M et al. *Pyridinium cationic-dimer antimalarials, unlike chloroquine, act selectively between the schizont stage and the ring stage of Plasmodium falciparum.* *Bioorg Med Chem.* 2008;16(11):6027-33
23. Levander OA and Ager AL, Jr. *Malarial parasites and antioxidant nutrients.* *Parasitology.* 1993;107Suppl:S95-106.
24. D'Alexandri FL et al. *Protein dolichylation in Plasmodium falciparum.* *FEBS Lett.* 2006;580(27):6343-8.

25. Kawazu S et al. *Roles of 1-Cys peroxiredoxin in haem detoxification in the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Febs J*. 2005;272(7):1784-91.
26. Kimura EA et al. *N-linked glycoproteins are related to schizogony of the intraerythrocytic stage in Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 1996;271(24):14452-61.
27. Seeber F. *Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa*. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003;3(2):99-109.
28. Roberts CW et al. *The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites*. *J Infect Dis*. 2002;185Suppl1:S25-36.
29. Roberts F et al. *Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites*. *Nature*. 1998;393(6687):801-5.
30. Ralph SA et al. *Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the Plasmodium falciparum apicoplast*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(3):203-16.
31. Woodard CL et al. *Oxindole-based compounds are selective inhibitors of Plasmodium falciparum cyclin dependent protein kinases*. *J Med Chem*. 2003;46(18):3877-82.
32. Go ML. *Novel antiplasmodial agents*. *Med Res Rev*. 2003;23(4):456-87.
33. Eisenreich W et al. *Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway*. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(12):1401-26.
34. Couto AS et al. *Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of Plasmodium falciparum: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units*. *Biochem J*. 1999;341 (Pt 3):629-37.
35. de Macedo CS et al. *Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in Plasmodium falciparum*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;207(1):13-20.
36. Cassera MB et al. *The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2004;279(50):51749-59.

37. Cassera MB et al. *Effect of fosmidomycin on metabolic and transcript profiles of the methylerythritol phosphate pathway in Plasmodium falciparum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):377-83.
38. Moura IC et al. *Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(9):2553-8.
39. Rodrigues Goulart H et al. *Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(7):2502-9.
40. Tonhosolo R et al. *Identification, molecular cloning and functional characterization of an octaprenyl pyrophosphate synthase in intra-erythrocytic stages of Plasmodium falciparum*. Biochem J. 2005;392(Pt 1):117-26.
41. Tonhosolo R et al. *Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum*. J Biol Chem. 2009;284(15):9974-85.
42. Tonhosolo R et al. *Intraerythrocytic Stages of Plasmodium falciparum Biosynthesize Menaquinone*. FEBS Lett. 2010;584(23):4761-8.
43. Sussmann RA et al. *Intraerythrocytic stages of Plasmodium falciparum biosynthesize vitamin E*. FEBS Lett. 2011;585(24):3985-91.
44. van Dooren GG, Stimmler LM, and McFadden GI. *Metabolic maps and functions of the Plasmodium mitochondrion*. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(4):596-630.
45. Yeh E and DeRisi JL. *Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage Plasmodium falciparum*. PLoS Biol. 2011;9(8):e1001138.
46. Michal G. *Biochemical Pathways, An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. 1. ed. New York: John Wiley & Sons; 1999. 277 p.
47. Aejmelaeus R et al. *Ubiquinol-10 and total peroxy radical trapping capacity of LDL lipoproteins during aging: the effects of Q-10 supplementation*. Mol Aspects Med. 1997;18 Suppl:S113-20.
48. Goldstein JL and Brown MS. *Regulation of the mevalonate pathway*. Nature. 1990;343(6257):425-30.

49. Istvan ES and Deisenhofer J. *Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase*. Science. 2001;292(5519):1160-4.
50. Zhou D and White RH. *Early steps of isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli*. Biochem J. 1991;273 (Pt 3):627-34.
51. Lange BM et al. *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.
52. Sprenger GA 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;94(24):12857-62.
53. Hill RE 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.
54. Cane DE, Du, S., Robinson, J. K., Hsiung, Y., Spenser, I. D. *Biosynthesis of vitamin B6: Enzymatic conversion of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate to pyridoxol phosphate*. Journal of the Americal Chemical Society. 1999;121(33):7722-3.
55. White RH. *Stable isotope studies on the biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in Escherichia coli*. Biochemistry. 1978;17(18):3833-40.
56. Takahashi S et al. *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;95(17):9879-84.
57. 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 perpenoid biosynthesis*. Tetrahedron Letters. 1998;39(43):7913-6.
58. Richard SB et al. *Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C- methylerythritol synthetase involved in mevalonate- independent isoprenoid biosynthesis*. Nat Struct Biol. 2001;8(7):641-8.
59. Rohdich F 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.
60. Rohdich F et al. *The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates*. Curr Opin Chem Biol. 2001;5(5):535-40.

61. Hintz M et al. *Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in Escherichia coli.* FEBS Lett. 2001;509(2):317-22.
62. Hecht S 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.
63. Adam P 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;99(19):12108-13.
64. Cunningham FX, Jr., Lafond TP, and Gantt E. *Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis.* J Bacteriol. 2000;182(20):5841-8.
65. Lichtenthaler HK et al. *Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway.* FEBS Lett. 1997;400(3):271-4.
66. Disch A et al. *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.
67. Putra SR et al. *Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gram-negative bacteria and mycobacteria.* FEMS Microbiol Lett. 1998;164(1):169-75.
68. Kuzuyama T. *Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units.* Biosci Biotechnol Biochem. 2002;66(8):1619-27.
69. Ralph SA et al. *Evolutionary pressures on apicoplast transit peptides.* Mol Biol Evol. 2004;21(12):2183-94.
70. Keller Y et al. *Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis--evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase.* Eur J Biochem. 1998;251(1-2):413-7.
71. Collakova E and DellaPenna D. *Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from Synechocystis sp. PCC 6803 and Arabidopsis.* Plant Physiol. 2001;127(3):1113-24.
72. Lohmann A et al. *Deficiency in phylloquinone (vitamin K1) methylation affects prenyl quinone distribution, photosystem I abundance, and anthocyanin accumulation in the Arabidopsis AtmenG mutant.* J Biol Chem. 2006;281(52):40461-72.

73. Ischebeck T et al. *A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis*. J Biol Chem. 2006;281(5):2470-7.
74. Gaudé N et al. *Nitrogen deficiency in Arabidopsis affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytol esters*. Plant J. 2007;49(4):729-39.
75. Gutkowska M et al. *Proteins are polyisoprenylated in Arabidopsis thaliana*. Biochemical and biophysical research communications. 2004;322(3):998-1004.
76. Swieżewska E et al. *Occurrence of prenylated proteins in plant cells*. Biochemical and biophysical research communications. 1993;192(1):161-6.
77. Parmryd I, Andersson B, and Dallner G. *Protein prenylation in spinach chloroplasts*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(18):10074-9.
78. Lenaz G et al. *The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport*. Mitochondrion. 2007;7 Suppl:S8-33.
79. Biggins J. *The role of plastoquinone in the in vivo photosynthetic cyclic electron transport pathway in algae*. FEBS Lett. 1974;38(3):311-4.
80. Chitnis PR. *Photosystem I*. Plant Physiol. 1996;111(3):661-9.
81. Pandya KP and King HK. *Ubiquinone and menaquinone in bacteria: a comparative study of some bacterial respiratory systems*. Arch Biochem Biophys. 1966;114(1):154-7.
82. Jemiola-Rzeminska M, Mysliwa-Kurdziel B, and Strzalka K. *The influence of structure and redox state of prenylquinones on thermotropic phase behaviour of phospholipids in model membranes*. Chem Phys Lipids. 2002;114(2):169-80.
83. Liebler DC. *The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E*. Crit Rev Toxicol. 1993;23(2):147-69.
84. Schneider C. *Chemistry and biology of vitamin E*. Mol Nutr Food Res. 2005;49(1):7-30.
85. Constantinescu A, Han D, and Packer L. *Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes*. J Biol Chem. 1993;268(15):10906-13.

86. Kagan VE et al. *Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins*. J Lipid Res. 1992;33(3):385-97.
87. Bohm F et al. *Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids*. J Photochem Photobiol B. 1998;44(3):211-5.
88. Palozza P and Krinsky NI. *beta-Carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants*. Arch Biochem Biophys. 1992;297(1):184-7.
89. Ho CT and Chan AC. *Regeneration of vitamin E in rat polymorphonuclear leucocytes*. FEBS Lett. 1992;306(2-3):269-72.
90. Ingold KU et al. *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;90(1):45-9.
91. Stoyanovsky DA et al. *Ubiquinone-dependent recycling of vitamin E radicals by superoxide*. Arch Biochem Biophys. 1995;323(2):343-51.
92. Livrea MA and Tesoriere L. *Interactions between vitamin A and vitamin E in liposomes and in biological contexts*. Methods Enzymol. 1999;299:421-30.
93. Sigfridsson K, Hansson O, and Brzezinski P. *Electrogenic light reactions in photosystem I: resolution of electron-transfer rates between the iron-sulfur centers*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(8):3458-62.
94. Oostende C, Widhalm JR, and Basset GJ. *Detection and quantification of vitamin K(1) quinol in leaf tissues*. Phytochemistry. 2008;69(13):2457-62.
95. Gross J et al. *A plant locus essential for phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes*. J Biol Chem. 2006;281(25):17189-96.
96. Ulrich MM et al. *Vitamin K-dependent carboxylation. A synthetic peptide based upon the gamma-carboxylation recognition site sequence of the prothrombin propeptide is an active substrate for the carboxylase in vitro*. J Biol Chem. 1988;263(20):9697-702.
97. Vermeer C et al. *Beyond deficiency: potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health*. European journal of nutrition. 2004;43(6):325-35.

98. Schurgers LJ et al. *Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose-response relationships in healthy subjects*. *Blood*. 2004;104(9):2682-9.
99. Chu PH et al. *Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(51):19308-13.
100. Matschiner JT et al. *Isolation and characterization of a new metabolite of phylloquinone in the rat*. *Biochim Biophys Acta*. 1970;201(2):309-15.
101. Willingham AK and Matschiner JT. *Changes in phylloquinone epoxidase activity related to prothrombin synthesis and microsomal clotting activity in the rat*. *Biochem J*. 1974;140(3):435-41.
102. Shearer MJ and Newman P. *Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis*. *J Lipid Res*. 2014;55(3):345-62.
103. Jomaa H et al. *Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs*. *Science*. 1999;285(5433):1573-6.
104. Wiesner J, Borrmann S, and Jomaa H. *Fosmidomycin for the treatment of malaria*. *Parasitol Res*. 2003;90 Suppl 2:S71-6.
105. Missinou MA et al. *Fosmidomycin for malaria*. *Lancet*. 2002;360(9349):1941-2.
106. Chugh M et al. *Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(14):5392-7.
107. Butzloff S et al. *Cytometric quantification of singlet oxygen in the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2012;81(8):698-703.
108. Dockrell HM and Playfair JH. *Killing of Plasmodium yoelii by enzyme-induced products of the oxidative burst*. *Infect Immun*. 1984;43(2):451-6.
109. Meierjohann S, Walter RD, and Muller S. *Glutathione synthetase from Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2002;363(Pt 3):833-8.

110. Farber PM et al. *Molecular cloning and characterization of a putative glutathione reductase gene, the PfGR2 gene, from Plasmodium falciparum.* Eur J Biochem. 1996;239(3):655-61.
111. Becuwe P et al. *Presence of an endogenous superoxide dismutase activity in three rodent malaria species.* Parasitol Res. 1993;79(5):349-52.
112. Krauth-Siegel RL et al. *Glutathione reductase and glutamate dehydrogenase of Plasmodium falciparum, the causative agent of tropical malaria.* Eur J Biochem. 1996;235(1-2):345-50.
113. O'Brien E et al. *Cloning of the glucose 6-phosphate dehydrogenase gene from Plasmodium falciparum.* Mol Biochem Parasitol. 1994;64(2):313-26.
114. Atamna H and Ginsburg H. *The malaria parasite supplies glutathione to its host cell--investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with Plasmodium falciparum.* Eur J Biochem. 1997;250(3):670-9.
115. Kanzok SM et al. *The thioredoxin system of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Glutathione reduction revisited.* J Biol Chem. 2000;275(51):40180-6.
116. Krnajski Z et al. *The malaria parasite Plasmodium falciparum possesses a functional thioredoxin system.* Mol Biochem Parasitol. 2001;112(2):219-28.
117. Krnajski Z, Walter RD, and Muller S. *Isolation and functional analysis of two thioredoxin peroxidases (peroxiredoxins) from Plasmodium falciparum.* Mol Biochem Parasitol. 2001;113(2):303-8.
118. Bendrat K, Berger BJ, and Cerami A. *Haem polymerization in malaria.* Nature. 1995;378(6553):138-9.
119. Loria P et al. *Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials.* Biochem J. 1999;339(Pt 2):363-70.
120. Ginsburg H et al. *Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action.* Biochem Pharmacol. 1998;56(10):1305-13.
121. Campanale N et al. *Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, Plasmodium falciparum.* J Biol Chem. 2003;278(30):27354-61.

122. Egan TJ et al. *Fate of haem iron in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2002;365(Pt 2):343-7.
123. Giribaldi G et al. *Growth of Plasmodium falciparum induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes*. *Br J Haematol*. 2001;113(2):492-9.
124. Simoes AP et al. *Lipid peroxidation in Plasmodium falciparum-parasitized human erythrocytes*. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298(2):651-7.
125. Soding J, Biegert A, and Lupas AN. *The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction*. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Web Server issue):W244-8.
126. Repetto MG et al. *Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients*. *Eur J Clin Invest*. 1999;29(7):643-9.
127. Manoharan S et al. *Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma*. *Indian J Med Res*. 2005;122(6):529-34.
128. Sattler SE et al. *Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination*. *Plant Cell*. 2004;16(6):1419-32.
129. Maeda H et al. *Tocopherols protect Synechocystis sp. strain PCC 6803 from lipid peroxidation*. *Plant Physiol*. 2005;138(3):1422-35.
130. Wolf G. *The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill*. *J Nutr*. 2005;135(3):363-6.
131. Kruk J et al. *Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes*. *Biochemistry*. 2003;42(28):8501-5.
132. Janiszowska W and Jasinska R. *Intracellular localization of labelling of tocopherols with [U-14C]tyrosine in Calendula officinalis leaves*. *Acta Biochim Pol*. 1982;29(1-2):37-44.
133. Jordao FM et al. *In vitro and in vivo antiplasmodial activities of risedronate and its interference with protein prenylation in Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(5):2026-31.

134. Trager W and Jenson JB. *Cultivation of malarial parasites*. Nature. 1978;273(5664):621-2.
135. Lambros C and Vanderberg JP. *Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture*. J Parasitol. 1979;65(3):418-20.
136. Goodyer ID et al. *Purification of mature-stage Plasmodium falciparum by gelatine flotation*. Ann Trop Med Parasitol. 1994;88(2):209-11.
137. Karl S, Davis TM, and St Pierre TG. *Parameterization of high magnetic field gradient fractionation columns for applications with Plasmodium falciparum infected human erythrocytes*. Malar J. 2010;9:116.
138. Liebler DC, Burr JA, and Ham AJ. *Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products*. Methods Enzymol. 1999;299:309-18.
139. Desjardins RE et al. *Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique*. Antimicrob Agents Chemother. 1979;16(6):710-8.
140. Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 1970;227(5259):680-5.
141. Fujita T et al. *Effects of reactive oxygen species on α -tocopherol production in mitochondria and chloroplasts of Euglena gracilis*. Journal of Applied Phycology. 2008;21:185-191.
142. Daub ME et al. *Dihydrocercosporin singlet oxygen production and subcellular localization: a possible defense against cercosporin phototoxicity in Cercospora*. Photochemistry and photobiology. 2000;71(2):135-40.
143. Daub ME and Hangarter RP. *Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin*. Plant Physiol. 1983;73(3):855-7.
144. Jain SK, Wise R, and Bocchini JJ, Jr. *Vitamin E and vitamin E-quinone levels in red blood cells and plasma of newborn infants and their mothers*. J Am Coll Nutr. 1996;15(1):44-8.
145. Lipton JW et al. *Prenatal cocaine administration increases glutathione and alpha-tocopherol oxidation in fetal rat brain*. Brain Res Dev Brain Res. 2003;147(1-2):77-84.

146. Murphy ME et al. *Antioxidant depletion in aortic crossclamping ischemia: increase of the plasma alpha-tocopheryl quinone/alpha-tocopherol ratio*. Free Radic Biol Med. 1992;13(2):95-100.
147. Tohgi H et al. *Concentrations of alpha-tocopherol and its quinone derivative in cerebrospinal fluid from patients with vascular dementia of the Binswanger type and Alzheimer type dementia*. Neurosci Lett. 1994;174(1):73-6.
148. D'Alexandri FL et al. *Electrospray ionization mass spectrometry analysis of polyisoprenoid alcohols via Li⁺ cationization*. Anal Biochem. 2006;355(2):189-200.
149. Lamon-Fava S et al. *Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans*. The American journal of clinical nutrition. 1998;67(6):1226-31.
150. Johnson TW et al. *Recruitment of a foreign quinone into the A(1) site of photosystem I. I. Genetic and physiological characterization of phylloquinone biosynthetic pathway mutants in Synechocystis sp. pcc 6803*. J Biol Chem. 2000;275(12):8523-30.
151. Suvarna K et al. *Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from Escherichia coli*. Journal of bacteriology. 1998;180(10):2782-7.
152. Okano T et al. *Conversion of phylloquinone (Vitamin K1) into menaquinone-4 (Vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice*. J Biol Chem. 2008;283(17):11270-9.
153. Hempel C et al. *CNS hypoxia is more pronounced in murine cerebral than noncerebral malaria and is reversed by erythropoietin*. The American journal of pathology. 2011;179(4):1939-50.
154. Medana IM et al. *Axonal injury in cerebral malaria*. The American journal of pathology. 2002;160(2):655-66.
155. Cox D and McConkey S. *The role of platelets in the pathogenesis of cerebral malaria*. Cell Mol Life Sci. 2010;67(4):557-68.
156. Hempel C et al. *Erythropoietin treatment alleviates ultrastructural myelin changes induced by murine cerebral malaria*. Malar J. 2012;11:216.
157. Tsuchiya T et al. *Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96(26):15362-7.
158. Ishizaki K et al. *The critical role of Arabidopsis electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation*. The Plant cell. 2005;17(9):2587-600.
 159. Furuya T et al. *Production of tocopherols by cell culture of safflower*. Phytochemistry. 1987;26(10):2741-7.
 160. Valentin HE et al. *The Arabidopsis vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis*. Plant Cell. 2006;18(1):212-24.
 161. Vetter W, Schroder M, and Lehnert K. *Differentiation of refined and virgin edible oils by means of the trans- and cis-phytol isomer distribution*. Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60(24):6103-7.
 162. Sattler SE et al. *Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function*. Plant Physiol. 2003;132(4):2184-95.
 163. Eisengart A et al. *The metabolism of vitamin E. II. Purification and characterization of urinary metabolites of alpha-tocopherol*. J Biol Chem. 1956;221(2):807-17.
 164. Gross CS, Milhorat AT, and Simon EJ. *The metabolism of vitamin E. I. The absorption and excretion of d-alpha-tocopheryl-5-methyl-C14-succinate*. J Biol Chem. 1956;221(2):797-805.
 165. Dutton PJ et al. *Simon metabolites of alpha-tocopherol are not formed via a rate-controlling scission of the 3'C-H bond*. Free Radic Biol Med. 1990;9(5):435-9.
 166. Schultz M et al. *Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply?* Am J Clin Nutr. 1995;62(6 Suppl):1527S-34S.
 167. Mustacich DJ et al. *Alpha-tocopherol beta-oxidation localized to rat liver mitochondria*. Free Radic Biol Med. 2010;48(1):73-81.
 168. Martius C. *The metabolic relationships between the different K vitamins and the synthesis of the ubiquinones*. The American journal of clinical nutrition. 1961;9(4)Pt 2:97-103.

169. Billeter M, Bolliger W, and Martius C. [*Studies on the Transformation of the K Vitamins Given Orally by Exchange of Side Chains and the Role of Intestinal Bacteria Therein*]. *Biochemische Zeitschrift*. 1964;340:290-303.