

FABIANA MORANDI JORDÃO

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA
BIOSSÍNTESE DE TIAMINA (VITAMINA B₁)
EM *PLASMODIUM FALCIPARUM*

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

São Paulo
2007

FABIANA MORANDI JORDÃO

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA
BIOSSÍNTESE DE TIAMINA (VITAMINA B₁) EM
PLASMODIUM FALCIPARUM

Dissertação apresentada ao 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

Co-orientadora:
Dra. Emília Akemi Kimura

São Paulo
2007

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

© reprodução total

Jordão, Fabiana Morandi.

Caracterização bioquímica da biossíntese de Tiamina (Vitamina B₁)
em *Plasmodium falciparum* / Fabiana Morandi Jordão. -- São Paulo,
2007.

Orientador: Alejandro Miguel Katzin.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de
concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de
pesquisa: Via de biossíntese de isoprenóides.

Versão do título para o inglês: Biochemical characterization of the
biosynthesis of thiamine (Vitamin B₁) in *Plasmodium falciparum*.

Descritores: 1. Parasitologia 2. Bioquímica 3. Malária 4.
Plasmodium falciparum 5. Tiamina 6. Vitamina B₁ I. Katzin, Alejandro
Miguel II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro. III. Título.

ICB/SBIB126/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Candidato (a): Fabiana Morandi Jordão

Título da Dissertação: Caracterização bioquímica da biossíntese de Tiamina (Vitamina B₁)
em *Plasmodium falciparum*

Orientador: Alejandro Miguel Katzin

Co-orientador: Emília Akemi Kimura

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública, realizada a / /, considerou

Aprovado (a)

Reprovado (a)

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

Examinador (a) Assinatura.....

Nome.....

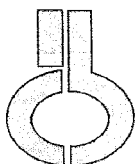
Instituição.....

Presidente Assinatura.....

Nome.....

Instituição.....

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 166, referente ao projeto intitulado “*Caracterização bioquímica da biossíntese de tiamina em Plasmodium falciparum*” sob a responsabilidade de Fabiana Morandi Jordão, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 09 de agosto de 2006.

PROF. DR. UBIRANTAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais Santo e Maria e, aos meus irmãos Marcelo e Tatiana. Sem o apoio, amor e compreensão deles, eu nunca chegaria até aqui....

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alejandro, pelo acolhimento em seu laboratório, amizade, orientação, dedicação, ensinamentos e, com certeza, paciência infinita.

A Emília, pela amizade, apoio e inúmeras discussões. Sua colaboração foi essencial para minha formação e para a finalização deste trabalho.

A Valnice, pelo carinho e amizade, pessoa que a cada dia admiro mais. Sem ela, esse trabalho não seria possível.

Ao Fábio, pelas inúmeras discussões, dicas, ajudas, ensinamentos e paciência infinita; enfim, pessoa extremamente competente, essencial para realização desse trabalho.

A Bélen, pela idealização desse projeto e pela ajuda no início do trabalho experimental.

Aos meus queridos amigos de laboratório Miriam, Renata e Sarinha por estarem presentes nas horas boas e, darem a maior força nas horas ruins.

Aos amigos Herbert e Sara, que não estão no laboratório, porém sempre estão presentes.

Ao professor Gerd e as meninas do seu laboratório, pela amizade, convivência e por estarem sempre presentes.

Ao Dr. Ernani Pinto (FCF-USP), por ter cedido à droga utilizada nesse trabalho, e por suas valiosas ajudas.

Ao professor Arthur Gruber (ICB-USP) e ao Dr. Emilio Fernando Merino (NYU) pelas análises de bioinformática.

Aos docentes, funcionários e alunos do Departamento de Parasitologia, pela amizade, apoio e convivência.

Ao Dr. Silvano Wendel, Diretor do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês, pelas bolsas de sangue e plasma para a cultura de *P.falciparum* e, às várias pessoas que doaram hemácias, pois sem elas seria impossível a realização do meu trabalho.

A minha querida irmã, que apesar das inúmeras brigas, sempre me apoiou nos momentos mais difíceis, que se fazem mais difíceis ainda quando meus pais estão longe.

E acima de tudo meus pais, que sempre me deram apoio, sem eles não teria conseguido concluir esse trabalho.

A FAPESP e CNPq, pelo suporte financeiro.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim". (Chico Xavier)

RESUMO

Jordão, FM. Caracterização bioquímica da biossíntese de Tiamina (Vitamina B₁) em *Plasmodium falciparum* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Nesta dissertação, foi caracterizada a via de biossíntese de tiamina (Vitamina B₁) nas três formas intraeritrocitárias de *P. falciparum*, obtidas de cultura *in vitro*. Foram realizadas marcações metabólicas, utilizando diferentes precursores radioativos envolvidos na biossíntese de tiamina, já descritos para outros organismos. A caracterização dos intermediários de biossíntese da via foi realizada por duas técnicas cromatográficas (*TLC* e *RP-HPLC*). A utilização do precursor [1-¹⁴C] acetato de sódio demonstrou que a via de biossíntese de tiamina encontra-se ativa em todos os estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Investigamos os precursores que poderiam estar envolvidos na biossíntese do intermediário tiazol, e nossos dados sugerem que: a) a cisteína é a doadora do enxofre presente na molécula de tiamina; b) o aminoácido tirosina pode ser o precursor da biossíntese de tiamina, e c) a nicotinamida não é utilizada como precursor em *P. falciparum*. Também se avaliou o efeito da fosmidomicina (um inibidor da enzima DOXP reductoisomerase da via MEP) e 3CIDHP (análogo da bacimetrina) na cultura *in vitro* de *P. falciparum* e foi demonstrado que ambos propiciaram uma inibição no crescimento dos parasitas. Estes dados sugerem que a via de biossíntese de tiamina, sendo ativa nos estágios intraeritrocitários, pode ser explorada como alvo para drogas antimaláricas, devido a sua ausência em humanos.

Palavras chaves: Malária, *Plasmodium falciparum*, tiamina (Vitamina B₁).

ABSTRACT

Jordão, FM. Biochemical characterization in the biosynthesis of thiamine (Vitamin B₁) in *Plasmodium falciparum* [dissertation, (Parasitology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo; 2007.

In the present work we have demonstrated the biosynthesis of thiamin (vitamin B₁) in the intraerythrocytic stages of *P. falciparum*. Characterization of the intermediate of this pathway was performed using two different chromatographic methodologies (*TLC* and *RP-HPLC*). We have demonstrated active biosynthesis of thiamine in the three parasite stages metabolically labeled with [1-¹⁴C] sodium acetate. We also investigated which precursors could be involved in the biosynthesis of the thiazole intermediate, by metabolic labelling with different precursors. Our data suggest that the sulphur present in the thiamine molecule is formed from cysteine while that tyrosine can be the precursor of thiamine biosynthesis. Nicotinamide is not utilized as a precursor in *P.falciparum*. We also investigated the effect of fosmidomycin (an inhibitor of the DOXP reductoisomerase in the MEP pathway) and 3CIDHP (an analogue of bacimethrin) in *vitro* cultures and both showed an inhibitory effect on parasite growth. These data suggest that the biosynthesis of thiamine can be an attractive target for the development of antimalarial drugs since this pathway is absent in humans.

Key-words: Malaria, *Plasmodium falciparum*, Thiamine (Vitamin B₁).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	17
Figura 2.	Malária no mundo em 2003.....	18
Figura 3.	Via MEP.....	21
Figura 4.	Estrutura da tiamina pirofosfato.....	23
Figura 5.	Biossíntese de tiamina (Vitamina B ₁), em procariontes e eucariontes.....	26
Figura 6.	Biossíntese de tiamina em <i>P. falciparum</i>	28
Figura 7.	Teste do tiocromo, diferentes retas encontradas em diferentes experimentos.....	42
Figura 8.	Perfil cromatográfico dos padrões purificados por <i>RP-HPLC</i> em sistema isocrático (Protocolo I, item 2.4.1).....	42
Figura 9.	Perfil cromatográfico da purificação por <i>RP-HPLC</i> (Protocolo I) das frações extraídas com Etanol/H ₂ O dos estágios anel, trofozoíto e esquizonte marcados com [1- ¹⁴ C] acetato de sódio.....	43
Figura 10.	Perfil cromatográfico dos padrões purificados por <i>RP-HPLC</i> em sistema gradiente (Protocolo III, item 2.4.3).....	44
Figura 11.	Perfil cromatográfico dos padrões purificados por <i>RP-HPLC</i> em sistema gradiente (Protocolo II, item 2.4.2).....	45
Figura 12.	Perfil cromatográfico obtido da purificação por <i>RP-HPLC</i> de culturas marcadas metabolicamente com [1- ¹⁴ C] acetato de sódio e extraídas com HCl 0,1 M.....	46
Figura 13.	Cromatografia em camada delgada (<i>TLC</i>) de esquizontes marcados metabolicamente marcados [1- ¹⁴ C] acetato de sódio, extraídos com HCl 0,1M.....	46
Figura 14.	Perfil cromatográfico obtido da purificação por <i>RP-HPLC</i> (Protocolo II) das frações extraídas com TCA 40% de culturas marcadas metabolicamente com [1- ¹⁴ C] acetato de sódio.....	47
Figura 15.	Perfil radiativo obtido da purificação do precursor [1- ¹⁴ C] acetato de sódio.....	48
Figura 16.	Cromatografia em camada delgada (<i>TLC</i>) de esquizontes marcados metabolicamente com [1- ¹⁴ C] acetato de sódio, extraídos com TCA 40%.....	49
Figura 17.	Perfil cromatográfico da purificação por <i>RP-HPLC</i> (Protocolo I) das frações extraídas com etanol/H ₂ O de anel, trofozoíto e esquizonte marcados com L-[³⁵ S] cisteína.....	50
Figura 18.	Perfil cromatográfico da purificação por <i>RP-HPLC</i> das frações extraídas com TCA 40% de esquizonte marcados com L-[³⁵ S] cisteína.....	50
Figura 19.	Perfil radiativo da purificação do precursor L-[³⁵ S] cisteína.....	51
Figura 20.	Perfil cromatográfico obtido de diferentes experimentos de purificação por <i>RP-HPLC</i> das frações extraídas com TCA 40% de culturas marcadas metabolicamente com L-[³⁵ S] cisteína.....	52
Figura 21.	Perfil cromatográfico da purificação por <i>RP-HPLC</i> das frações extraídas com HCl 0,1 M de culturas marcadas metabolicamente com L-[³⁵ S] cisteína.....	52
Figura 22.	Cromatografia em camada delgada (<i>TLC</i>) de esquizontes marcados metabolicamente com L-[³⁵ S] cisteína, extraídos com TCA 40%.....	53
Figura 23.	Cromatografia em camada delgada (<i>TLC</i>) de esquizontes marcados metabolicamente com L-[³⁵ S] cisteína, extraídos com TCA 40%.....	54
Figura 24.	Perfil cromatográfico obtido após cultivo dos parasitas em meio depletado de cistina e tiamina. Parasitas no estágio de esquizonte marcados metabolicamente com L-[³⁵ S] cisteína, foram extraídos com TCA 40% e analisados.....	55
Figura 25.	Perfil cromatográfico da purificação por <i>RP-HPLC</i> das frações extraídas com TCA 40% de culturas marcadas metabolicamente com L-[³⁵ S] metionina.....	55

Figura 26.	Perfil cromatográfico da purificação do precursor L-[³⁵ S] metionina.....	56
Figura 27.	Cromatografia em camada delgada (<i>TLC</i>) de esquizontes marcados metabolicamente com L-[³⁵ S] metionina, extraídos com TCA 40%	56
Figura 28.	Perfil cromatográfico da purificação por <i>RP-HPLC</i> das frações de esquizontes marcados metabolicamente e extraídos com TCA 40%. A: esquizontes marcados com [U- ¹⁴ C] tirosina; B: esquizontes marcados com [U- ¹⁴ C] glicina	58
Figura 29.	Perfil cromatográfico da purificação dos precursores [U- ¹⁴ C] glicina e [U- ¹⁴ C] tirosina.....	59
Figura 30.	Perfil cromatográfico da purificação por <i>RP-HPLC</i> de esquizontes marcados metabolicamente, extraídos com HCl 0,1M. A: esquizontes marcados com [U- ¹⁴ C] tirosina; B: esquizontes marcados com [U- ¹⁴ C] glicina.....	60
Figura 31.	Cromatografia em camada delgada (<i>TLC</i>) de esquizontes marcados metabolicamente [U- ¹⁴ C] tirosina e [U- ¹⁴ C] glicina, extraídos com TCA 40%	61
Figura 32.	Cromatografia em camada delgada (<i>TLC</i>) de culturas assincrônicas marcadas metabolicamente [U- ¹⁴ C] tirosina, extraídos com HCl 0,1M	62
Figura 33.	Perfil cromatográfico da purificação por <i>RP-HPLC</i> das frações extraídas com TCA 40% de culturas marcadas metabolicamente com [U- ¹⁴ C] nicotinamida.	63
Figura 34.	Estrutura da molécula de bacimetrina e 3CIDHP (análogo da bacimetrina)....	63
Figura 35.	Perfil da síntese protéica em <i>P. falciparum</i> , após tratamento com diferentes concentrações do 3CIDHP.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Precusores metabólicos utilizados na caracterização da biossíntese de tiamina em <i>P. falciparum</i>	35
Tabela 2.	Efeito da fosmidomicina e 3CIDHP na biossíntese de tiamina, em parasitas marcados metabolicamente com [1- ¹⁴ C] acetato de sódio.....	65
Tabela 3.	Efeito da fosmidomicina e 3CIDHP na biossíntese de tiamina, com parasitas marcados metabolicamente com L-[³⁵ S] cisteína.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT	Adenosina difosfato-5-(B-etil)-4-metiltiazol-2-ácido carboxílico
AIR	5-aminoimidazol ribonucleotídeo
3CIDHP	3,3,3-tricloro-4,5,dihidro-pirimidona
DMPP	Dimitilalila pirofosfato
DOX	1-deoxi-D-xilulose
DOXP	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato
DXR	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase
DXS	1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintase
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
HMP	4-amino-5-hidroximetil-2-metil-pirimidina (Hidroximetilpirimidina)
HMP-PP	4-amino-5-hidroximetil-2-metil-pirimidina pirofosfato
IC₅₀	Concentração inibitória de crescimento de 50%
IPP	Isopentenil pirofosfato ou pirofosfato de isopentenila
MCS	2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase
MEcPP	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato
MEP	2C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MVA	Ácido mevalónico (“Mevalonate acid”)
NAD	Nicotinamida
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
RP-HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
THZ	4-metil-5 (B-hidroximetil) tiazol
THZ-P	4-metil-5 (B-hidroximetil) tiazol fosfato
TCA	Ácido tricloroacético
T	Tiamina livre
TP	Tiamina monofosfato
TPP	Tiamina pirofosfato
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Generalidades sobre o parasita	16
1.2 Epidemiologia da Malária	17
1.3 Resistência aos antimaláricos, controle e prevenção.....	19
1.4 Isoprenóides.....	20
1.4.1 Via de isoprenóides em <i>P. falciparum</i>	22
1.5 Tiamina.....	22
1.5.1 Generalidades	22
1.5.2 Biossíntese de tiamina	23
1.5.2.1 Biossíntese de tiamina em Procariontes	24
1.5.2.2 Biossíntese de tiamina em Eucariontes	25
1.5.3 Inibidor da via de biossíntese de Tiamina	26
1.5.4 Tiamina versus malária.....	27
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	29
2.1 Justificativa.....	30
2.2 Objetivos.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	33
3.2 Obtenção dos estágios intraeritrocitários.....	33
3.3 Lise com saponina	34
3.4 Marcações metabólicas.....	34
3.5 Determinação da IC ₅₀ do 3,3,3-tricloro-4,5,dihidro-pirimidona (3CIDHP) (análogo da bacimetrina).....	35
3.6 Marcações metabólicas e tratamento com fosmidomicina e 3CIDHP	35
3.7 Teste de inibição da síntese protéica	36
3.8 Extração de tiamina	36
3.8.1 Protocolo I	36
3.8.2 Protocolo II.....	36
3.8.3 Protocolo III.....	36
3.9 Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (<i>HPLC – High Performance Liquid Chromatography</i>).....	37
3.9.1 Protocolo I	37
3.9.2 Protocolo II.....	37
3.9.3 Protocolo III.....	38
3.10 Cromatografia em Camada Delgada (<i>Thin Layer Chromatography - TLC</i>)	38
3.11 Teste do Tiocromo.....	38
4 RESULTADOS	40
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades sobre o parasita

Os parasitas causadores da malária pertencem ao filo Apicomplexa, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. São quatro as espécies que infectam o homem: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum*, sendo o último o responsável pela forma mais grave da doença, a malária terçã maligna. Os agentes transmissores da malária são as fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*.

P. falciparum possui duas fases distintas em seu ciclo de vida: uma fase assexuada (esquizogonia), que ocorre no hospedeiro vertebrado (homem), e outra sexuada (esporogonia), que ocorre no hospedeiro definitivo invertebrado (mosquito) (Figura 1).

Ciclo de vida do parasita no homem: Ao picar o homem, os mosquitos infectados injetam com a saliva os esporozoítos, que entram na corrente sangüínea e, após 14 a 45 minutos da inoculação, alcançam o fígado. Nesse órgão, os esporozoítos invadem as células hepáticas, dando início ao ciclo pré-eritrocitário. Os esporozoítos diferenciam em trofozoítos e, após certo período de tempo se transformam em esquizontes hepáticos, que se rompem e liberam milhares de novos parasitas, os merozoítas, na corrente sangüínea. Os merozoítas invadem os glóbulos vermelhos, dando início ao ciclo intraeritrocitário. Durante o ciclo eritrocitário, o parasita passa por quatro estágios morfológicamente diferentes: anel, trofozoíto, esquizonte e merozoíta. No início do ciclo o parasita encontra-se na forma de anel jovem, diferenciando em trofozoíto e posteriormente transforma-se em esquizontes. Ao final desse estágio, os eritrócitos se rompem, liberando merozoítas na corrente sangüínea. Esses merozoítas invadem outros eritrócitos, dando início a um novo ciclo (no caso de *P. falciparum*, isso ocorre a cada 36-48 horas). Alguns anéis podem se diferenciar em gametócitos, podendo ser encontrados no sangue periférico por 60 dias. O mosquito no momento da picada pode ingerir sangue contendo esses gametócitos, iniciando-se assim a fase sexuada no interior do seu estômago.

Ciclo de vida do parasita no mosquito: Enquanto os anofelinos machos se alimentam somente de néctar e seiva vegetal, as fêmeas necessitam de sangue em sua alimentação, para o amadurecimento de seus ovos e possibilitar a oviposição. Assim, após uma fêmea do mosquito *Anopheles* ingerir sangue de um hospedeiro humano contendo as formas sexuadas do parasita (gametócitos) inicia-se a fase sexuada no interior de seu estômago. Os gametas masculinos e femininos se diferenciam em micro e macrogametas respectivamente e a fecundação, na qual acontece a formação do zigoto ou oocineto, ocorre

em poucos minutos após da alimentação sangüínea. O zigoto é a única fase diplóide do parasita. Posteriormente, o zigoto migra através da camada única de células do estômago do mosquito, posicionando-se entre esta e sua membrana basal. O oocineto se transforma em oocisto ao envolver-se por uma grossa cápsula a qual permite a passagem de nutrientes para a geração dos esporozoítas, formas infectantes, que migram para as glândulas salivares do inseto as quais poderão, no momento da picada, ser inoculadas no ser humano.

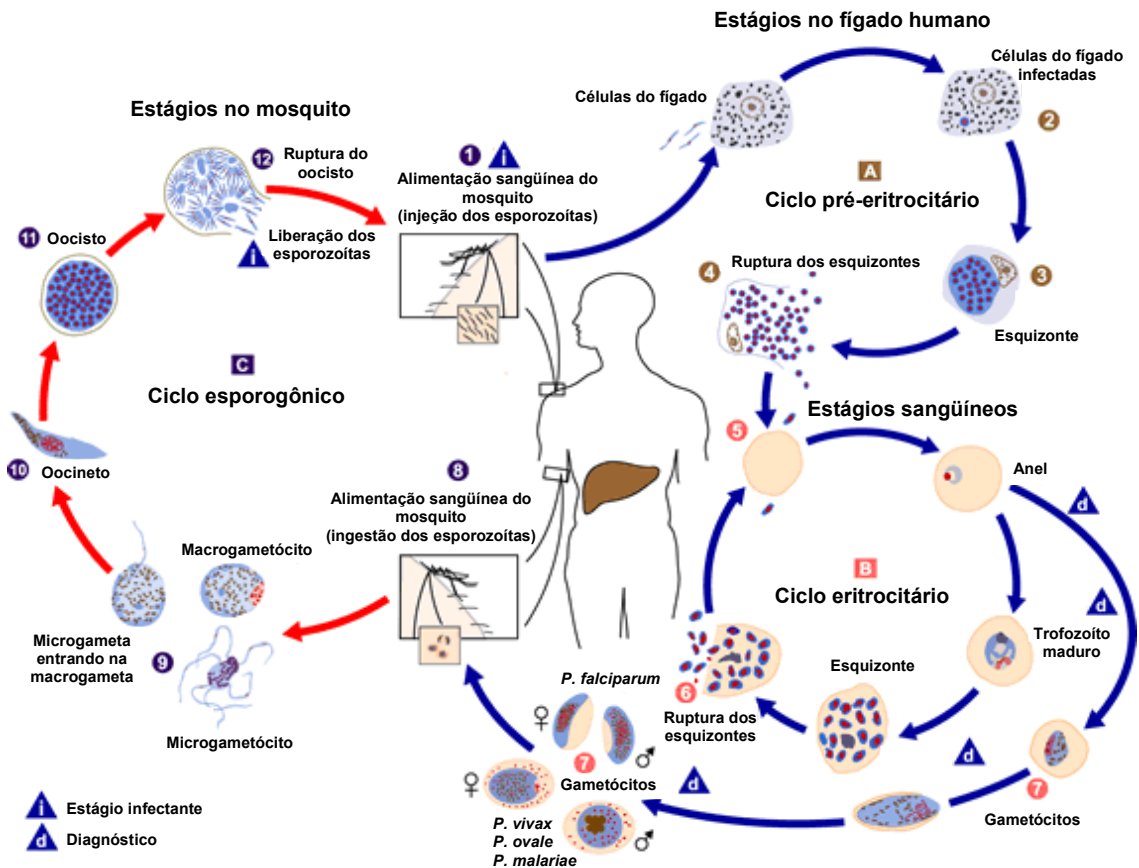


Figura 1. Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Fonte: Division of Parasitic Diseases/Centers for Disease Control and Prevention (DPDx/CDC).

1.2 Epidemiologia da Malária

A malária é uma doença infecciosa sendo uma das cinco principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, e até hoje continua sendo um dos problemas mundiais de saúde pública. Ainda hoje, a doença se faz presente em cerca de 100 países nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Figura 2). Aproximadamente 40% da população vivem em áreas de alto risco de transmissão da malária, que se distribuem na maioria dos países do continente africano ao sul do Saara, no Sudeste Asiático e em vários países das Américas Central e do Sul, incluindo Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru e Venezuela, resultando em aproximadamente 300–500 milhões de pessoas infectadas no mundo a cada

ano, chegando a 1,5 a 2 milhões de mortes ao ano, sendo que as crianças menores de cinco anos de idade são as mais acometidas. A Organização Mundial de Saúde estima que morre uma criança a cada 30 segundos de malária na África.^{I-II}

No Brasil^{III} a transmissão da malária está concentrada na região da Amazônia Legal, onde registram 99,5% do total dos casos, essa região é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, totalizando 807 municípios. Na Amazônia Legal a maior parte dos casos de malária é devido ao *P. vivax*. Foi observado que após três anos consecutivos de aumento dos casos de malária, o ano de 2006 teve uma redução de 10% dos casos em relação ao ano de 2005. No entanto, apesar da ocorrência da redução do número de caso de malária, é preocupante o aumento do número de casos por *P. falciparum*, o que favorece a ocorrência de formas grave e óbitos. No período de 1999 a 2005 observou um aumento de 19,2 % para 25,7% na proporção de caso de malária por *P. falciparum*.

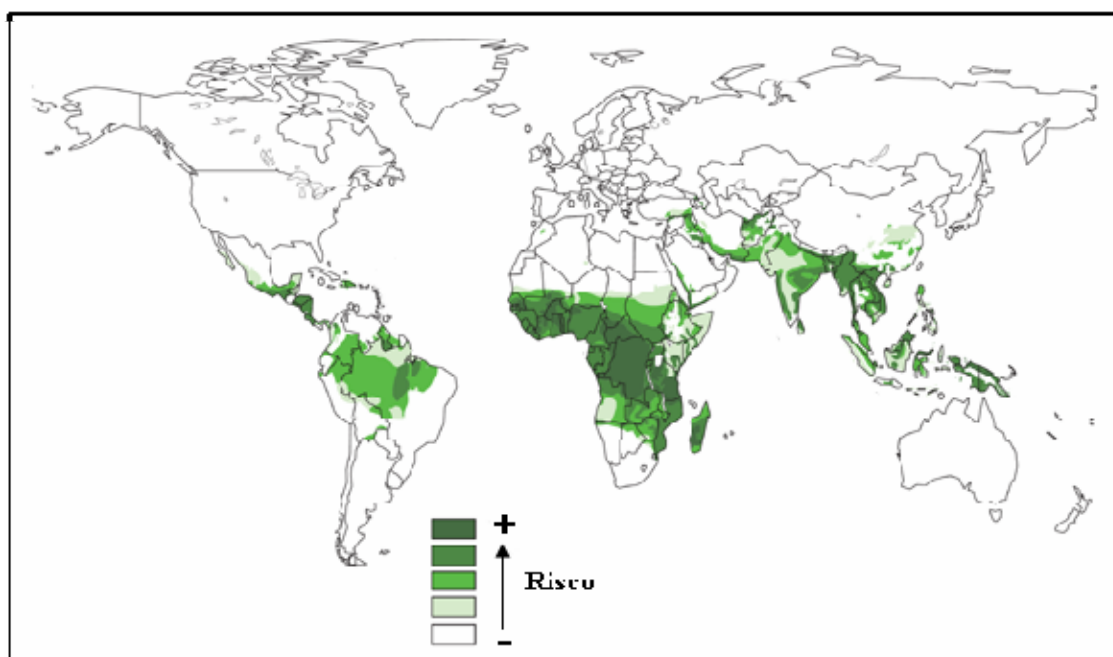


Figura 2. Malária no mundo em 2003. As cores representam o risco de transmissão nas diferentes regiões do planeta (1).

^I Disponível em: www.cdc.gov

^{II} Disponível em: www.who.int

^{III} Disponível em: www.saude.gov.br/svs

1.3 Resistência aos antimaláricos, controle e prevenção.

Um dos grandes problemas que levam ao aumento de número de casos de malária é o uso excessivo, e por vezes inadequado de inseticidas, podendo ser a principal causa da seleção de mosquitos resistentes, outra das causas é o grande aumento de cepas de *P. falciparum* resistentes aos antimaláricos e a dificuldade em se obter uma vacina.

Dentre os principais compostos antimaláricos, comumente utilizados na terapêutica, encontram-se os aminoquilinos (cloroquina, amodiaquina, primaquina, quinina, quinidina e mefloquina); os antifolatos (sulfadoxina); diaminopirimidinas (pirimetamina); os sesquiterpenos lactonas (artemisinina) e alguns antibióticos (tetraciclina, doxiciclina e clindamicina combinado principalmente com a quinina).

A resistência em alguns isolados tem sido relatada contra todos os antimaláricos existentes, com exceção a artemisinina e seus derivados (2).

A alta prevalência da infecção, constante pressão de drogas, administração inadequada do fármaco e reprodução sexuada contribuem para o desenvolvimento de parasitas resistentes. Para tentar conter a resistência de *P. falciparum* a monoterápicos e para melhorar o resultado do tratamento, combinações de antimaláricos são agora recomendados para o tratamento de malária por *P. falciparum* (2).

De acordo com o discutido anteriormente, há urgência no desenvolvimento de novos e efetivos antimaláricos. Extensivos estudos direcionam-se na busca de novos alvos para o desenvolvimento de drogas antimaláricas, como: a) inativação da biossíntese de membranas visto que, o parasita sofre várias transformações morfológicas nas fases intraeritrocitárias; b) inativar quinases envolvidas no ciclo celular (CDKs-ciclin-dependet quinases) também estudadas na terapêutica anti-câncer (3-7); c) mitocôndria do parasita, como a ubiquinona específica da cadeia respiratória do parasita (CoQ8), oxidases e componentes da respiração (8-11); d) vias metabólicas do apicoplastídeo, organela exclusiva do parasita que tem as vias de biossíntese de ácidos graxos, heme e isoprenóides (via do mevalonato-independente-MEP). Existe um grande interesse em estudar a via de isoprenóides, principalmente por esta via não estar presente em humanos (12-18).

As técnicas moleculares e a conclusão dos três projetos genoma dos hospedeiros vertebrado^{IV} e invertebrado^V e do próprio *P. falciparum*^{VI} devem facilitar o desenho racional de novas formas tanto de terapia quanto de vacinas contra malária.

1.4 Isoprenóides

Os isoprenóides compreendem um vasto grupo de compostos naturais, presentes em todos os organismos, eucariontes e procariontes (19).

São descritos aproximadamente 30.000 compostos isoprênicos na natureza, com um grande número de representantes de importância fisiológica como vitaminas, hormônios e reagentes citotásticos (ex: carotenóides, esteróis, ubiquinona, dolicois, proteínas RAS, proteínas Gy e Heme) (19, 20).

Por várias décadas, a via do mevalonato (via MVA) foi considerada a única via de síntese das unidades isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalila pirofosfato (DMPP), unidades básicas na biossíntese de isoprenóides (21). A existência da via do 2C-metil-D-eritritol 4 fosfato (MEP) para a biossíntese de unidades isoprênicas foi descoberta em 1988 por Flesch e Rohmer em seu estudo sobre a biossíntese de hopanóides (esteróis triterpênicos pentacíclicos) usando [1-¹³C] acetato de sódio como precursor em bactérias (22). A via MEP começa com a condensação do piruvato com o gliceraldeído-3-fosfato (GAP) produzindo 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP) como metabólito chave através da DOXP sintase (DXS), uma enzima dependente de tiamina (23, 24). O intermediário DOXP é também utilizado na síntese *de novo* de piridoxal (vitamina B₆) (25-27) e tiamina (vitamina B₁) (28). Na etapa seguinte, a enzima DOXP redutoisomerase (DXR) catalisa simultaneamente o rearranjo intramolecular e redução na transformação da DOXP em MEP (24, 29-32). O antibiótico Fosmidomicina (um ácido fosfônico), originalmente isolado de *Streptomyces lavendulae*, representa um potente inibidor da DXR, a enzima-chave da via MEP (33). Posteriormente, vários passos metabólicos transformam o MEP em IPP e DMPP (Figura 3).

A distribuição das duas vias em reinos taxonomicamente diferentes tem sido estudada com relativa profundidade até o momento, dado ao recente descobrimento da via MEP (34-36). A evidência experimental acumulada demonstra que a maioria dos organismos utiliza somente uma das duas vias para a biossíntese dos precursores isoprênicos.

^{IV}Disponível em: www.genome.gov

^VDisponível em: www.anodb.gr

^{VI}Disponível em: www.plasmodb.org

Os reinos arqueobactérias, fungos e animal utilizariam exclusivamente a via MVA. Com exceção de *Streptomyces*, a qual utiliza as duas vias em diferentes fases do ciclo de vida (37, 38); as eubactérias usam apenas uma das vias. As plantas utilizam ambas vias e as mesmas encontram-se em compartimentos diferentes. A via MEP sintetiza IPP e DMPP em plastídios, sendo que a via do MVA produz IPP citosólico (12).

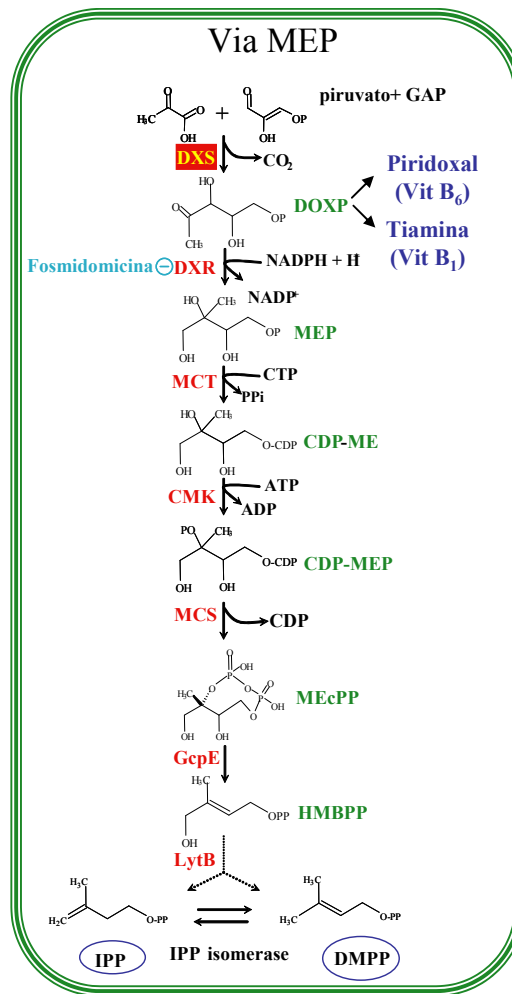


Figura 3. Via MEP. Em verde está representado o nome de cada intermediário da via e, em vermelho, o nome de cada enzima. Em azul está representado o local de atuação da fosmidomicina (DXR). DXS é uma enzima dependente de tiamina pirofosfato e DOXP é precursor da biossíntese de vitamina B₆ e B₁. Intermediários: 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, difosfato de isopentenila; DMAPP, difosfato de dimetilalila. 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 difosfato sintase; **Lyt B**, hidrometilbutenil difosfato redutase; **IPP isomerase**, difosfato de isopentenila isomerase.

1.4.1 Via de isoprenóides em *P.falciparum*

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que as formas intraeritrocitárias de *P. falciparum* sintetizam dolicois de 11 e 12 unidades isoprênicas nos três estágios parasitários (39). Foi determinada a presença de coenzimas Q de 7, 8 e 9 unidades isoprênicas (40). Várias proteínas isopreniladas foram identificadas no parasita, assim como as enzimas envolvidas na isoprenilação (41, 42).

Em 1999, Jomaa *et. al.* mostraram os genes que codificam as enzimas DXS e DXR, indicando a presença dessa via para a biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* (31). Essas enzimas estão localizadas em uma organela similar ao plastídio de algas e plantas, o apicoplasto. No mesmo estudo, foi demonstrado que a fosmidomicina, um inibidor da DOXP redutoisomerase, possui uma potente atividade antimalárica tanto *in vitro* como em camundongos infectados com *Plasmodium vinckei* (31). Recentemente, em nosso laboratório foram identificados e caracterizados bioquimicamente os cinco primeiros intermediários da via MEP em *P. falciparum* (43). Neste mesmo estudo foi demonstrado pela primeira vez a biossíntese *de novo* de vitamina B₆ em um parasita, na qual a DOXP é intermediário. O estudo ainda avaliou os efeitos da fosmidomicina na síntese de cada metabólito da via MEP, do piridoxal e também nos produtos finais: dolicois e ubiquinonas. Posteriormente, em 2001 outro grupo caracterizou molecularmente a enzima 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase (MCS) de *P. falciparum* (44).

Foi demonstrado que uma das enzimas-chave da via MEP, a DOXP sintase, utiliza como cofator a tiamina pirofosfato (23, 45) e, que o primeiro intermediário da via MEP, a DOXP, em alguns organismos é o precursor na biossíntese de tiamina (28).

1.5 Tiamina

1.5.1 Generalidades

A tiamina foi isolada pela primeira vez de fungos em 1932 por Windaus, sendo a primeira vitamina descoberta (46). Sua estrutura foi determinada por Willians em 1936 (47), enquanto sua função foi determinada em 1937 quando identificou-se como uma cocarboxilase (48) (Figura 4).

A tiamina pirofosfato é a forma ativa dessa vitamina, que tem função essencial de cofator para várias enzimas do metabolismo dos carboidratos e aminoácidos,

semelhantermente às: transcetolase, piruvato desidrogenase, piruvato descarboxilase e 2-oxoglutarato desidrogenase (49).

A produção anual da vitamina B₁ sintética no mundo pode chegar a 3.000 toneladas. Recomenda-se como ingestão diária 1,5 mg (50, 51). A deficiência de vitamina B₁ exógena pode acarretar na doença beribéri e síndrome Wernicke-Korsakoff (52).

A tiamina pirofosfato pode ser oriunda da via de salvamento, a qual a tiamina pode ser pirofosforilada por uma pirofosfoquinase ou pode ser sintetizada *de novo*. Humanos e outros mamíferos não biossintetizam a vitamina B₁ sendo dependentes da suplementação exógena de tiamina. Já plantas, fungos e muitos outros microrganismos possuem a via ativa para biossíntese de tiamina.

Devido ao desenvolvimento das técnicas moleculares e a facilidade na manipulação de alguns organismos (*Escherichia coli*, *Salmonella thiphimurium*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*), o estudo da via de biossíntese de tiamina, para esses organismos, está mais avançado, entretanto, até o momento, muitas etapas da via ainda são desconhecidas (53, 54). As enzimas, envolvidas na biossíntese de tiamina, ainda não estão totalmente elucidadas, o que pode ser explicado pela complexidade da via.

O estudo da biossíntese de tiamina é muito importante devido ao seu requerimento na dieta humana. O esclarecimento da via de biossíntese da tiamina propiciará o desenvolvimento de cepas com capacidade de expressá-la em grandes quantidades, que poderão ser utilizadas, por fermentação, na produção comercial de tiamina ou de seus componentes (53).

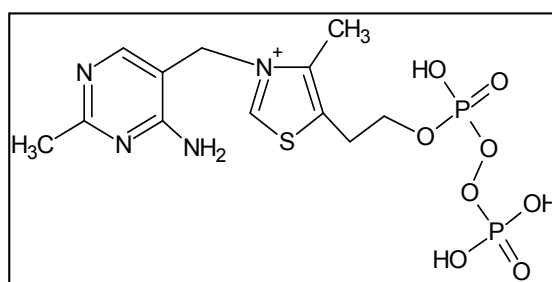


Figura 4. Estrutura da tiamina pirofosfato.

1.5.2 Biossíntese de tiamina

A biossíntese de tiamina monofosfato se dá pela união de duas vias independentes: a 4-metil-5 (B-hidroximetil) tiazol fosfato (THZ-P) e a 4-amino-5-hidroximetil-2-metil-pirimidina pirofosfato (HMP-PP) (53). A tiamina monofosfato é convertida para tiamina pirofosfato (coenzima ativa) por uma fosforilação direta (em bactérias entéricas) ou por uma

desfosforilação originando a tiamina seguindo por uma pirofosforilação (em fungos e bactérias aeróbicas) (55).

A via de biossíntese dos precursores tiazol e pirimidina são diferentes entre os organismos. A biossíntese do precursor pirimidina se difere entre procariontes e eucariontes (56), enquanto que, a biossíntese do precursor tiazol apresenta via distinta entre bactérias aeróbicas, fungos, bactérias entéricas e plantas (57-59). Alguns organismos podem sintetizar somente um dos precursores: o tiazol ou a pirimidina, obtendo o outro composto do meio extracelular por meio de uma via de salvamento, o composto na forma alcoólica é então fosforilado por uma tiamina pirofosfatoquinase (TPK)(53).

Recentemente, a tiamina tem sido identificada como um dos metabólitos com potencial para regular a sua própria produção, devido ao fato da molécula de tiamina pirofosfato se ligar diretamente em regiões regulatórias acima dos genes ThiC (4-amino-5-hidroximetil-2-metil-pirimidina quinase) e ThiM (4-metil-5 (B-hidroximetil) tiazol quinase) do mRNA policistrônico de *E.coli* (60). Essas estruturas regulatórias do mRNA são chamadas de *riboswitches*, e são capaz de regular várias vias metabólicas, incluindo a de tiamina (61).

1.5.2.1 Biossíntese de tiamina em Procariontes

Até o momento foram identificados doze genes envolvidos na biossíntese de tiamina em procariontes. Seis deles são requeridos para a biossíntese de tiazol (ThiF, S, G e H, IscS e ThiI), e um gene está envolvido na síntese de pirimidina (ThiC). Outro gene, tiamina fosfato sintase (ThiE), é requerido para fazer o acoplamento dos precursores THZ-P e HMP-PP para a formação da tiamina monofosfato. Outros quatro correspondem a quinases: ThiD, ThiM, ThiL e pdxK (HMP quinase, THZ quinase, tiamina fosfato quinase e piridoxina quinase, respectivamente). A fosforilação final para a formação da tiamina pirofosfato é catalizada pela tiamina fosfato quinase (ThiL) em *E. coli* e *S. typhimurium*. A tiamina quinase (ThiK) e hidroxietiltiazol quinase (ThiM) são enzimas da via de salvamento, envolvidas na utilização de tiamina e do tiazol do meio extracelular (53).

Estudos com marcações metabólicas em *E. coli* e *S. typhimurium* demonstraram que o THZ é formado pela cisteína (62, 63), DOXP (64, 65), glicina (57) ou tirosina (66) dependendo do organismo. O enxofre é derivado da cisteína, o carbono 2 (C2) e o nitrogênio 3 (N3) são derivados do carbono α , do grupo amino da tirosina ou glicina e o grupo metil e fosfoetil são derivados do carbono 1 (C1), já os carbonos 4 e 5 (C4/C5) da 1-deoxi-D-xilulose-fosfato, respectivamente.

Duas enzimas distintas, ThiH e ThiO, estão envolvidas na síntese do anel tiazol de *E. coli* e *B. subtilis*, respectivamente. Por similaridade do genoma bacteriano, tem sido mostrado que microrganismos aeróbicos, incluindo alfa e beta proteobactéria, *Pseudomonas sp*, *Bacillus actinomyces*, *L. pneumophila* e *Magnetococcus sp*, possuem a enzima ThiO, uma flavoenzima identificada como glicina oxidase, a qual utiliza a glicina como substrato para a biossíntese do tiazol. Enterobactérias, clostrídios, bactéria do grupo CFB, *Shewanella putrefaciens*, *Campylobacter jejuni*, *Chlorobium tepidum* e *Fusobacterium nucleatum*, que são principalmente microrganismos anaeróbicos, apresentam a enzima ThiH, que utiliza a tirosina como substrato para a biossíntese do tiazol (67).

A biossíntese de pirimidina é complexa e pouco estudada. O 5-aminoimidazol ribonucleotídeo (AIR), um intermediário da via de biossíntese das purinas é o intermediário chave da via de biossíntese de pirimidina. O C5, C7, C8, N1 e N3 da pirimidina são derivados do C'4, C'5, C'2, N1 e N3 de AIR respectivamente (68-70). O mecanismo envolvido na conversão de AIR em pirimidina ainda não é bem elucidado, e sabe-se que ThiC é o único gene identificado para biossíntese de pirimidina em *E. coli*, *B. subtilis* e *S. tiformurium*(71). HMP é fosforilado para HPM-P por uma HPM-P quinase (ThiD), esta é uma quinase bifuncional que fosforila o HPM-P em HMP-PP pela HMP-PP quinase.

1.5.2.2 Biossíntese de tiamina em Eucariontes

Em *S. cerevisiae* somente uma enzima da biossíntese de tiazol foi identificada, a tiazol sintase (Thi4) (72), o outro gene, o Thi5, está relacionado com a biossíntese do precursor pirimidina. A enzima responsável pelo acoplamento do THZ-P com HMP-PP para formar a tiamina monofosfato é uma tiamina fosfato sintase (THI6). A Thip6 é uma proteína bifuncional, pois tem atividade também de hidroxietiltiazol quinase, envolvida na reutilização do tiazol livre (73). Embora, a tiamina monofosfato seja o produto da tiamina fosfato sintase, esta é hidrolizada formando a tiamina livre, a qual é convertida para tiamina pirofosfato, pela enzima tiamina pirifosfosquinase (THI80) que é essencial em *S. cerevisiae* (74).

A biossíntese do anel tiazol de *S. cerevisiae* e *S. pombe*, por marcação metabólica, demonstraram que o enxofre é derivado da cisteína, o C2 e o nitrogênio são derivados do carbono α e o grupo amino da glicina. No entanto, os carbonos 4 e 5, o grupo metil e hidroxietil são propostos, por serem originários do 5-fosfato ou 1,5 bifosfato e derivados de uma D-ribose ou D-xilulose. Até o momento o Thi4 é a única enzima relacionada com a biossíntese do tiazol em eucariontes. Recentemente a estrutura da tiazol sintase de *S.*

cerevisiae foi determinada, revelando a presença de uma forte ligação de adenosina difosfato-5-(B-etil)-4-metiltiazol-2-ácido carboxílico (ADT) no sítio ativo. O isolamento do produto dessa reação identificou a nicotinamida (NAD) como precursor da biossíntese de tiazol, esclarecendo o primeiro passo da biossíntese de tiazol da biossíntese de tiamina em eucariontes (75). Chatterjee *et. al.* (2007) confirmaram que o NAD é o substrato para Thi4 em eucariontes (76).

Recentes estudos demonstraram que a histidina e o piridoxol são precursores da biossíntese de pirimidina de tiamina em *S. cerevisiae* (77). O N1 e C2 são derivados do N e C2 do piridoxol e N3, C4 e o grupo amino, são derivados do N1, C2 e N3 da histidina, respectivamente.

A **Figura 5** esquematiza resumidamente a via de biossíntese de tiamina nos organismos eucariontes e procariontes.

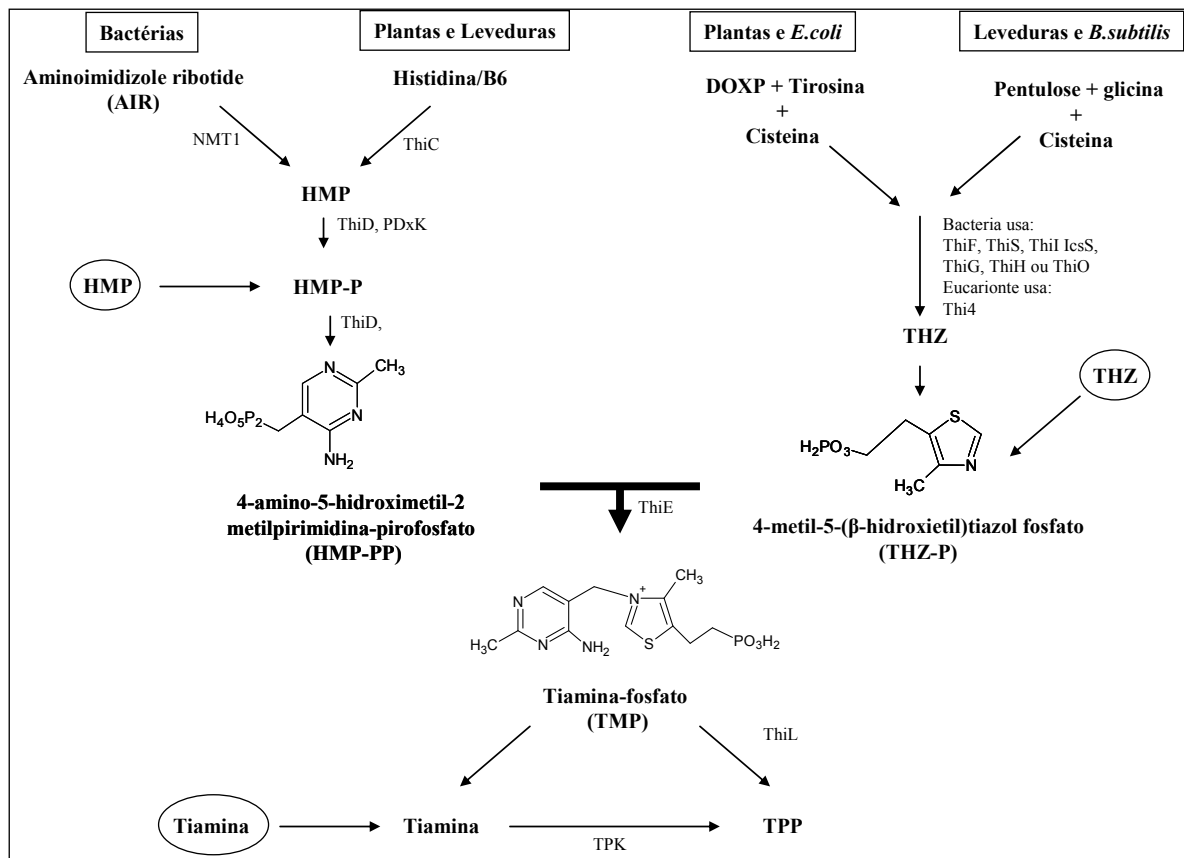


Figura 5. Biossíntese de tiamina (Vitamina B₁), em procariontes e eucariontes.

1.5.3 Inibidor da via de biossíntese de Tiamina

A Bacimetrina é um produto natural isolado de *Bacillus megaterium* e *Streptomyces albus*. Inibe o crescimento de bactérias e fungos (78, 79). É um análogo do precursor

hidroximetilpirimidina (HMP), essa similaridade estrutural possibilita sua competição com o substrato HMP e posteriormente é convertida pelas enzimas ThiD e ThiE em 2-metoxitiamina fosfato, o qual não pode ser utilizado como cofator pelas enzimas que utilizam a tiamina.

1.5.4 Tiamina *versus* malária

Eritrócitos infectados por *P. bergeri* apresentam altos níveis de tiamina comparando aos eritrócitos não-infectados (80). Sabe-se que a deficiência de tiamina retarda a propagação deste parasita *in vivo* (81).

Estudos de tiamina também foram realizados em pacientes com malária, onde se observou a deficiência de tiamina nos pacientes hospitalizados com malária na Tailândia, constatando que essa deficiência, geralmente, complicava a malária aguda por *P. falciparum* (82).

A deficiência de tiamina também foi comum, nos pacientes com infecção não complicada por *P. falciparum* no sul de Laos. Após 42 dias observou-se o aumento da concentração de tiamina como consequência do tratamento da malária com suplementação de vitaminas (83).

Recentemente, Bozdech *et. al.* (84) analisaram o genoma de *P. falciparum*, por abordagens *in silico* e sugeriram a possível existência da via de biossíntese de tiamina em *P. falciparum*.

Em 2006, Wrenger *et al.*, (85) demonstraram que algumas enzimas da via de biossíntese de tiamina: 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina (HMP) /HMP quinase (ThiD) 5-(2-hidroxi-etil)-4-metil-tiazol (THZ)/ THZ quinase (ThiM), 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina (HMP) /HMP-P quinase (ThiD) e tiamina fosfato sintase (ThiE), eram expressas durante os estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Este mesmo estudo demonstrou que *P. falciparum* depende do fornecimento do precursor HPM (hidroximetilpirimidina) ou da tiamina do meio extracelular para sua sobrevivência.

Culturas de *P. falciparum* foram tratadas com bacimetrina não sendo observada a inibição do crescimento parasitário, resultado contrastante aos encontrado em bactérias (85).

Sugere-se que em *P. falciparum*, a tiamina monofosfato é hidrolizada para tiamina por uma fosfatase não específica, e a tiamina é convertida para tiamina pirofosfato pela tiamina difosfoquinase. Para tornar um cofator ativo a tiamina monofosfato precisa ser transformada

em tiamina pirofosfato. Uma fosfatase específica que converte a tiamina monofosfato em tiamina não foi identificada (84).

Estudo recente, demonstrou que *P. falciparum* expressa uma pirofosfoquinase (TPK), uma enzima que pirofosforila a tiamina em cofator ativo, em todo o ciclo intraeritrocitário do parasita (86).

A biossíntese do anel tiazol em *P. falciparum* ainda permanece desconhecida, sendo necessários estudos para a demonstração dos precursores e intermediários da via. A via de biossíntese de tiamina pode servir como potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas, já que está ausente em humanos (Figura 6).

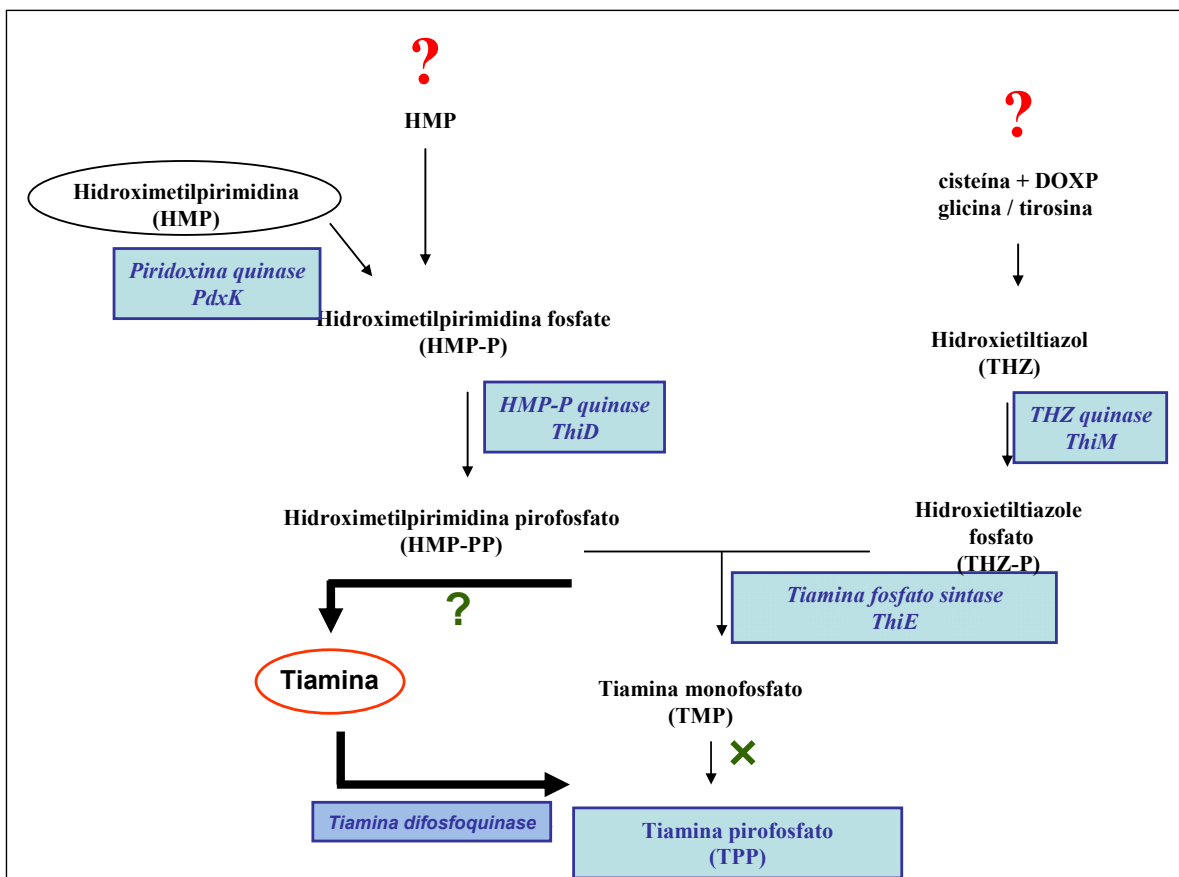


Figura 6. Biossíntese de tiamina em *P. falciparum*. Em azul está demonstrado as enzimas envolvidas na biossíntese de tiamina já encontradas em *P. falciparum*. Os círculos demonstram que o parasita pode obter esse composto do meio extracelular. Os pontos de interrogação são pontos ainda desconhecido da via em *P. falciparum*.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

A malária ainda é uma das principais parasitoses humanas. Apesar dos enormes esforços em pesquisa, a morbidade, mortalidade e as perdas econômicas geradas pela malária são substanciais. Um dos grandes obstáculos no controle da malária refere-se à aquisição de resistência de algumas cepas de *P. falciparum* aos antimaláricos comumente utilizados na terapêutica.

Faz-se necessário o constante estudo na busca de alvos alternativos para o desenvolvimento de antimaláricos suficientemente eficazes que inviabilizem o fenômeno da resistência. Objetiva-se primordialmente descobrir alvos que não são albergados pelo hospedeiro vertebrado, homem.

Nosso grupo, na última década, vem identificando e caracterizando os compostos isoprênicos, os quais são biossintetizados por meio da via MEP em *P. falciparum*. Via bastante promissora no que se refere à formulação racional de novos antimaláricos por ser alternativa na formação dos compostos isoprênicos, não sendo compartilhada com o homem.

Sabe-se que o primeiro intermediário da via MEP, o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP) também é utilizado na síntese *de novo* de piridoxal (vitamina B₆) e tiamina (vitamina B₁); e que a enzima-chave da via MEP (DOXP sintase) é dependente de tiamina pirofosfato.

Em 2001, Jomaa *et al.*(31) identificaram, em *P. falciparum*, os genes que codificam as enzimas DOXP sintetase (DXS) e DOXP redutoisomerase (DXR); em 2001, Rohdich *et al.* (44) descreveram outro gene 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP) metabólito intermediário da via MEP.

Um estudo de nosso grupo (43) caracterizou metabolicamente e por espectrometria de massas os produtos intermediários da via MEP. Esse mesmo estudo demonstrou a biossíntese *de novo* de piridoxina (vitamina B₆) nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*. Acredita-se que a(s) via(s) de biossíntese de vitaminas em *P. falciparum*, podem ser exploradas como potenciais alvos quimioterápicos, devido a ausência em humanos.

O presente trabalho destinou-se a complementar os estudos em andamento em nosso laboratório sobre o metabolismo de isoprenóides nas formas intraeritrocitárias de *P. falciparum*, mais especificamente sobre a biossíntese de tiamina (vitamina B₁). Com a finalidade de caracterizar bioquimicamente a biossíntese de tiamina em *P. falciparum*, foram realizados os objetivos descritos a seguir.

2.2 Objetivos

2.2.1 – Estudar se a via de biossíntese de tiamina encontra-se ativa nos três estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*;

2.2.2 – Estudar quais precursores estão envolvidos na biossíntese de tiamina nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*;

2.2.3 – Estudar o efeito da inibição da via de biossíntese de tiamina utilizando fosmidomicina e 3CIDHP (análogo da bacimetrina) nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Os experimentos foram realizados utilizando o isolado de *P. falciparum* NF54, clone 3D7, foram mantidos em meio RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 21 mM de bicarbonato de sódio, 370 μ M de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 μ g/ml de gentamicina (Sigma) e 0.5% de Albumax I (Gibco-BRL Life Technologies), como descrito por Trager e Jensen (87).

Eritrócitos (A e/ou O⁺) foram adicionados ao meio de cultura para um hematócrito final de 5% (v/v). As culturas foram mantidas em garrafas plásticas (Corning) a 37 °C, com uma mistura gasosa de 5.05% de CO₂, 4.93% de O₂, 90,02 % de N₂ com troca diária de meio.

Em todos os experimentos utilizou-se eritrócitos previamente submetidos a três lavagens com meio RPMI 1640 e incubação com plasmagel (Laboratoire Roger Bellon, Neuilly sur Seine, France) por 40 min (88), essa estratégia objetivou separar as formas maduras do parasita e eliminar os leucócitos. O desenvolvimento e a multiplicação dos parasitas foram monitorados diariamente por observação microscópica em esfregaços corados com Giemsa (Merck).

3.2 Obtenção dos estágios intraeritrocitários

Protocolo I: As formas sincrônicas foram obtidas de cultura com mais de 10% de parasitemia no estágio de anel (1-10 h depois da invasão). Os parasitas foram centrifugados a 2.000 x g, e no precipitado resultante foi adicionado uma solução de D-sorbitol 5% pré aquecida a 37 °C, seguindo a proporção de 200 μ l do precipitado para 5 ml de sorbitol 5%. Os parasitas foram incubados a 37 °C por 5 min e centrifugados a 1800 x g por 10 min. Posteriormente, foram transferidos ao cultivo normal e mantidos até o estágio de trofozoíto (20-24 h depois da re-invasão) ou esquizonte (30-45 h depois da re-invasão).

Protocolo II: culturas assincrônicas de *P. falciparum*, com os diferentes estágios parasitários (anel, trofozoíto e esquizonte), foram purificados por um gradiente descontínuo de Percoll[®] (Pharmacia Chemicals, Uppsala, Sweden) de 40/70/80 % (89). Dois mililitros de cultura foram adicionados em tubo de vidro contendo 2, 4 e 3 ml das soluções de Percoll[®] (Pharmacia Chemicals, Uppsala, Sweden) de 80, 70 e 40%, respectivamente, e centrifugados a 10.000 x g por 30 min a 25 °C. Nessas condições os esquizontes ficam na região 40 %, trofozoíto na interface de 70/80 % e um *precipitado* de anéis e células não-infectadas. Posteriormente, cada estágio foi separado e lavado três vezes com PBS (Na₂HPO₄ 0.007 M,

NaH₂PO₄ 0.01 M, pH 7.4 e NaCl 0.15 M). Os parasitas no estágio de anel, foram liberados das hemácias por uma lise com saponina 0,1% (p/v).

3.3 Lise com saponina

A lise, dos eritrócitos com saponina, foi realizada na fração anel/eritrócitos não-parasitados após a separação dos parasitas pelo gradiente de Percoll[®] e, em todos os experimentos que utilizaram culturas sincrônicas.

As culturas foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 min. O meio de cultura foi removido e o precipitado foi lavado 3 x, com aproximadamente, 40 ml de PBS e centrifugado a 2.000 x g por 10 min. Em um volume de 2 ml de eritrócitos parasitados foi acrescentado 15 ml de PBS, contendo 0,1 % de saponina, incubado 1 min a temperatura ambiente e centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. Após a centrifugação, o precipitado de parasitas foi lavado com PBS, a 10.000 x g por 10 min. Após as lavagens, os parasitas foram guardados em nitrogênio líquidos para posterior extração.

3.4 Marcações metabólicas

Culturas de parasitas sincrônicas de aproximadamente 15% de parasitemia nos estágios de anel (1-10 h após invasão), trofozoíto (16-26 h após invasão) ou esquizonte (32-42 h após invasão) foram marcadas metabolicamente por 16 h com 6.25 µCi/ml de [1-¹⁴C] acetato de sódio (56.0 mCi/mmol, Amersham) ou 1,25 µCi/ml de [U-¹⁴C] glicina (106 mCi/mmol, Amersham) ou 1,25 µCi/ml de [U-¹⁴C] tirosina (434 mCi/mmol, Amersham) ou 1,25 mCi/ml de L-[³⁵S] cisteína (3.125 mCi/mol; Amersham) ou 5 µCi/ml L-[³⁵S] metionina (>1000 mCi/mmol, Amersham) ou 0,5 µCi/ml [U-¹⁴C] nicotinamida (106 mCi/mmol, Amersham).

Para marcação metabólica dos parasitas com [U-¹⁴C] glicina, [U-¹⁴C] tirosina e L-[³⁵S] metionina, o meio de cultura foi substituído 2 h antes da marcação, por meio RPMI1640 deficiente em 1/10 da quantidade original de glicina, tirosina ou metionina, respectivamente.

Na **Tabela I** encontram-se resumidos os precursores metabólicos utilizados. Os precursores metabólicos foram selecionados baseados na disponibilidade comercial ou da sua síntese química.

Tabela 1. Precursores metabólicos utilizados na caracterização da biossíntese de tiamina em *P. falciparum*. Os precursores metabólicos foram descritos como precursores de tiamina, com exceção do acetato de sódio, em outros organismos.

Precursor radioativo	Caminho metabólico
[1- ¹⁴ C] Acetato de sódio	DOXP → Tiazol → Tiamina
L-[³⁵ S] Cisteína	Tiazol → Tiamina
[U- ¹⁴ C] Tirosina	Tiazol → Tiamina
[U- ¹⁴ C] Glicina	Tiazol → Tiamina
[U- ¹⁴ C] Nicotinamida	Tiazol → Tiamina
L-[³⁵ S] Metionina	Tiazol → Tiamina

3.5 Determinação da IC₅₀ do 3,3,3-tricloro-4,5,dihidro-pirimidona (3CIDHP) (análogo da bacimetrina)

Devido à indisponibilidade comercial da bacimetrina, foi testado um análogo estrutural, o 3,3,3-tricloro-4,5,dihidro-pirimidona (3CIDHP) sintetizado pelo grupo do Dr. Ernani Pinto (Faculdade de Farmácia da USP). O 3CIDHP foi diluído e utilizado nas concentrações de 100, 75, 50, 25 e 12,5 µM para determinar a IC₅₀. Os testes de inibição foram conduzidos em microplacas, como descrito por Desjardins *et al.* (90) para determinar a concentração inibitória de 50% (IC₅₀S). Brevemente, o estágio de anel (200 µl por cavidade, com hematócrito de 5% e parasitemia de 0.5%) foi exposto a concentrações crescentes de droga. Todos os testes foram realizados em triplicatas. A parasitemia e a morfologia dos parasitas foram analisadas em esfregaços corados com Giemsa visualizados por microscopia óptica. O valor da IC₅₀ foi calculado utilizando o programa *Probit Analysis (Minitab Statistical Software 13.30 TM, Minitab Inc.)*.

3.6 Marcações metabólicas e tratamento com fosmidomicina e 3CIDHP

Culturas assíncronas com pelo menos 10% de parasitemia foram tratados por 48 horas utilizando 1µM de fosmidomicina ou 50 µM de 3CIDHP. Os parasitas foram marcados com [1-¹⁴C] acetato de sódio (6,25 µCi/ml) ou [U-³⁵S] cisteína (1,25 µCi/ml) nas últimas 18 horas de incubação. Culturas controles não tratadas com a droga foram marcadas com o precursor radioativo nas mesmas condições.

3.7 Teste de inibição da síntese protéica

Culturas sincrônicas de *Plasmodium falciparum* no estágio anel, tratadas ou não tratadas com fosmidomicina por 48 h, foram marcadas com L-[³⁵S]metionina em meio RPMI 1640 deficiente de metionina, no início do tratamento ou após 24 h. Alíquotas foram coletadas em diferentes tempos (0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas), e as proteínas foram precipitadas pela adição de 1 volume de 25% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) em água.

As alíquotas foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,45 µm de poro (2,5 cm de diâmetro, Sigma-Aldrich) e lavadas com 2 ml de solução 12,5% (p/v) de ácido tricloroacético em água. Os filtros foram secos a 50°C, colocados em tubos plásticos de contagem em cintilador, adicionado 2,5 ml de líquido de cintilação e submetidos a quantificação de radioatividade (cpm) no cintilador Beckman 5000β-radiation scintillation counter.

3.8 Extração de tiamina

3.8.1 Protocolo I

As amostras de cada um dos estágios do parasita marcados metabolicamente (anel, trofozoíto e esquizonte) com os diferentes precursores, foram previamente liofilizadas e posteriormente extraídas com 1 ml de hexano, sonicadas por 15 minutos, centrifugadas por 2.000 x g durante 15 min, desprezando-se o sobrenadante. O *precipitado* obtido foi extraído em etanol-água (3:7, v/v) durante uma hora e meia a 57 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1.500 x g durante 10 min e os extratos recuperados foram secos em *speed vauun* para sua posterior análise por *RP-HPLC* (91).

3.8.2 Protocolo II

Aproximadamente 300 µl de parasitas ($1,5 \times 10^{11}$ parasitas) foram ressuspensos em 4 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M incubados por 30 min a 4°C e homogeneizados por agitação intermitente. O pH foi ajustado entre 4,6 a 4,8 com 1 M NaOH. Posteriormente, o material foi centrifugado a 30.000 x g por 20 min e o sobrenadante foi coletado e liofilizado para posterior análise (92).

3.8.3 Protocolo III

Aproximadamente 300 µl de parasitas ($1,5 \times 10^{11}$ parasitas) foram ressuspensos (v/v)

com PBS. Para cada 2ml da suspensão, foram adicionados 250 µl de ácido tricloroacético (TCA) 40%. Posteriormente a suspensão foi incubada por 1 h a temperatura ambiente na ausência de luz para completar a precipitação das proteínas. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1900 x g por 20 min e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. O TCA foi removido com 5 volumes de dietil-éter saturado, centrifugado a 2000 x g por 5 min, recuperando o extrato (93).

3.9 Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)

Para a realização das análises por *RP-HPLC*, foi utilizado o aparelho *Gilson HPLC 322 pump* conectado ao detector *Gilson 152 variable UV/visible*. As frações foram coletadas no coletor de frações *Gilson fraction collector FC203B*. O programa *UNIPOINT™ System Software* foi utilizado para registros dos cromatogramas. Os extratos de parasitas e eritrócitos não-infectados marcados metabolicamente com diferentes precursores [Tabela 1] após as diferentes extrações, foram ressuspensos em 250 µl do solvente de corrida do *RP-HPLC*, filtradas em filtros de nylon de 0,45µm e então analisadas.

Para a caracterização metabólica da tiamina e seus derivados fosforilados, em cada um dos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*, foram ensaiados três protocolos diferentes:

3.9.1 Protocolo I

Os extratos foram analisados utilizando uma *Phenomenex Luna C18 column* (250 mm x 4.6 mm x 5µm). A eluição foi realizada em condições isocráticas, utilizando uma solução de 25% metanol com 75% de uma solução 5 mM de hexasulfonato de sódio contendo 1% (v/v) de ácido acético. O fluxo foi de 0,5 ml/min. Foram utilizados como padrões: tiamina (T), tiamina monofosfato (TP) e tiamina pirofosfato (TPP). Que foram monitorados em um comprimento de onda de 230 nm.

As frações purificadas foram secas em *speed vacuum* e ressuspensas em 500µl de líquido de cintilação *Betaple scint* (PerkinElmer). A incorporação da radioatividade foi quantificada em cintilador *Beckman 5000 β-counter* (94).

3.9.2 Protocolo II

Os extratos foram analisados utilizando *Phenomenex Luna C18 column* (250 mm x 4.6 mm x 5µm). Foi realizado um sistema de gradiente utilizando os solventes: metanol/água

(1:9, v/v) contendo 1% (v/v) de ácido acético incluindo 5 mM de uma solução de hexasulfonato de sódio (solvente A) e metanol/água (5:5, v/v) contendo 1% (v/v) de ácido acético incluindo 5 mM de uma solução de hexasulfonato de sódio (solvente B). O sistema iniciou com 100% do solvente A, passando para 100% do solvente B em 30 min, permanecendo nessa condição por 5 minutos. Dos 35 aos 40 minutos o sistema retornou às condições iniciais, e equilibrando até os 55 minutos. O fluxo foi de 0.5 ml/ min e também se utilizou os padrões previamente citados, monitorados em um comprimento de onda de 230 nm.

3.9.3 Protocolo III

Os extratos foram analisados em uma coluna Supercosil NH₂ (4.6 mm x 25 cm, 5 µm). O gradiente de eluição utilizado foi, acetonitrila (CH₃CN)/ tampão fosfato (83 mM, pH 7.5) (10:90; v/v) (solvente A) e acetonitrila/tampão fosfato (83 mM, pH 7.5) (40:60; v/v) (solvente B). O sistema iniciou com 100% do solvente A, passando para 100% do solvente B em 7 min, permanecendo nessa condição até 20 minutos. Em seguida, o sistema retornou às condições iniciais, e equilibrando até os 32 minutos. O fluxo foi de 1.2 ml/ min (95). Foram utilizados os padrões citados anteriormente e monitorados em um comprimento de onda de 250 nm.

3.10 Cromatografia em Camada Delgada (*Thin Layer Chromatography - TLC*)

Os extratos de parasitas e eritrócitos não-infectados, marcados com os diferentes precursores descritos na **Tabela 1**, foram analisados por *TLC* em placas *RP-TLC* (Cromatofolha-alumínio – RP-18F_{254S}; MERCK) e Partisil K6 (Sílica Gel 60Å, placa de vidro; Whatman) sendo a fase móvel ácido isobutírico; hidróxido de amônio concentrado; 0,1 M fosfato de sódio monobásico em água deionizada (66:1:13:20 v/v/v/v) (96). Os padrões de tiamina, tiamina monofosfato e tiamina pirofosfato foram corados por vapor de iodo. As placas, depois de secas, tiveram a adição de *EN3HANCE spray* (PerkinElmer) e foram expostas a filmes *XOmat AR* (Amersham) em cassetes com tela intensificadora por sete a 30 dias a -70°C.

3.11 Teste do Tiocromo

O teste do tiocromo foi realizado em placas de 96 poços. As frações purificadas por *RP-HPLC (Protocolo I)*, foram secas e posteriormente dissolvidas em 60 µl de água deionizada, acrescentando-se 30 µl de 1 M NaOH; 55 µl de MeOH e 5 µl de 30 mM

$K_3Fe(CN)_6$. Esse protocolo foi utilizado para promover a oxidação da tiamina ao tiocromo. As amostras foram agitadas e submetidas à análise fluorimétrica a 375 nm para a excitação e 450 nm para emissão (97).

4 RESULTADOS

4.1 Tentativa da utilização do teste do tiocromo para detecção de tiamina nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*

Para a detecção de tiamina nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*, inicialmente foi utilizada a realização do teste do tiocromo, a qual utiliza ferrocianeto e posterior análise por *RP-HPLC*. Essa metodologia foi inicialmente escolhida, pois é específica para detecção e quantificação de tiamina (97); entretanto, só havia sido realizada a análise fluorimétrica em amostras purificadas por *RP-HPLC*. Realizaram-se vários experimentos com o objetivo de padronizar o teste do tiocromo em placas de 96 poços para *P. falciparum*.

Os padrões de tiamina pirofosfato, tiamina monofosfato e tiamina livre foram purificados por *RP-HPLC* com a utilização do **Protocolo I** e, posteriormente realizou-se o teste do tiocromo em placas, e análise em fluorímetro. Essa metodologia objetivou confirmar se a fração purificada por *RP-HPLC* seria realmente o padrão de tiamina.

O par iônico não interferiu nos resultados, tratando-se de um teste bastante específico; pois a reação só ocorre na presença de tiamina. Todos os testes foram realizados em triplicatas, as médias e os desvios-padrão foram calculados.

Realizaram-se vários testes para a padronização, porém as curvas não foram reproduzíveis, talvez pela baixa sensibilidade do método, inviabilizando sua utilização, mesmo sendo uma metodologia com especificidade. Inferimos que, a concentração de tiamina biossintetizada pelo *P. falciparum* estaria em níveis basais, ainda assim, sabe-se que eritrócitos não-infectados e o próprio meio de cultura, apresentam tiamina fosforilada e livre, impossibilitando, portanto, a utilização dessa metodologia por não ser possível distinguir entre a tiamina biossintetizada pelo parasita daquela presente no meio e/ou nos eritrócitos não-infectados. A **Figura 7** demonstra os resultados descritos.

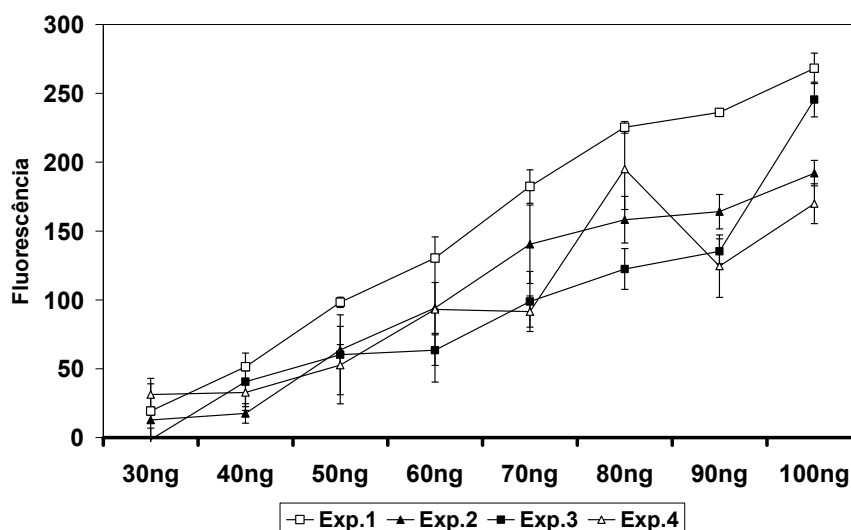


Figura 7. Teste do tiocromo, diferentes retas encontradas em diferentes experimentos.

4.2 Caracterização bioquímica da biossíntese de tiamina nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum* utilizando [1-¹⁴C] acetato de sódio como precursor metabólico.

Para a caracterização da biossíntese da tiamina nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*, escolheu-se, inicialmente, como precursor radioativo o [1-¹⁴C] acetato de sódio devido aos resultados de incorporação desse precursor nos intermediários da via MEP, demonstrado anteriormente por nosso grupo.

No sistema de *RP-HPLC* (**Protocolo I**), os tempos de retenção para os padrões de tiamina pirofosfato, tiamina monofosfato e tiamina livre, foram de: 6, 11 e 39 minutos, respectivamente (**Figura 8**).

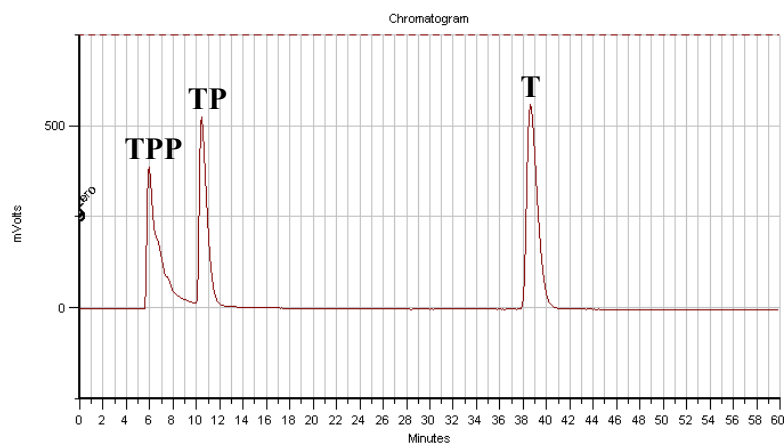


Figura 8. Perfil cromatográfico dos padrões purificados por *RP-HPLC* em sistema isocrático (**Protocolo I**, **item 2.4.1**). TPP com tempo de retenção de 6-7 min; TP com tempo de retenção de 11 min; T com tempo de retenção de aproximadamente 39 min TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

Culturas de *P. falciparum* foram marcadas metabolicamente com o precursor radioativo [$1-^{14}\text{C}$] acetato de sódio e cada estágio parasitário: anel, trofozoíto e esquizonte; foram separados por gradiente descontínuo de Percoll e, o estágio de esquizonte também foi obtido a partir de culturas sincrônicas. Os extratos de parasitas, obtidos como indicados nos **Protocolos I, II** ou **III**, foram analisados por *RP-HPLC* e, como controle eritrócitos não-infectados foram marcados e analisados nas mesmas condições.

Analisando o perfil de radioatividade dos parasitas nos estágios de anel, trofozoíto e esquizontes, extraídos com etanol/ H_2O (**Protocolo I**, de extração), detectou-se, no estágio de esquizonte, um pico com tempo de retenção entre 5 e 8 minutos e outro entre 9 e 12 minutos, coincidindo com os tempos de retenção dos padrões de tiamina pirofosfato e monofosfato, respectivamente. Nos estágios de trofozoíto, anel e eritrócitos não-infectados, observou-se um pico com tempo de retenção entre 7 e 10 minutos, porém não coincidindo com os tempos de retenção dos padrões. Não foi observada nas amostras de parasitas nenhum pico coincidente com o tempo de retenção da tiamina livre. Como a tiamina pirofosfato e a tiamina monofosfato apresentam tempos de retenção muito próximos, não foi possível diferenciá-las, já o tempo de retenção da tiamina pirofosfato foi de um minuto após o pico de injeção. O perfil cromatográfico obtido nestas condições foi inconclusivo (**Figura 9**). Neste mesmo cromatograma foi detectado um pico, com tempo de retenção de 17 minutos, que coincide com o padrão de piridoxol (vitamina B_6).

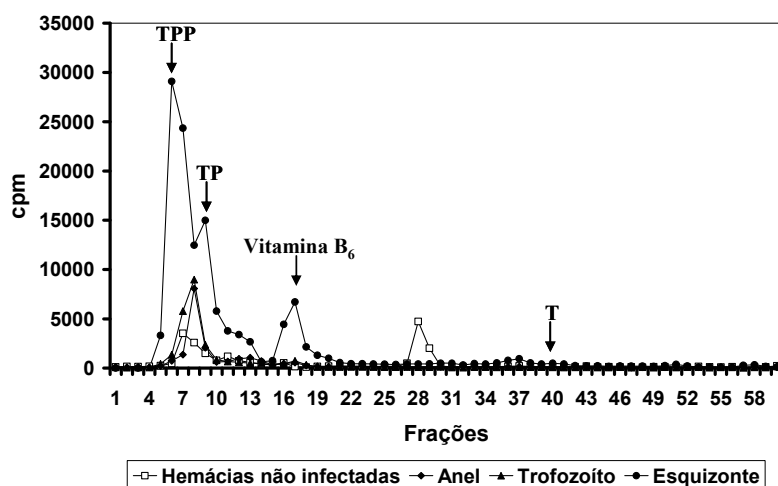


Figura 9. Perfil cromatográfico da purificação por *RP-HPLC* (**Protocolo I**) das frações extraídas com Etanol/ H_2O dos estágios anel, trofozoíto e esquizonte marcados com [$1-^{14}\text{C}$] acetato de sódio. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

Os padrões de tiamina monofosfato e tiamina pirofosfato foram desfosforilados com fosfatase ácida, objetivando a obtenção apenas da tiamina livre, uma vez que foi a única forma cujo tempo de retenção não coincidiu com as outras formas; porém a desfosforilação

foi insatisfatória para a obtenção da tiamina na forma livre.

Devido aos problemas relatados, tentou-se analisar cada uma das frações, previamente purificadas no sistema de *RP-HPLC* (**Protocolo I**), em um novo sistema cromatográfico. O principal problema do método é que o par iônico utilizado na fase móvel do sistema de *RP-HPLC* interfere nas análises de espectrometria de massas e *TLC*, o qual para ser eliminado das amostras, precisaria de purificações por coluna de troca iônica aumentando os passos da análise, resultando em perda de material.

Foi utilizada uma coluna *Phenomenex strata NH2* para separar o par iônico hexasulfonato de sódio das formas de tiamina monofosfato e tiamina pirofosfato, porém, como esperado, a quantidade de amostras foi insuficiente.

Tentou-se também utilizar outro par iônico, o N,N-Dimetilhexilamina, o qual é volátil, e possivelmente não interferiria nas análises posteriores de *RP-HPLC*, *TLC* e espectrometria de massas. A utilização do N,N-Dimetilhexilamina na fase móvel do sistema de *RP-HPLC* (**Protocolo I**) não permitiu separar a tiamina nas suas três formas.

Uma nova metodologia de *HPLC* foi testada (**Protocolo III**), na qual observou-se que os padrões de tiamina pirofosfato, monofosfato e tiamina livre saem no mesmo tempo de retenção, não separando as três formas da vitamina B₁. Observou-se um pico com tempo de retenção de 11 e outro de 24 minutos, o qual não foi identificado (**Figura 10**). Essa metodologia não pôde ser utilizada pelos problemas discorridos.

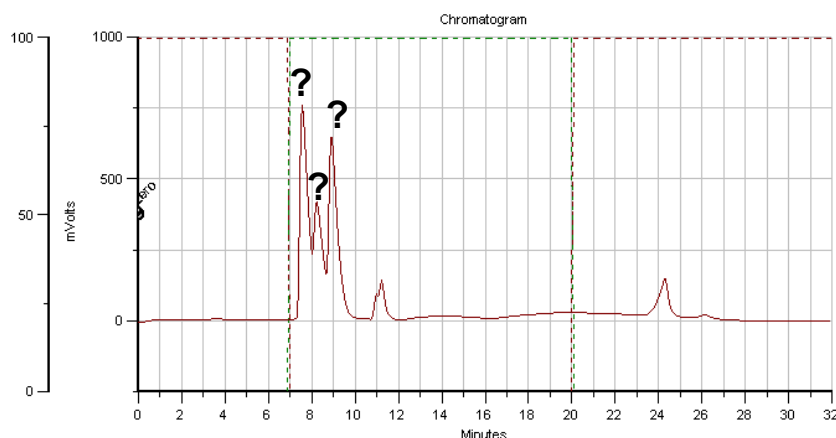


Figura 10. Perfil cromatográfico dos padrões purificados por *RP-HPLC* em sistema gradiente (**Protocolo III**, item 2.4.3). ? : padrões de tiamina pirofosfato, monofosfato e livre.

Como os resultados obtidos com os **Protocolos I** e **III** de *RP-HPLC* não foram satisfatórios, padronizou-se outra abordagem de identificação de tiamina e seus derivados por *RP-HPLC*. O sistema de análise de *RP-HPLC* isocrático foi alterado para um sistema de

gradiente (**Protocolo II**), o qual previa separar a tiamina pirofosfato. Nesse novo sistema a forma monofosfato de tiamina deslocou o tempo de retenção de 10 para 21 minutos, enquanto a tiamina pirofosfato continuou eluindo no mesmo tempo de retenção, isto é, próxima ao pico de injeção; já a tiamina livre continuou sendo retida no final da corrida (39 minutos) (**Figura 11**).

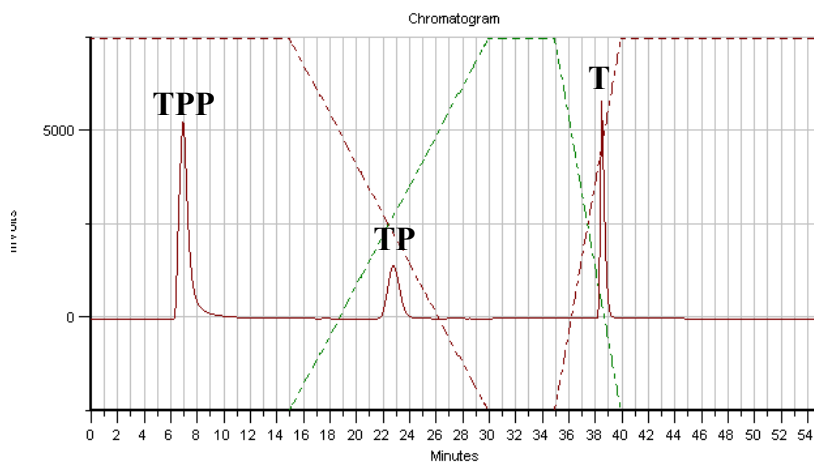


Figura 11. Perfil cromatográfico dos padrões purificados por *RP-HPLC* em sistema gradiente (**Protocolo II**, **item 2.4.2**). TPP com tempo de retenção de 7 min; TP com tempo de retenção de 21 min; T com tempo de retenção de 39 min TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre

Culturas sincrônicas de *P. falciparum* foram marcadas metabolicamente com [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetato de sódio e o estágio de esquizonte foi extraído com ácido clorídrico (0,1 M HCl) (**Protocolo II**, de extração). A purificação revelou um pico com tempo de retenção de 8 a 11 minutos que pode ser referente ao padrão de tiamina pirofosfato e um menor pico com tempo de retenção de 39 minutos, correspondente ao padrão de tiamina livre. O pico radioativo correspondente ao padrão de tiamina monofosfato com tempo de retenção de 21 minutos não foi observado. Eritrócitos não-infectados foram analisados nas mesmas condições que os parasitas, mas não apresentaram radioatividade. A **Figura 12** demonstra o perfil cromatográfico obtido da purificação por *RP-HPLC*.

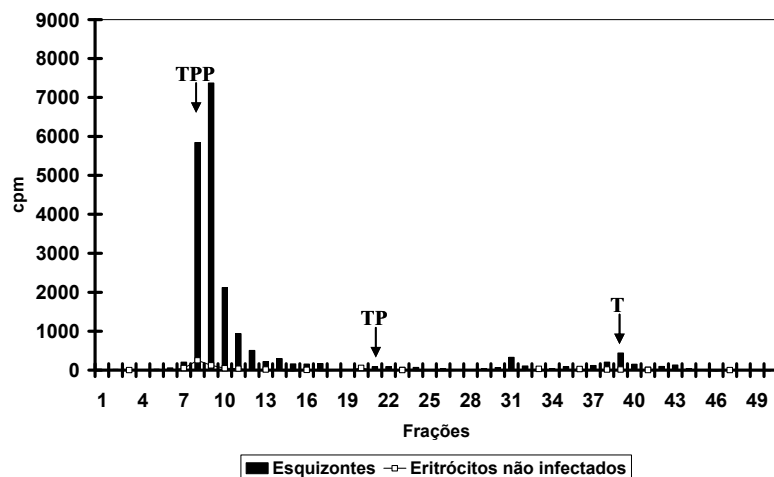


Figura 12. Perfil cromatográfico obtido da purificação por RP-HPLC de culturas marcadas metabolicamente com $[1-^{14}\text{C}]$ acetato de sódio e extraídas com HCl 0,1 M. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre

Culturas assincrônicas foram marcadas com $[1-^{14}\text{C}]$ acetato de sódio, e os parasitas no estágio de anel, trofozoíto e esquizonte foram recuperados e extraídos com ácido clorídrico (0,1 M HCl) (**Protocolo II**, de extração) e aplicados em placa de RP-TLC (Cromatofolha-alumínio – RP-18F_{254S}; MERCK). Nos estágios de trofozoíto e esquizonte, notou-se uma banda com o mesmo R_f dos padrões de tiamina monofosfato e pirofosfato (0,26 e 0,10 respectivamente), entretanto, esses resultados não foram confirmados por outra metodologia (**Figura 13**).

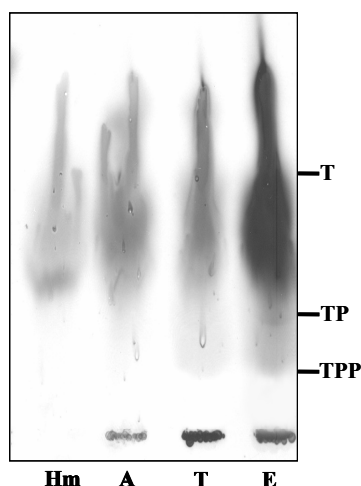


Figura 13. Cromatografia em camada delgada (TLC) de esquizontes metabolicamente marcados $[1-^{14}\text{C}]$ acetato de sódio, extraídos com HCl 0,1M Hm: eritrócitos não-infectados; A: anel; T: trofozoíto e E: esquizontes.

Culturas sincrônicas, iniciando com os diferentes estágios de *P. falciparum*, foram marcadas metabolicamente com diferentes precursores radioativos e, o estágio escolhido foi recuperado, extraído com TCA 40%, analisado por RP-HPLC e TLC. A **Figura 14** mostra os

picos com tempos de retenção correspondentes aos padrões de tiamina pirofosfato e monofosfato nos estágios de anel, trofozoíto e esquizontes marcados metabolicamente com 1- ^{14}C acetato de sódio. Nos três estágios do parasita observou-se um pico distorcido entre 38 a 45 minutos, aproximadamente, o qual corresponde ao padrão de tiamina livre, dificultando a análise. Apenas no estágio de esquizonte observou-se um pico em 39 minutos correspondente a tiamina livre. As amostras de eritrócitos não-infectados não apresentaram nenhum pico radioativo.

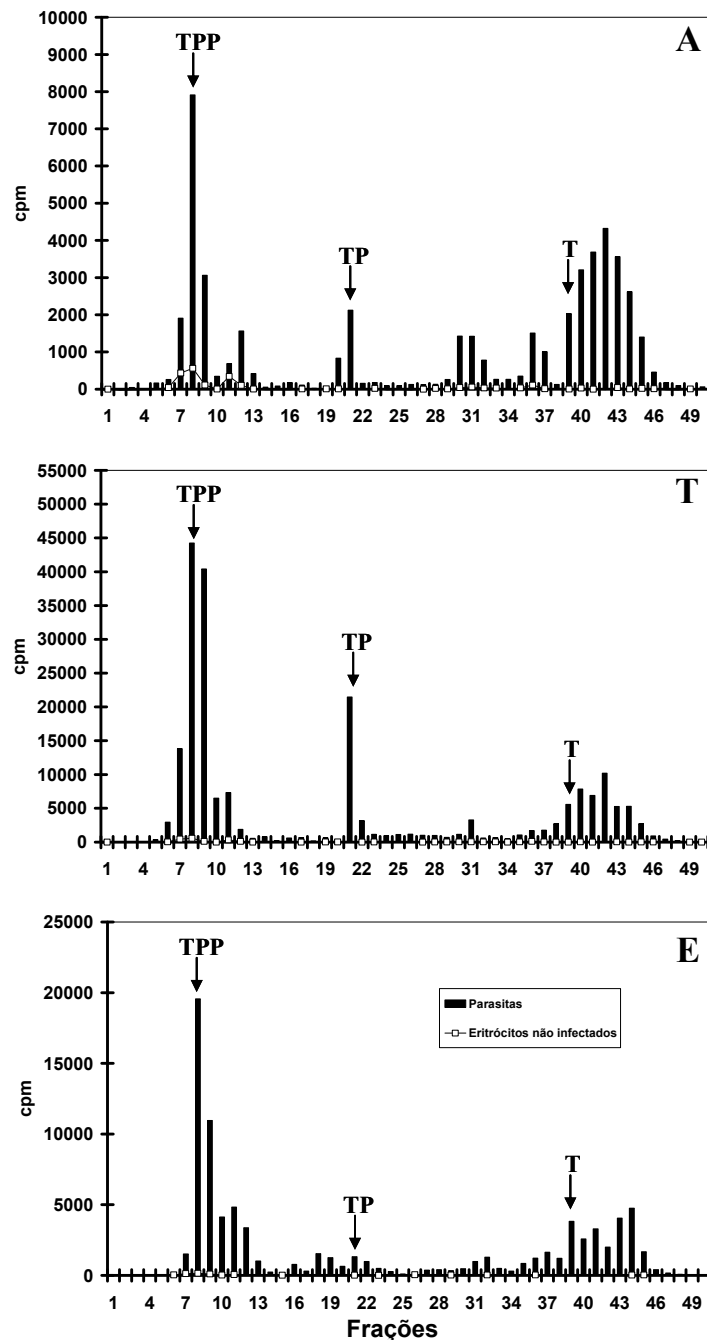


Figura 14. Perfil cromatográfico obtido da purificação por *RP-HPLC* (**Protocolo II**) das frações extraídas com TCA 40% de culturas marcadas metabolicamente com $[1-^{14}\text{C}]$ acetato de sódio. A:anel; T: trofozoíto; E: esquizonte. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre

Como controle, o precursor radioativo foi resolvido por *RP-HPLC* nas mesmas condições das amostras (**Protocolo II**). Observou-se um pequeno pico com tempo de retenção entre 7 e 8 minutos, mas uma grande quantidade de material radioativo foi eluído no tempo entre 10 e 12 minutos. (**Figura 15**).

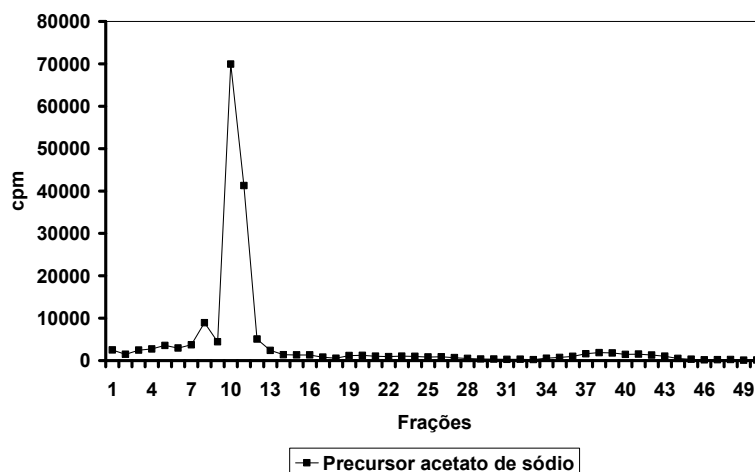


Figura 15. Perfil radiativo obtido da purificação do precursor $[1-^{14}\text{C}]$ acetato de sódio.

Na *TLC*, duas bandas que coincidem com os R_f s referentes aos padrões de tiamina monofosfato e tiamina livre 0,25 e 0,56, respectivamente foram detectadas em esquizontes marcados metabolicamente com $[1-^{14}\text{C}]$ acetato de sódio e extraídos com TCA 40%, utilizando a placa Partisil K6 para compostos fosforilados. Nenhuma banda foi detectada em eritrócitos não-infectados (**Figura 16**). Para confirmar esses resultados, as bandas foram raspadas, re-extraídas e recromatografadas por *RP-HPLC* (**Protocolo II**). A banda correspondente a tiamina monofosfato apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão, enquanto que a banda correspondente a tiamina livre apresentou um pico largo e indefinido entre 38 a 44 minutos. A região correspondente ao padrão de tiamina pirofosfato também foi raspada, mas não apresentou radioatividade suficiente para ser analisada por *RP-HPLC*. Como controle, o precursor radioativo foi corrido por *TLC*, nas mesmas condições que os parasitas e, não foi observado nenhuma banda. Os resultados obtidos confirmam a presença de tiamina na forma monofosfato, sugerindo a presença da forma livre de tiamina no estágio de esquizonte.

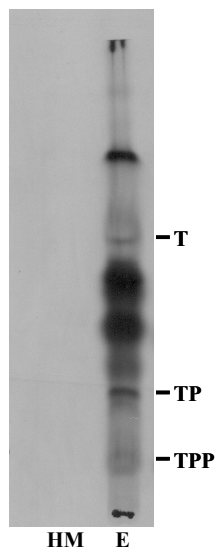


Figura 16. Cromatografia em camada delgada (TLC) de esquizontes marcados metabolicamente com [1-¹⁴C]acetato de sódio, extraídos com TCA 40%. Hm: eritrócitos não-infectados; E: esquizontes.

4.3 Marcação metabólica com L-[³⁵S] cisteína e L-[³⁵S] metionina

Para determinar a origem da molécula de enxofre presente no precursor tiazol, o qual dá origem a molécula da tiamina, utilizamos L-[³⁵S] cisteína e L-[³⁵S] metionina como precursores metabólicos.

Na primeira tentativa, culturas assincrônicas de *P. falciparum* foram marcadas metabolicamente com L-[³⁵S] cisteína e cada estágio parasitário: anel, trofozoíto e esquizonte foram separados por gradiente descontínuo de Percoll, extraídos com etanol/H₂O (**Protocolo I** de extração) e purificados por *RT-HPLC* (**Protocolo I**). Os resultados encontrados foram similares aos de parasitas marcados com [1-¹⁴C] acetato de sódio, isto é, não foi possível distinguir a tiamina pirofosfato da tiamina monofosfato, e um pico correspondente ao padrão de tiamina livre não foi observado (**Figura 17**).

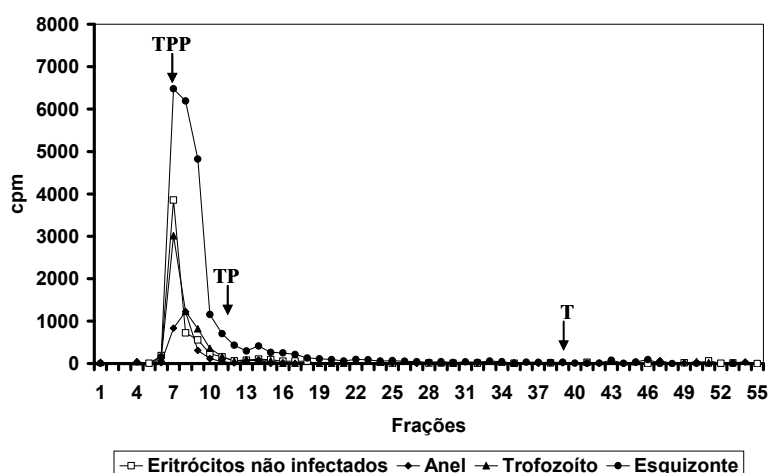


Figura 17. Perfil cromatográfico da purificação por *RP-HPLC* (**Protocolo I**) das frações extraídas com etanol/H₂O de anel, trofozoito e esquizonte marcados com L-[³⁵S]cisteína. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre

Utilizamos outro sistema de *RP-HPLC* (**Protocolo II**) padronizado anteriormente. Parasitas no estágio de esquizonte marcados com L-[³⁵S] cisteína foram extraídos com TCA 40% e analisados por *RP-HPLC*. Na **Figura 18**, observam-se picos com tempos de retenção coincidentes aos padrões de tiamina pirofosfato e tiamina monofosfato (7 a 8 e 19 a 21 minutos, respectivamente). Eritrócitos não-infectados, marcados metabolicamente nas mesmas condições que os parasitas, apresentaram um pico radioativo entre 6 e 7 minutos e um outro aos 22 minutos. Observou-se que nas formas de tiamina pirofosfato e tiamina monofosfato, os picos das amostras de eritrócitos não infectados estavam deslocados em relação ao pico da amostra de parasita. Não foi observado pico no tempo de retenção coincidente com o padrão da tiamina livre.

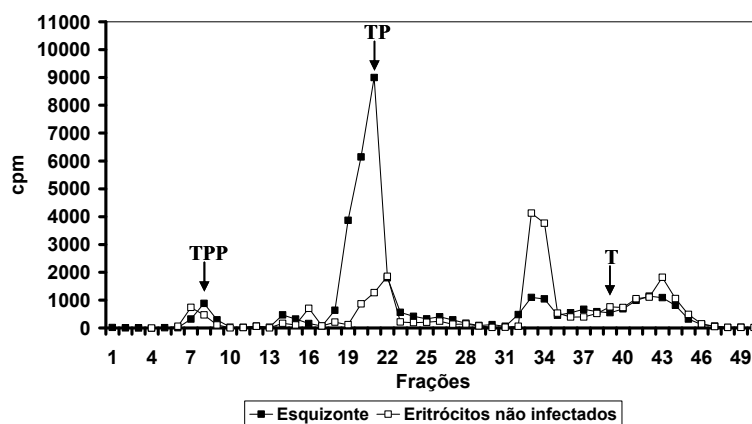


Figura 18. Perfil cromatográfico da purificação por *RP-HPLC* das frações extraídas com TCA 40% de esquizonte marcados com L-[³⁵S] cisteína. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

Uma alíquota do precursor radioativo L-[³⁵S] cisteína foi purificada por *RP-HPLC* nas mesmas condições que as amostras, para verificar uma possível interferência. Na **Figura 19** verifica-se um pico com tempo de retenção entre 9 e 12 minutos, um pico menor em 16 minutos e uma pequena parte do material radioativo sendo eluído por toda a corrida cromatográfica.

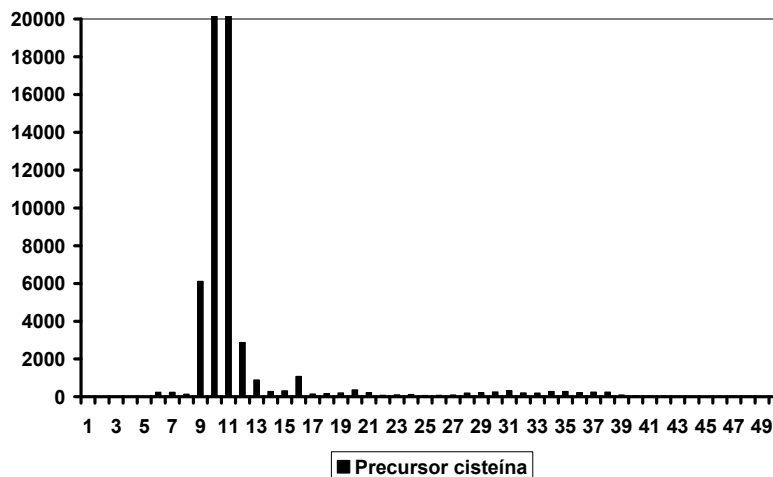


Figura 19. Perfil radiativo da purificação do precursor L-[³⁵S] cisteína.

Com o intuito de verificar a reprodutibilidade da metodologia, foram realizados quatro experimentos de marcação metabólica com L-[³⁵S] cisteína, utilizando parasitas no estágio de esquizonte. A extração das amostras foi realizada com TCA 40% e análise por *RP-HPLC* (**Protocolo II**). Na **Figura 20** observa-se o perfil cromatográfico destes quatro experimentos. Em dois experimentos, encontraram-se picos coincidentes com o padrão de tiamina pirofosfato. Em um dos experimentos observou-se um pico com tempo de retenção de 9 minutos, que pode ser o precursor radioativo não incorporado pelo parasita, visto anteriormente que resolvia nesse tempo de retenção. Não foi observado nenhum pico radioativo em amostras de eritrócitos não-infectados.

Em relação a tiamina monofosfato, os picos encontrados (em dois experimentos) apresentaram deslocamento de um minuto quando comparados ao padrão e, apenas um experimento coincidiu exatamente como o padrão de tiamina monofosfato. Em dois experimentos, detectou-se um pico com tempo de retenção de 16 minutos, que pode ser referente ao precursor não incorporado. Não foi possível a detecção da tiamina livre em nenhum dos experimentos.

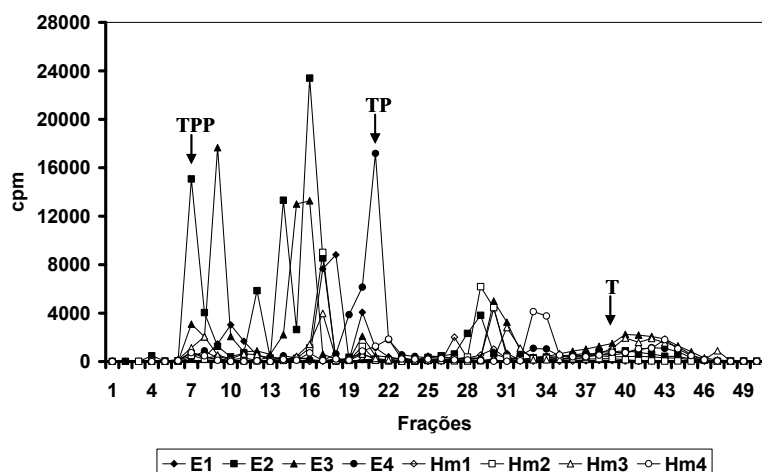


Figura 20. Perfil cromatográfico obtido de diferentes experimentos de purificação por *RP-HPLC* das frações extraídas com TCA 40% de culturas marcadas metabolicamente com L-[³⁵S] cisteína. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

A **Figura 21** demonstra o perfil cromatográfico de esquizontes marcados com [³⁵S] cisteína, extraídos com HCl 0,1M e purificados por *RP-HPLC* (**Protocolo II**). Observa-se pico no tempo de retenção coincidente com o padrão de tiamina pirofosfato; outro pico foi observado em 20 minutos, com um deslocamento de um minuto do padrão de tiamina monofosfato; entretanto, o pico correspondente à tiamina livre além de coincidir com o pico de eritrócito não-infectado (controle), não apresentou um pico característico. Os picos referentes aos tempos de 10 e 16 minutos podem ser referentes ao precursor não incorporado.

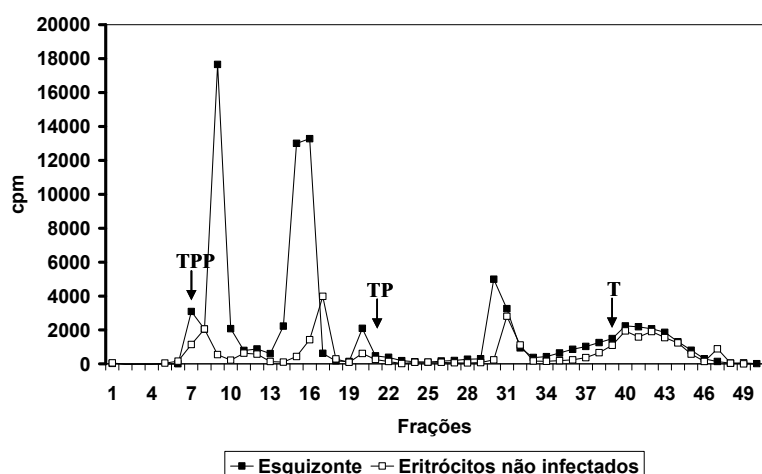


Figura 21. Perfil cromatográfico da purificação por *RP-HPLC* das frações extraídas com HCl 0,1 M de culturas marcadas metabolicamente com L-[³⁵S] cisteína. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

Os esquizontes marcados com L-[³⁵S] cisteína e extraídos com TCA 40%, também foram analisados por *TLC*, utilizando uma placa Pertisil K6 (para compostos fosforilados). Detectou-se uma banda com um R_f de 0,10 que coincide com o R_f do padrão de tiamina

pirofosfato, nos eritrócitos não-infectados e nas duas concentrações de extratos de esquizontes.

Uma banda com R_f de 0,26, acima do padrão de tiamina pirofosfato, foi encontrada nos parasitas (**Figura 22**). A região da placa correspondente a essa banda foi raspada, re-extraída e recromatografada no sistema de *RP-HPLC* (**Protocolo II**). A mesma região em eritrócitos não-infectados também foi raspada e re-extraída, mas não apresentou radioatividade para ser recromatografada no sistema de *RP-HPLC*. Essa banda quando injetada no *RP-HPLC* mostrou um pico com tempo de retenção correspondente ao padrão de tiamina pirofosfato. Entretanto, com esses resultados não podemos concluir se é um produto da incorporação do precursor ou se é apenas o precursor radiativo não incorporado, pois a cisteína apresenta o mesmo R_f nestas condições de corrida. Portanto, a banda presente na amostra de parasitas pode ser apenas o precursor radioativo não incorporado.

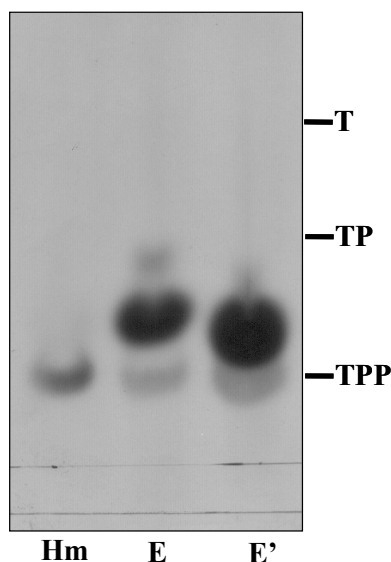


Figura 22. Cromatografia em camada delgada (*TLC*) de esquizontes marcados metabolicamente com L- $[^{35}\text{S}]$ cisteína, extraídos com TCA 40%. Hm: eritrócitos não-infectados; E: esquizontes 20 μl e E': esquizontes 30 μl .

Outros experimentos de cromatografia por *TLC* de parasitas marcados com L- $[^{35}\text{S}]$ cisteína foram realizados para confirmar os resultados anteriores. Observou-se uma banda com R_f de 0,13 referente ao padrão de tiamina pirofosfato em parasitas e em eritrócitos não-infectados. Essa banda não coincide com o R_f do precursor radiativo, a banda correspondente ao precursor radioativo não foi observada (**Figura 23**). Essas bandas foram raspadas, reextraídas e recromatografadas por *RP-HPLC*. Observou-se que, tanto os parasitas quanto os eritrócitos não-infectados, apresentaram picos correspondentes ao padrão de tiamina pirofosfato.

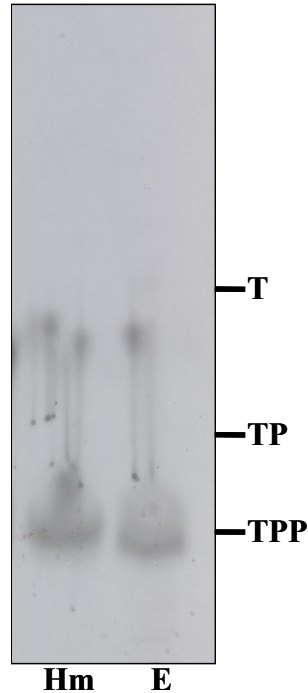


Figura 23. Cromatografia em camada delgada (TLC) de esquizontes marcados metabolicamente com L-[³⁵S] cisteína, extraídos com TCA 40% Hm: eritrócitos não-infectados e E: esquizontes.

Parasitas no estágio de trofozoíto foram cultivados por duas horas em meio deficiente de tiamina e cistina, (nesse meio tem presente apenas 1/10 de cada composto) e, posteriormente, marcados com L-[³⁵S] cisteína. Os estágios de esquizontes foram recuperados, extraídos com TCA 40% e analisados por *RP-HPLC* (**Protocolo II**). Um pico que coincide com o padrão de tiamina pirofosfato, também foi observado em eritrócitos não-infectados, porém com deslocamento de um minuto. Outro pico, com tempo de retenção de 20 minutos foi detectado em esquizontes e em eritrócitos não-infectados, porém não corresponde ao padrão de tiamina monofosfato, pois ele tem tempo de retenção de 21 minutos, já para a forma de tiamina livre não foi observado nenhum pico (**Figura 24**)

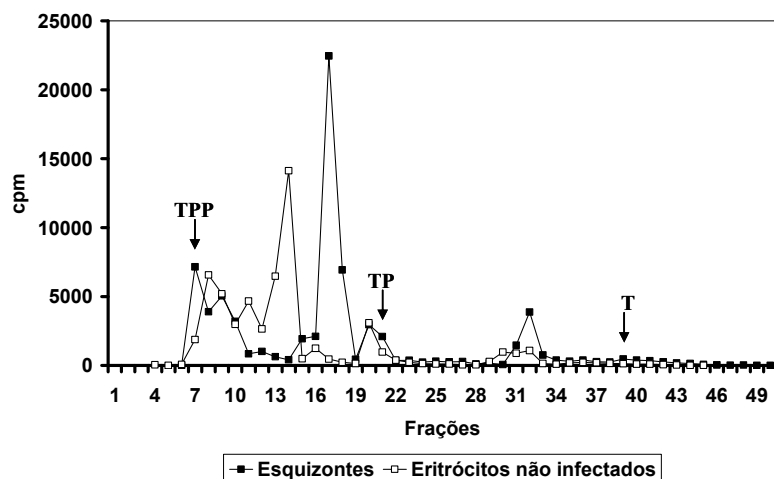


Figura 24. Perfil cromatográfico obtido após cultivo dos parasitas em meio depletado de cisteína e tiamina. Parasitas no estágio de esquizonte marcados metabolicamente com L-[³⁵S] cisteína, foram extraídos com TCA 40% e analisados. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

Experimentos utilizando L-[³⁵S] metionina como precursor metabólico são mostrados na **Figura 25**. Culturas sincrônicas foram marcadas metabolicamente, o estágio esquizonte foi recuperado, extraído com TCA 40% e purificado por *RP-HPLC* (**Protocolo II**). Picos com tempos de retenção coincidentes com os padrões de tiamina pirofosfato e tiamina monofosfato foram observados.

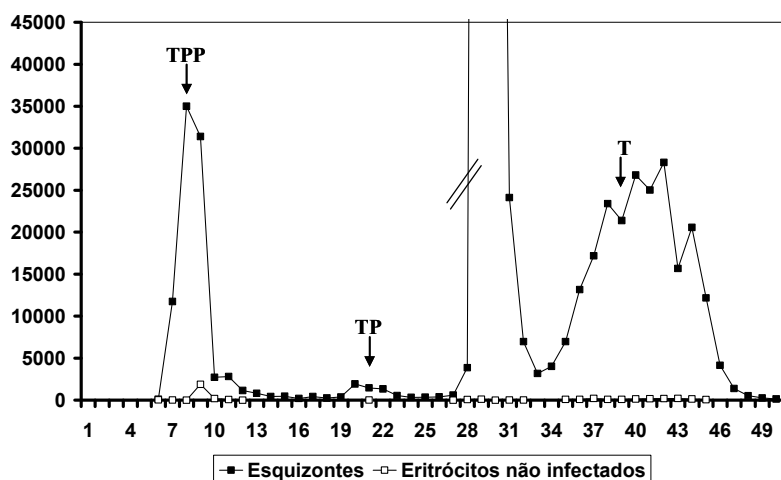


Figura 25. Perfil cromatográfico da purificação por *RP-HPLC* das frações extraídas com TCA 40% de culturas marcadas metabolicamente com L-[³⁵S] metionina. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

Para confirmar esse resultado o precursor, L-[³⁵S] metionina, foi cromatografado por *RP-HPLC*. Observou-se que o precursor é resolvido nos tempos de retenção dos padrões de tiamina pirofosfato e monofosfato. Portanto, por esta metodologia não se pôde concluir se existe incorporação de metionina em tiamina (**Figura 26**).

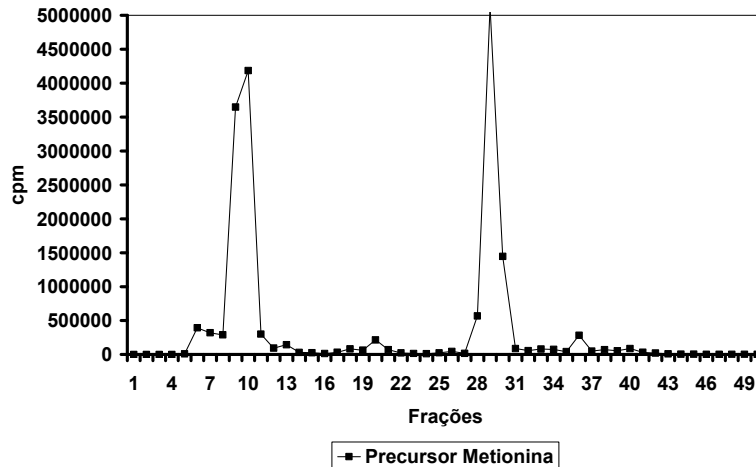


Figura 26. Perfil cromatográfico da purificação do precursor L-[³⁵S] metionina.

Análise por *TLC* do mesmo material foi realizada. Na região correspondente ao padrão de tiamina pirofosfato, aparentemente se detectou uma banda com R_f de 0,13. Na amostra de eritrócitos não-infectados, nenhuma banda foi observada (**Figura 27**). Para confirmar os resultados, as regiões correspondentes aos padrões de tiamina pirofosfato, monofosfato e tiamina livre foram raspadas, reextraídas e recromatografadas no *RP-HPLC*. Porém, não se observaram picos que confirmassem esses resultados. O precursor radiativo foi cromatografado por *TLC* e obteve-se uma banda com R_f de 0,39 presente entre o padrão de tiamina monofosfato e tiamina livre (0,30 e 0,49 respectivamente).

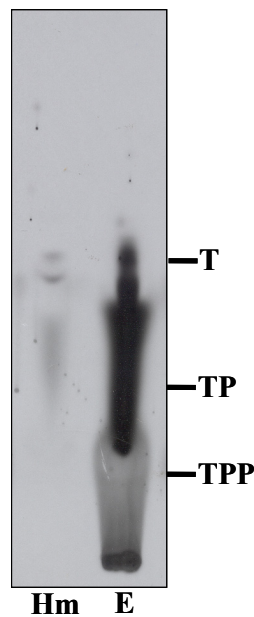


Figura 27. Cromatografia em camada delgada (*TLC*) de esquizontes marcados metabolicamente com L-[³⁵S] metionina, extraídos com TCA 40% Hm: eritrócitos não-infectados e E: esquizontes.

4.4 Caracterização bioquímica da biossíntese de tiamina em culturas de *P.falciparum* utilizando [U-¹⁴C] tirosina ou [U-¹⁴C] glicina como precursor metabólico.

A diferença básica na utilização desses dois aminoácidos está na origem do carbono 2 e do nitrogênio presentes no anel tiazol, uma vez que, em fungos, essas moléculas são originárias do aminoácido glicina, enquanto que em bactérias são provenientes da tirosina. Para verificar a origem do carbono 2 em *P. falciparum*, utilizamos os dois aminoácidos radioativos em marcações metabólicas. Inicialmente, culturas de *P. falciparum* no estágio de trofozoíto foram marcadas com os precursores radioativos [U-¹⁴C] tirosina ou [U-¹⁴C] glicina.

Os esquizontes foram recuperados, extraídos com TCA 40% (**Protocolo III**, de extração) e, posteriormente, analisados por *RT-HPLC* (**Protocolo II**). O perfil de eluição dos extratos de esquizontes marcados com [U-¹⁴C] tirosina está mostrado na **Figura 28 A**. Picos com tempos de retenção coincidentes com os padrões de tiamina pirofosfato e monofosfato foram observados. Eritrócitos não-infectados apresentaram perfil diferente, os picos detectados não coincidiram com os padrões de TPP e TP. Nesta análise, a tiamina livre não foi detectada.

Em esquizontes marcados com [U-¹⁴C] glicina, detectou-se um pico com tempo de retenção de 7 minutos, coincidente com o padrão de tiamina pirofosfato e, em 20 minutos outro pico que não coincide com o padrão de tiamina monofosfato (**Figura 28 B**). Não foi observado um pico definido no tempo de retenção da tiamina livre. Em eritrócitos não-infectados encontraram-se picos com tempo de retenção de 7, 9 e 21 minutos, tempos de retenção muito próximos ou semelhantes aos padrões de tiamina pirofosfato e tiamina monofosfato, respectivamente, tornando esses resultados pouco conclusivos (**Figura 28 B**).

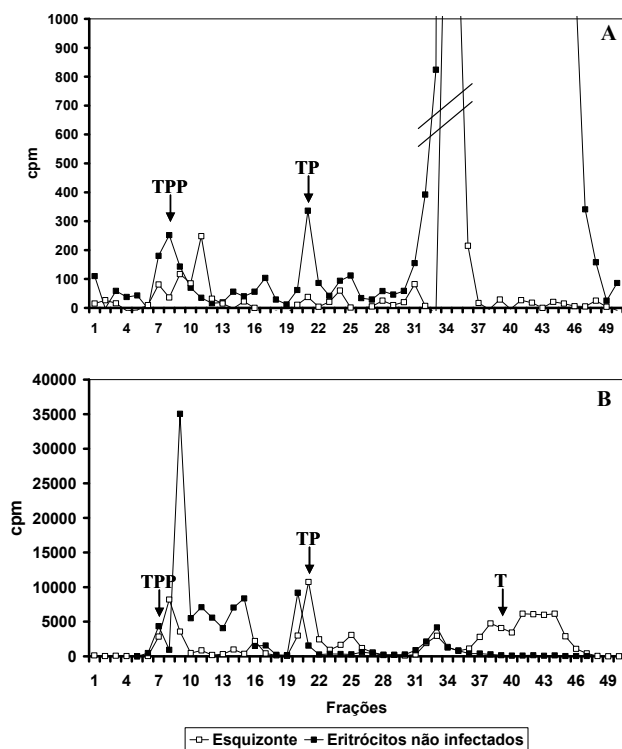


Figura 28. Perfil cromatográfico da purificação por *RP-HPLC* das frações de esquizontes marcados metabolicamente e extraídos com TCA 40%. **A:** perfil radiativo obtido de esquizontes marcados com [U-¹⁴C] tirosina; **B:** perfil radiativo obtido de esquizontes marcados com [U-¹⁴C] glicina. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

Como controle, os aminoácidos, [U-¹⁴C] tirosina e [U-¹⁴C] glicina, foram cromatografados, para determinar seus perfis neste sistema de *RP-HPLC*. O precursor [U-¹⁴C] glicina tem tempo de retenção entre 10 a 13 minutos e, o precursor [U-¹⁴C] tirosina tem tempo de retenção entre 33 a 35 minutos, em quantidades bem menores, também no tempo retenção de 11 minutos (**Figura 29**). Inference-se, portanto, que o pico observado no tempo de retenção de 11 minutos, nos parasitas marcados com [U-¹⁴C] glicina, possa tratar-se apenas de aminoácido livre, sugerindo que o parasita utiliza tirosina como precursor metabólico.

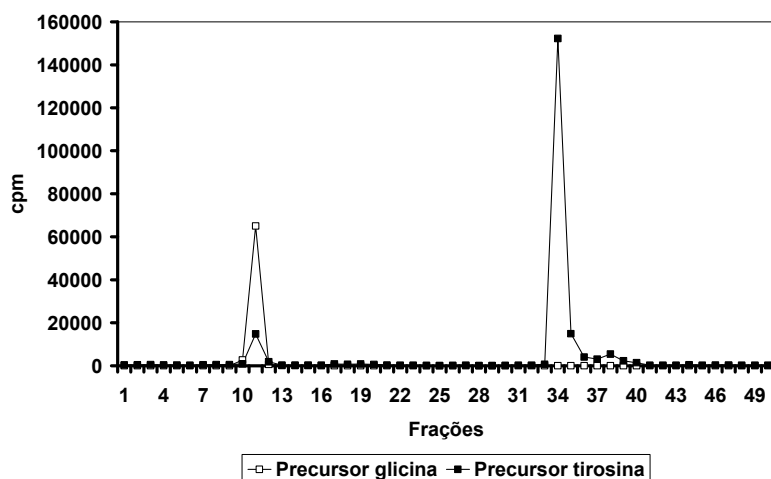


Figura 29. Perfil cromatográfico da purificação dos precursores $[U-^{14}C]$ glicina e $[U-^{14}C]$ tirosina.

Outros experimentos foram realizados utilizando extratos de esquizontes marcados com $[U-^{14}C]$ tirosina e $[U-^{14}C]$ glicina, extraídos com HCl 0,1M, e analisados por *RT-HPLC*. Na **Figura 30A** está apresentado o perfil cromatográfico de esquizontes marcados com $[U-^{14}C]$ tirosina, observaram-se picos correspondentes aos padrões de tiamina pirofosfato e tiamina livre. O mesmo perfil, entretanto, foi encontrado em eritrócitos não-infectados, porém em quantidades menores. Não foi observado pico correspondente ao tempo de retenção do padrão de tiamina monofosfato em esquizontes e eritrócitos não-infectados. A **Figura 30B** demonstra o perfil cromatográfico de esquizontes marcados com $[U-^{14}C]$ glicina, observa-se somente um pico com tempo de retenção correspondente ao padrão de tiamina pirofosfato. O mesmo perfil também foi observado em eritrócitos não-infectados.

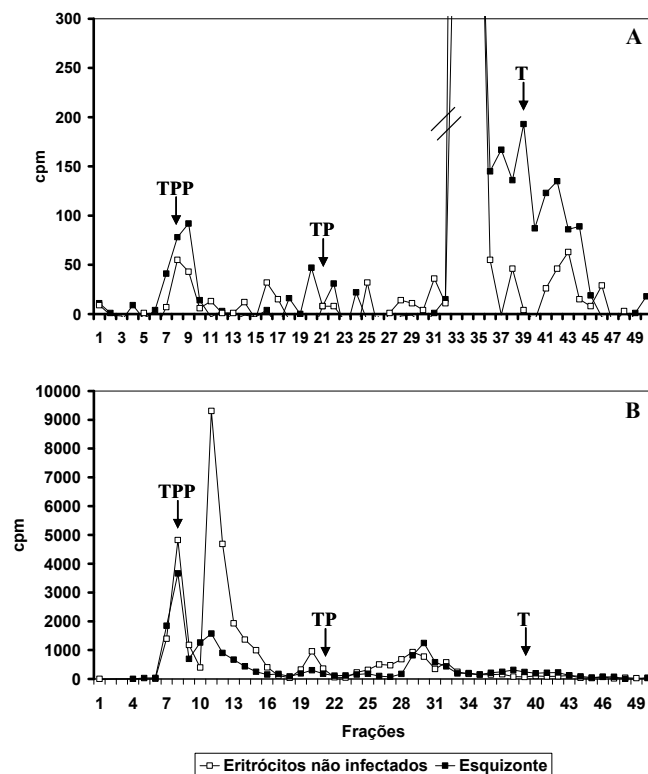


Figura 30. Perfil cromatográfico da purificação por *RP-HPLC* de esquizontes marcados metabolicamente, extraídos com HCl 0,1M. **A:** perfil radiativo obtido de esquizontes marcados com [U-¹⁴C] tirosina; **B:** perfil radiativo obtido de esquizontes marcados com [U-¹⁴C] glicina. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

Realizou-se análise por *TLC* de esquizontes marcados metabolicamente com [U-¹⁴C] tirosina e [U-¹⁴C] glicina, extraídos com TCA 40% e cromatografados em Pertisil K6 (para compostos fosforilados). Utilizando o precursor [U-¹⁴C] tirosina, observaram-se, em esquizontes, bandas com os R_{fs} de 0,54 e 0,21 referentes aos padrões de tiamina livre e tiamina monofosfato, enquanto que em eritrócitos não-infectados, nenhuma banda foi detectada. Com o precursor [U-¹⁴C] glicina, observou-se uma banda com R_f de 0,10 correspondente ao padrão de tiamina pirofosfato. O mesmo perfil também foi encontrado em eritrócitos não-infectados. Uma banda com R_f de 0,25, correspondente ao padrão de tiamina monofosfato, foi observada em esquizonte. Para confirmar estes resultados, bandas correspondentes aos R_{fs} dos padrões foram raspadas, reextraídas e analisadas por *RP-HPLC* (**Figura 31**).

A banda referente ao R_f do padrão de tiamina livre de esquizontes marcados com [U-¹⁴C] tirosina foi confirmada por *RP-HPLC*. Para confirmar esses resultados apenas o precursor radioativo foi cromatografado por *TLC*. Observou-se que o aminoácido tirosina tem um R_f de 0,55, próximo à banda encontrada em esquizontes, enquanto o padrão de tiamina

livre apresentou um R_f de 0,49. Como, nos resultados anteriores, não foi possível concluir incorporações relacionada à tiamina livre.

As bandas referentes aos padrões de tiamina pirofosfato e monofosfato de esquizontes e eritrócitos não-infectados, marcados com $[U-^{14}C]$ glicina, também foram recromatografadas por *RP-HPLC*. Nenhum pico com o mesmo tempo de retenção do padrão de tiamina monofosfato foi observado, porém um pico nas amostras de esquizontes e eritrócitos não-infectados com o mesmo tempo de retenção do padrão da tiamina pirofosfato foi observado. Para confirmar esse resultado, apenas o precursor radiativo foi cromatografado por *TLC*, resultando em uma banda com R_f de 0,40, que não coincide com o padrão de tiamina pirofosfato.

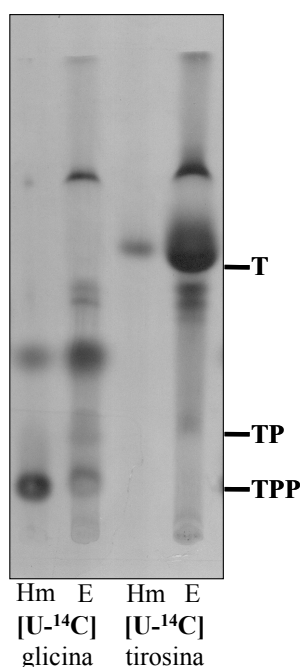


Figura 31. Cromatografia em camada delgada (*TLC*) de esquizontes marcados metabolicamente $[U-^{14}C]$ tirosina e $[U-^{14}C]$ glicina, extraídos com TCA 40% Hm: eritrócitos não-infectados e E: esquizontes

Para confirmar os resultados de que a tirosina é o precursor metabólico para formação do anel tiazol, outros experimentos foram realizados. Culturas assíncronas foram marcadas metabolicamente com $[U-^{14}C]$ tirosina e os três estágios do parasita: anel, trofozoíto e esquizonte, foram separados por um gradiente de Percoll e extraídos com HCl 0,1 M (**Protocolo II**, extração). Os extratos foram analisados por *TLC* em placa *RP-TL* (Cromatofolha-alumínio – RP-18F_{254S}; MERCK). A **Figura 32** demonstra uma banda com R_f de 0,20 que coincide com o padrão de tiamina pirofosfato apenas no estágio de esquizonte. Esses resultados não foram confirmados por outra metodologia.

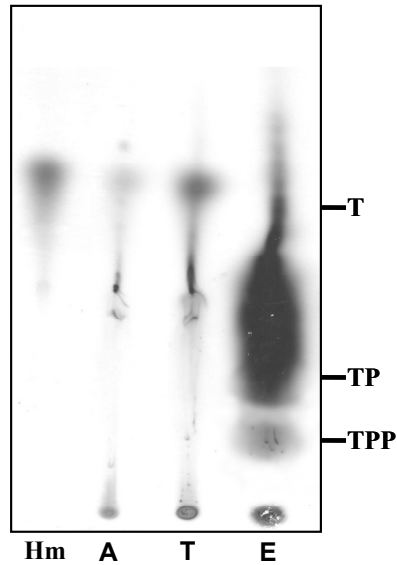


Figura 32. Cromatografia em camada delgada (TLC) de culturas assincrônicas marcadas metabolicamente [U-¹⁴C] tirosina, extraídos com HCl 0,1M Hm: eritrócitos não-infectados e A: anel, T: trofozoíto, E: esquizontes

4.5 Caracterização bioquímica da biossíntese de tiamina em culturas de *P.falciparum* utilizando [U-¹⁴C] nicotinamida como precursor metabólico.

Inicialmente, culturas sincrônicas de *P.falciparum* foram marcadas metabolicamente com o precursor radioativo [U-¹⁴C] nicotinamida e extraídas com TCA 40% (**Protocolo III**, de extração). A **Figura 33** mostra o perfil cromatográfico obtido de esquizonte após a purificação por *RP-HPLC*. Observa-se um pico coincidente com o padrão de tiamina pirofosfato. O mesmo perfil também foi encontrado em eritrócitos não-infectados, portanto, este pico pode ser o precursor radioativo não incorporado que está sendo eluído próximo ao pico de injeção. Não foi observado nenhum pico coincidindo com os padrões de tiamina monofosfato e tiamina livre. Com base nestes resultados, infere-se que o parasita não utiliza a nicotinamida como precursor metabólico.

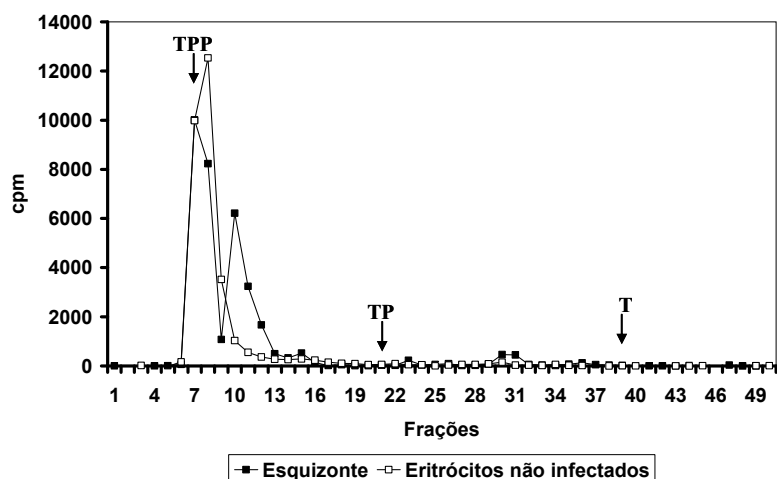


Figura 33. Perfil cromatográfico da purificação por *RP-HPLC* das frações extraídas com TCA 40% de culturas marcadas metabolicamente com $[U-^{14}C]$ nicotinamida. TPP: tiamina pirofosfato; TP: tiamina monofosfato e T: tiamina livre.

4.6 Inibição do desenvolvimento de *P. falciparum* tratado com fosmidomicina e 3CIDHP (análogo da bacimetrina)

Determinando-se a presença da via de biossíntese de tiamina ativa em *P. falciparum*, seguiu-se a avaliação do o efeito da fosmidomicina e 3CIDHP, na biossíntese dessa vitamina no parasita.

Já foi determinado em nosso laboratório, o valor da IC_{50} da fosmidomicina para a cepa 3D7 que é de $1.25 \pm 0.05 \mu M$ nas 48 horas de tratamento. Todos os experimentos foram realizados com $1 \mu M$ de fosmidomicina, pois somente uma percentagem dos parasitas morrem e a síntese protéica não é alterada (43).

Como não foi possível a obtenção da bacimetrina, em colaboração com o Professor Ernani Pinto da Faculdade de Farmácia da USP, tentou-se, inicialmente, realizar sua síntese química, porém não foi possível. Optou-se, portanto, pela síntese de um análogo (**Figura 34**). Determinou-se o valor da IC_{50} para 3CIDHP, que foi de $73,2 \mu M$. Todos os experimentos foram realizados com $50 \mu M$ do 3CIDHP, pois somente uma percentagem dos parasitas morrem e a síntese protéica não é alterada.

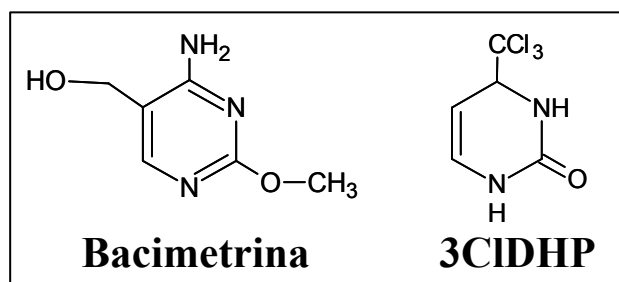


Figura 34. Estrutura da molécula de bacimetrina e 3CIDHP (análogo da bacimetrina).

Experimentos foram realizados para avaliar o efeito da droga sobre a biossíntese protéica ao longo de 48 h. Parasitas foram tratados com 25, 50 e 73 μM de 3CIDHP e, marcados com L-[^{35}S] metionina. Não houve diferenças de incorporação nas proteínas precipitadas por TCA entre os parasitas não tratados dos tratados com a as diferentes concentrações de 3CIDHP (**Figura 35**).

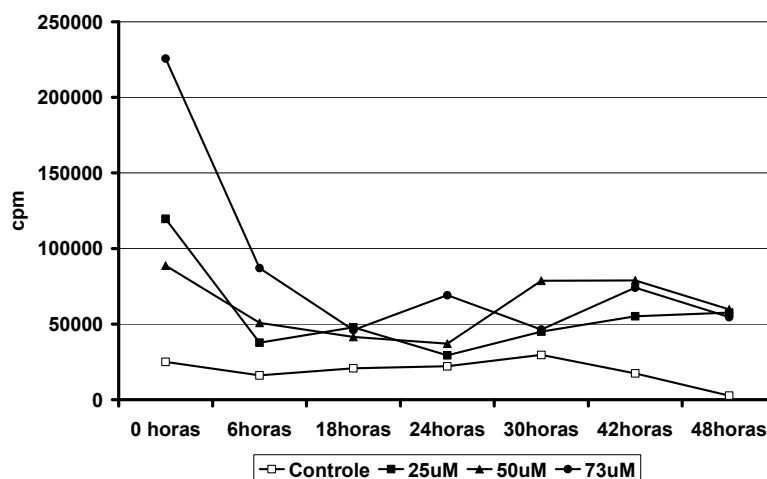


Figura 35. Perfil da síntese protéica em *P. falciparum*, após tratamento com diferentes concentrações do 3CIDHP.

4.7 Efeito da fosmidomicina e 3CIDHP na biossíntese de tiamina

O efeito da fosmidomicina e de 3CIDHP na via de biossíntese de tiamina foi avaliado por *RP-HPLC* (**Protocolo II**). O mesmo número de parasitas tratados e não tratados no estágio de esquizonte, foram injetados no sistema de *RP-HPLC*. Culturas assincrônicas foram tratadas com 1 μM de fosmidomicina ou 50 μM de 3CIDHP por 48 h e, marcadas com o precursor [^{14}C] acetato de sódio nas últimas 18 horas do tratamento.

Esquizontes tratados com fosmidomicina apresentaram uma inibição de 6,62% e 11,53% na biossíntese de tiamina na forma pirofosforilada e monofosforilada, respectivamente. Já os esquizontes tratados com o 3CIDHP apresentaram uma inibição de 46,32% e 62,5% na biossíntese de tiamina pirofosfato e monofosfato, respectivamente (**Tabela 2**). O efeito das drogas sobre a biossíntese da tiamina livre não foi avaliado, devido aos resultados inconclusivos anteriormente obtidos.

Tabela 2. Efeito da fosmidomicina e 3CIDHP na biossíntese de tiamina, em parasitas marcados metabolicamente com [1-¹⁴C] acetato de sódio.

	Controle	Fosmidomicina		3CIDHP	
	% total (cpm)	% total (cpm)	% Inibição	% total	% Inibição
Tiamina pirofosfato	6263,277	414,986	6,62	2901,752	46,32
Tiamina monofosfato	295,385	34,063	11,53	110,747	62,5

Foram realizados dois experimentos para análise do efeito das drogas sobre a biossíntese de tiamina, em parasitas marcados com L-[³⁵S] cisteína. No primeiro experimento, quando os parasitas foram tratados com fosmidomicina, observou-se inibição de 55,79%, apenas na biossíntese da tiamina pirofosfato; enquanto que, a biossíntese da tiamina monofosfato não foi inibida. Esquizontes tratados com o 3CIDHP apresentaram uma inibição de 28,02% na biossíntese da tiamina pirofosfato. O análogo não exerceu efeito sobre a biossíntese da tiamina monofosfato e a biossíntese da tiamina livre não foi analisada.

No segundo experimento, em que os esquizontes foram tratados com fosmidomicina e 3CIDHP, observou-se uma inibição de 88,29% e 59,32% na biossíntese da tiamina monofosfato. A fosmidomicina e o 3CIDHP não exerceram efeito sobre a tiamina pirofosfato e a tiamina livre não foi analisada (**Tabela 3**).

Esses resultados são conflitantes e como visto anteriormente as marcações utilizando L-[³⁵S] cisteína como precursor metabólico também não foram reprodutíveis, desconsidera-se, portanto, os resultados obtidos. Análise por *TLC* dos parasitas tratados também foi realizada, porém não gerou resultados conclusivos.

Tabela 3. Efeito da fosmidomicina e 3CIDHP na biossíntese de tiamina, com parasitas marcados metabolicamente com L-[³⁵S] cisteína.

	Controle	Fosmidomicina		3CIDHP	
	% total (cpm)	% total (cpm)	% Inibição	% total	% Inibição
Experimento 1					
Tiamina pirofosfato	2044,965	904,294	55,79	1471,777	28,02
Tiamina monofosfato	93,384	297,793	0	127,712	0
Experimento 2					
Tiamina pirofosfato	284,749	1179,665	0	341,511	0
Tiamina monofosfato	1301,048	152,223	88,29	529,155	59,32

5 DISCUSSÃO

Em nosso laboratório foi demonstrado que *P. falciparum* sintetiza *de novo* o piridoxal (vitamina B₆) a partir da DOXP (43). Em plantas e bactérias, a DOXP também é um precursor da biossíntese do tiazol, que posteriormente se liga aos derivados de pirimidina para formar a tiamina monofosfato. Nossa hipótese foi estudar se nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum* existe uma via ativa para a biossíntese de tiamina e seus derivados fosforilados. A tiamina pirofosfato é uma coenzima da enzima DOXP sintase envolvida na via MEP (23, 24).

Estudos *in silico* no genoma de 3D7, foram realizados, com a colaboração do Dr. Emílio F. Merino (Bioinformático, pós-doutorando no *The Institute for Genomic Research (TIGR, USA)*; sob supervisão da Dr^a Jane Carlton), com o propósito de determinar a presença de genes e/ou seqüências que codificassem as enzimas envolvidas na biossíntese de tiamina no genoma do parasita. Uma das seqüências encontradas corresponde ao gene que codificaria para a enzima thiF (número de acesso: PF13_0344), a qual estaria envolvida na síntese da parte tiazol da molécula de tiamina. Outra seqüência encontrada corresponderia ao gene da enzima thiD (número de acesso: PFE1030c) cuja função hipotética seria de *fosfometilpirimidina quinase*. Outro gene, codificaria para uma enzima bifuncional da biossíntese de tiamina, a thiE, a qual possui atividade *tiamina fosfato pirofosforilase* (número de acesso: PFF0680c) (plasmoDB.org). Essas análises *in silico* apontaram para a possibilidade da presença da via de biossíntese de tiamina no parasita.

Em 2005, Bozdech e Ginsburg já haviam sugerido, por abordagens *in silico*, a possível existência da via de biossíntese de tiamina em *P. falciparum* (84).

A tiamina é formada pelo acoplamento de duas estruturas sintetizadas independentemente, o hidroxietil-tiazol fosfato (THZ-P) e a hidroximetil-pirimidina pirofosfato (HMP-PP) sendo a tiamina-fostato sintase (TPS) a enzima responsável pela união das duas partes (58). Esse passo é comum a todos os organismos que possuem a via de biossíntese de tiamina, porém os passos metabólicos (enzimas e substratos) responsáveis pela síntese do HMP-PP e HET-P dependem do organismo estudado. O primeiro objetivo deste trabalho foi demonstrar se a via de biossíntese de tiamina encontrava-se ativa durante todo o ciclo intraeritrocitário do parasita, identificando quais precursores estariam envolvidos na biossíntese do precursor THZ-P, já que este difere entre alguns organismos e, poderia estar relacionado com a utilização do precursor DOXP.

A caracterização da biossíntese de tiamina foi realizada por meio de marcações metabólicas utilizando intermediários radioativos, os quais foram selecionados baseados na disponibilidade comercial ou de síntese química.

Quanto às condições de extração, utilizou-se primeiramente, etanol/água, baseando-se no método de extração de piridoxol, metodologia utilizada para extração de vitamina hidrossolúvel; entretanto, os resultados para a tiamina não foram satisfatórios. Uma segunda metodologia de extração foi com o ácido clorídrico, o qual é utilizado na extração de tiamina em bactérias e algas; porém não foi satisfatória para *P. falciparum*. A extração com ácido tricloacético, que é amplamente utilizada para precipitação de proteínas, e é a mais utilizada para extração de tiamina nos eritrócitos, sendo a mais adequada para a extração de tiamina nos estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*.

Os métodos mais usados para determinação da tiamina (vitamina B₁) são *RP-HPLC* e espectrometria de massas. Os métodos de *RP-HPLC* podem ser realizados utilizando detecção ultravioleta, mas o mais comum é utilizar detecção por fluorescência, onde a molécula de tiamina é convertida numa molécula de tiocromo por ação do ferrocianeto ou brometo de cianogênio, e este é analisado por *RP-HPLC*. Os eritrócitos utilizados na cultura de *P. falciparum* apresentam tiamina, sendo impossível distinguir, pelas metodologias de *RP-HPLC* e espectrometria de massas, a origem da vitamina nos parasitas sem marcação metabólica. O método de tiocromo apresentou uma baixa sensibilidade em nossas amostras provavelmente porque as quantidades de tiamina e seus derivados sejam muito baixas.

Devido à estrutura da molécula de tiamina, os métodos de *RP-HPLC* se baseiam na utilização de um par iônico ou tampão fosfato para a separação da molécula. O nosso método de escolha de *RP-HPLC* para análise de tiamina envolveu a utilização de um par iônico, o hexasulfonato de sódio, o qual interfere nas análises de *TLC* e espectrometria de massas. A metodologia de *TLC* é pouco usada para análise da tiamina e, quando usada, é para análise de compostos farmacêuticos, onde se encontra tiamina na forma livre.

Padronizamos uma metodologia de *TLC* para análise de tiamina livre, tiamina monofosfato e tiamina pirofosfato, a partir de uma metodologia de cromatografia em papel (96), utilizando uma placa de *RP-TLC* (Cromatofolha-alumínio – RP-18F_{254S}; MERCK); porém os resultados não foram satisfatórios e, trocamos a placa por uma específica para a cromatografia de compostos fosforilados, placa Partisil K6 (Sílica Gel 60Å, placa de vidro; Whatman).

Inicialmente, tentamos padronizar um sistema isocrático para análise das formas de tiamina livre, monofosfato e pirofosfato; porém o tempo de retenção de tiamina pirofosfato e tiamina monofosfato ficaram muito próximos. Modificamos esse sistema para um gradiente, o qual propiciou a separação das três formas de tiamina.

Para determinar se *P. falciparum* possui a via de biossíntese de tiamina ativa, utilizou-se, inicialmente, como marcador metabólico o [1-¹⁴C] acetato de sódio. Apesar do [1-¹⁴C] acetato de sódio não ser um precursor específico para a via de biossíntese de tiamina, os resultados, utilizando as amostras marcadas com este precursor, foram mais conclusivos. Estudos sobre a via MEP mostraram que o *P. falciparum* é capaz de incorporar o precursor [1-¹⁴C] acetato de sódio, demonstrando que a DOXP foi sintetizada pelo parasita a partir desse precursor radioativo. O precursor [1-¹⁴C] acetato de sódio também foi utilizado na caracterização da biossíntese de vitamina B₆ em *P. falciparum*. O resultado de incorporação com [1-¹⁴C] acetato de sódio nos intermediários da via MEP e na biossíntese *de novo* de piridoxol em *P. falciparum*, foi confirmado utilizando a [2-¹⁴C] DOXP (43).

Trabalhos anteriores haviam demonstrado a utilização do acetato de sódio como precursor para a biossíntese de tiamina. O precursor [2-¹⁴C] acetato de sódio foi incorporado no tiazol e na pirimidina da molécula de tiamina em *S. cerevisiae*, embora em baixas concentrações (98).

A **Figura 14** demonstra o perfil cromatográfico da análise por *RP-HPLC* de parasitas marcados com [1-¹⁴C] acetato de sódio, observa-se a presença de tiamina pirofosfato e tiamina monofosfato nos três estágios parasitários. No tempo de retenção da tiamina livre, encontrou-se uma região com várias frações radioativas, dificultando as análises da vitamina nesta forma. Por outro lado, quando as análises foram realizadas por *TLC*, duas bandas com *R_f* iguais aos da tiamina monofosfato e da tiamina livre foram detectadas nos estágios de esquizontes (**Figura 16**). A forma de tiamina monofosfato foi resolvida por *RP-HPLC*, já a tiamina livre, não foi possível ser analisada devido a presença de um pico largo e distorcido, o qual tornou os resultados inconclusivos. Conclui-se que com a utilização do precursor [1-¹⁴C] acetato de sódio a via de biossíntese de tiamina encontra-se ativa nos três estágios intraeritrocitários de *P. falciparum*.

A forma de tiamina livre quando analisada por *RP-HPLC*, independente do precursor estudado apresentou o mesmo perfil cromatográfico. Picos largos e indefinidos foram observados. Não sabemos por que isso acontece, mas sugerimos que o nosso sistema não é adequado para análise da tiamina livre nos parasitas. O padrão utilizado de tiamina está na forma hidrocloreídrica e, provavelmente, no parasita, a molécula de tiamina esteja em outra forma química o que modificaria sua interação com a coluna e na fase móvel do sistema de *RP-HPLC*.

Provavelmente por ser o primeiro composto formado na via de biossíntese, a detecção da tiamina monofosfato possa ser facilitada, já a tiamina pirofosfato é encontrada em maior

abundância no interior das células por ser a forma ativa da vitamina. Recentemente, foi demonstrado que, em *P. falciparum*, a tiamina monofosfato é desfosforilada por processos não identificados para tiamina livre e, posteriormente pirofosforilada para tiamina pirofosfato por uma N-fosfoquinase, sugerindo que esse passo seja rápido, não sendo, portanto, possível a detecção da tiamina livre (86); o que justificaria nossos resultados inconclusivos nas análises para tiamina livre neste organismo.

Em 2006, Wrenger *et al.*, demonstraram, por *Norther Blotting*, que os transcritos ThiM (HMP-quinase), ThiD (THZ-quinase) e ThiE (tiamina fosfato quinase) que convertem o HMP-PP e o THZ-P em tiamina monofosfato, estão presentes em todo o ciclo intraeritrocitário de *P. falciparum* (85), esse dado corrobora nossos resultados reforçando a presença da via de biossíntese de tiamina ativa nos estágios intraeritrocitários do parasita.

A origem ou a biossíntese dos precursores HMP e THZ na via da tiamina ainda não estão esclarecidos em *P. falciparum*, existindo a necessidade do aprofundamento no estudo. A biossíntese do precursor HMP não foi identificada em *P. falciparum*, embora é sabido que o parasita pode obter esse precursor do meio extracelular. Os genes que codificam o “*no message in thiamine*” (NMT1) e o ThiC (enzimas responsáveis pela formação de HMP em eucariontes e procariontes, respectivamente) não foram identificados no genoma do parasita (53, 99). Em relação ao tiazol, que é a outra molécula da via, foi recentemente encontrado a presença de um gene que codifica o 4-metil-5-B-hidroxieltiazol quinase (ThiM) responsável pela fosforilação de THZ em THZ-P (85). Embora a sequência de muitos dos genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese do THZ não serem conservados ou não foram identificados em *P. falciparum*, a existência da biossíntese de THZ é possível devido a não dependência exógena do parasita de THZ.

Acreditando na possível existência, em *P. falciparum*, da via de biossíntese do tiazol partimos para a demonstração de qual(is) precursor(es) estaria(m) envolvido(s) na biossíntese da molécula de tiazol nesse organismo.

A via de biossíntese do tiazol se difere entre procariontes e eucariontes. O 5-carbono presente no tiazol de eucariontes pode ser oriundo de uma 2-pentulose-5-fosfato, provavelmente, uma D-ribose-5-fosfato ou D-xilulose originária da via das pentoses fosfato, como em de *S. cerevesiae* ou como acontecem plantas e em bactérias, pode ser oriunda da 1-deoxi-D-xilulose-fosfato (DOXP)(59, 64).

Para confirmar se a DOXP estaria envolvida na formação do anel tiazol em *P. falciparum*, pretendíamos realizar marcações metabólicas utilizando [2-¹⁴C] DOXP como precursor, porém esse precursor não é disponível comercialmente, e sua síntese não pode ser

realizada; portanto não obtivemos a confirmação se a molécula de DOXP está envolvida na formação do anel tiazol no parasita.

No anel tiazol da molécula de tiamina, encontra-se a presença de um enxofre (S) e a origem desse enxofre vem sendo estudada há alguns anos. Estudos anteriores mostram que o enxofre da cisteína e da metionina pode ser incorporado na tiamina de *S. cerevisiae* e *E. coli* (100). O enxofre da metionina tem sido reportado como o doador do enxofre do tiazol de *S. cerevisiae* (101) e *Bacillus subtilis* (102). Foi demonstrado também que a cisteína é o doador do átomo do S do tiazol em *S. typhimurium* (103). Acreditava-se que a cisteína e/ou metionina poderiam ser os doadores do enxofre presente no tiazol. Para determinar se a cisteína ou a metionina seriam doadores do enxofre presente no anel tiazol da tiamina em *P. falciparum*, utilizamos L-[³⁵S] cisteína ou L-[³⁵S] metionina como precursores metabólicos.

Em 1986, Tazuya (63) investigou a incorporação da [³⁵S] cisteína e [³⁵S] metionina no anel tiazol da tiamina, comparando a atividade específica do enxofre incorporado no tiazol e nas proteínas de *E. coli* e *S. cerevisiae*. Quando marcado com [³⁵S] cisteína observou-se que a atividade específica do enxofre incorporado no tiazol e nas proteínas estavam em níveis similares, já quando marcado com [³⁵S] metionina a atividade específica do enxofre não foi observada na tiamina, porém nos resíduos de metionina das proteínas celulares, confirmando que apenas a cisteína é o doador direto do enxofre do tiazol.

Para determinar se a cisteína ou a metionina seriam doadores do enxofre presente no anel tiazol da tiamina em *P. falciparum*, esquizontes foram marcados com L-[³⁵S] cisteína ou L-[³⁵S] metionina e analisados por *RP-HPLC* e *TLC*. Como mostrado na **Figura 20**, diferentes experimentos foram realizados utilizando L-[³⁵S] cisteína. Houve variação nos perfis dos experimentos, talvez pela utilização do par iônico, visto que esse pode propiciar variação no tempo de retenção das moléculas.

O pico referente ao tempo de retenção da tiamina pirofosfato sugere ser realmente a molécula biossintetizada pelo parasita, pois quando apenas o precursor radioativo foi analisado, como mostrado na **Figura 19**, o tempo de retenção não correspondeu ao padrão de tiamina pirofosfato. Utilizamos a análise por *TLC* para confirmar estes resultados, porém na mesma altura onde se detecta uma banda que corresponde ao R_f do padrão de tiamina pirofosfato, também foi detectada uma banda nas amostras de eritrócitos não-infectados (**Figura 22**). O resultado obtido por *RP-HPLC* não pôde ser confirmado pela análise por *TLC*, sugerindo que *P. falciparum* utiliza L-[³⁵S] cisteína como precursor.

Esquizontes marcados com L-[³⁵S] metionina apresentaram o mesmo perfil, nas análises por *RP-HPLC* que o precursor radiativo (**Figuras 25 e 26**), entretanto, eritrócitos

não-infectados não apresentaram um perfil similar. Sabe-se que os eritrócitos infectados possuem uma membrana mais frágil, o que poderia ter facilitado a entrada do radioativo, sendo que 90% dos aminoácidos livres ficam armazenados no citosol das células, o que não acontece em eritrócitos não-infectados pela preservação da membrana. A não incorporação do radiativo também foi observada em esquizontes marcados com L-[³⁵S] metionina e analisados por *TLC* (**Figura 27**), inferiu-se que a metionina não seria o doador do enxofre presente no tiazol.

A análise das diferentes formas de tiamina por *RP-HPLC*, utilizando L-[³⁵S] como precursor metabólico, ficou bastante prejudicada devido a presença do precursor radioativo não incorporado. Apenas experimentos de incorporação não são suficientes para estabelecer qual aminoácido seria doador do enxofre da molécula de tiazol, pois a metionina e a cisteína são convertidas uma na outra em muitas células, sugerindo que metionina seria sintetizada por meio da cisteína (63).

Para ter certeza que apenas cisteína seria o doador do enxofre presente no tiazol, faz-se necessário o acompanhamento da atividade específica do radiativo no tiazol e nas proteínas das células como foi realizado em *E. coli* e *S. cerevisiae* (63).

Em 2007, Muller e Kappes (104) realizaram análises *in silico* no genoma de *P. falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* e *C. hominis*, encontrando alguns genes/seqüências que codificariam proteínas da biossíntese do anel tiazol da tiamina envolvidos(as) com o processo de transferência do enxofre para o tiazol como: proteína carregador de enxofre (ThiS), ThiF (adeniltransferase) e cisteína desulfurase (IscS).

Em 1987, Tazuya *et al.*, demonstraram a existência de duas vias distintas para a biossíntese do tiazol da tiamina. Utilizando [¹⁵N] tirosina e [¹⁵N] glicina demonstraram que os eucariontes *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *E. nidulans* e *M. racemosus*, e os procariontes *P. putida* e *B. subtilis* incorporam o átomo de nitrogênio da glicina no tiazol, enquanto outros procariontes como *E. coli* e *E. aerogenes* incorporam o átomo de nitrogênio da tirosina. A diferença das vias varia entre microrganismos aeróbios e anaeróbios (57).

Para saber qual dos dois aminoácidos o *P. falciparum* utiliza para a biossíntese do tiazol, utilizamos [U-¹⁴C] tirosina ou [U-¹⁴C] glicina como precursor metabólico.

Os resultados nos parasitas marcados com [U-¹⁴C] tirosina e analisados por *RP-HPLC* (**Figura 28A**), demonstraram que o parasita utiliza a tirosina como doador do átomo de carbono na formação do tiazol. Verificou-se a presença da tiamina pirofosfato e da tiamina monofosfato marcadas metabolicamente, porém não foi possível a confirmação destas moléculas por outra metodologia (*TLC*). A *TLC* resolveu apenas a tiamina livre, porém os

resultados não foram conclusivos em experimentos anteriores (**Figura 31**). Sugere-se, portanto, que o parasita utilizaria a [U-¹⁴C] tirosina como precursor.

Nos estudos em *E. coli* utilizando [U-¹⁴C] tirosina como precursor, observou-se que somente o carbono – C2 do tiazol era marcado, indicando que somente o átomo α do carbono de tirosina foi incorporado ao tiazol (66), portanto o precursor [U-¹⁴C] tirosina escolhido para análise do aminoácido em *P. falciparum*, é correto, embora, provavelmente, as metodologias de extração, *RP-HPLC* e *TLC* não foram adequadas.

Experimentos utilizando o precursor [U-¹⁴C] glicina foram realizados para descartar a hipótese de que o aminoácido glicina não seria o precursor do tiazol da tiamina, e sim a tirosina. Em *B. subtilis* somente um átomo de carbono da posição α da glicina [α -¹⁴C] foi incorporado no C2 do tiazol (55).

A análise, por *RP-HPLC*, de parasitas marcados com [U-¹⁴C] glicina não foi conclusiva, uma vez que as amostras de eritrócitos não-infectados apresentaram o mesmo perfil (**Figura 28B**). Similar resultado foi obtido nas análises por *TLC* (**Figura 31**), indicando que a glicina é incorporada nos eritrócitos não-infectados. Portanto, não foi possível concluir se o parasita utilizaria a glicina para sintetizar a molécula de tiazol.

Outra abordagem metodológica, para caracterizar o aminoácido que forma o tiazol, seria a utilização de glicina e de tirosina marcadas com ¹⁵N e ¹³C e, posterior análise por espectrometria de massas. Nosso grupo, infelizmente, não teve sucesso na análise de amostras marcadas com ¹³C por espectrometria de massas, devido à baixa incorporação desse marcador pelo parasita. Ainda assim, existe a dificuldade de analisar, por espectrometria de massas, amostras oriundas de purificação prévia por *RP-HPLC*, pois há a interferência do par iônico presente no solvente. Ressaltasse que, foi demonstrado a incorporação intacta do ¹⁵N -¹³C de [¹⁵N, 2-¹³C] glicina no fragmento N3, C2 do tiazol (55).

Os aminoácidos glicina e tirosina são substratos para os genes ThiO e ThiH, em *B. subtilis* e *E. coli*, respectivamente. Abordagens em *silico*, com colaboração com o Prof. Dr. Arthur Gruber, não encontraram, no genoma de *P. falciparum*, nenhum gene/sequência similar aos genes ThiO e ThiH.

Pouco se sabe sobre a biossíntese do tiazol de tiamina em eucariontes. Recentemente, foi publicada a primeira caracterização de enzimas envolvidas na formação do tiazol de tiamina em eucariontes (75). Neste trabalho, os autores demonstraram a caracterização de uma adenilato tiazol (ADT) que se liga ao sítio ativo de Thi4 (relacionado a biossíntese do tiazol). Esta identificação sugere que o NAD, provavelmente, seria o precursor para ADT sendo o mecanismo chave para a biossíntese de tiazol em eucariontes.

No entanto, foi confirmada a hipótese de que NAD é um substrato para Thi4, sendo que o NAD é hidrolisado para a formação do ADPr, demonstrando assim, o primeiro passo da biossíntese de tiazol em eucariontes. No genoma de *P.falciparum* não foram encontrados genes/seqüências com similaridade para Thi4 presente em outros eucariontes (76).

Os experimentos, mostrados na **Figura 33**, sugerem que *P.falciparum* não utiliza o NAD como precursor para a biossíntese do tiazol.

Chatterjee *et al.* (2007), também demonstraram que na presença de glicina, dois mutantes de Thi4 catalisam a conversão de NAD para se ligar no Thi4 (76). Como foi demonstrado anteriormente, aparentemente *P.falciparum* não utilizaria glicina como precursor, corroborando pela não incorporação de NAD pelo parasita nas moléculas de tiamina e derivados.

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a fosmidomicina, além de alterar a biossíntese dos intermediários da via MEP e, em consequência, alterando a biossíntese de isoprenoídes; também altera a biossíntese da piridoxina (43). Estes resultados propiciaram a hipótese de que se a síntese de tiamina encontrava-se ativa no parasita e essa poderia utilizar a DOXP como precursor, portanto, a fosmidomicina poderia alterar também a biossíntese da tiamina. Por outro lado, como a DOXP sintase é dependente de tiamina, uma alteração na biossíntese desse cofator poderia levar a modificações na própria via MEP. Por esse motivo, a fosmidomicina foi usada para inibir a DOXP *redutoisomerase* e avaliar o efeito sobre a biossíntese da tiamina. Esse ponto é importante, para o entendimento do(s) mecanismo(s) de regulação das enzimas na via MEP em *P. falciparum*.

Observou-se nos parasitas tratados com a mesma concentração de droga utilizada por Cassera *et al.* (43) de 1 μ M e marcados com [1-¹⁴C] acetato de sódio, que no estágio esquizonte há inibição da tiamina pirofosfato e uma maior inibição da tiamina monofosfato. A forma de tiamina livre não foi analisada, devido a incerteza da sua detecção. Este resultado sugere que a DOXP participa da biossíntese do tiazol na formação da tiamina. Entretanto, novas marcações metabólicas com a [2-¹⁴C] DOXP devem ser realizadas.

Parasitas tratados com fosmidomicina e marcados com L-[³⁵S] cisteína, outro precursor da biossíntese de tiamina, também foram analisados, porém os resultados não foram reprodutíveis, em distintos experimentos. Num primeiro experimento apenas a forma de tiamina pirofosfato foi inibida, já em um segundo experimento, apenas a forma de tiamina monofosfato foi inibida, e a tiamina livre não foi analisada.

O efeito da bacimetrina sobre a biossíntese de tiamina foi observado em bactérias. Observou-se a inibição no crescimento desses organismos com reversão do efeito quando as culturas foram suplementadas com tiamina.

Em *P. falciparum*, o efeito da bacimetrina também foi analisado. Foi demonstrado que o gene ThiD de *P. falciparum* tem um *turnover* 60% maior para bacimetrina do que para tiamina. O ensaio de suplementação, em culturas de *P. falciparum*, mantidas em meio com concentração de bacimetrina sessenta vezes superior ao do HMP, não demonstrou a inibição do crescimento e desenvolvimento parasitário (85), resultados contrastantes aos encontrados em ensaios similares para bactérias. Esses dados não excluem uma importante função da biossíntese de HMP na sobrevivência de *P. falciparum*, pois a não ação antiplasmodial da bacimetrina pode ser devida à sua baixa incorporação. Dessa forma, não é descartada a hipótese de se fazer modificações estruturais na molécula de bacimetrina para que ela possa ser mais eficiente na inibição da biossíntese de tiamina em *P. falciparum*.

Várias tentativas em se obter ou sintetizar quimicamente a bacimetrina foram realizadas, sem sucesso. Partimos para a síntese de análogo(s), o(s) qual(is) poderia(m) ser explorado(s) como droga(s) antimalárica(s). Um análogo da bacimetrina, o 3CIDHP (3,3,3-tricloro-4,5,dihidro-pirimidona) foi sintetizado pelo grupo do Prof. Ernani Pinto (FCF, USP).

O valor de IC₅₀ foi calculado, esse valor quando comparado ao MIC (concentração mínima inibitória) de *E. coli* foi similar (50 µM) (79). Parasitas foram tratados com 3CIDHP e marcados com o precursor [1-¹⁴C] acetato de sódio, por este ter apresentado melhores resultados prévios. Observou-se inibição da forma de tiamina pirofosfato, e uma inibição maior de 50% para a forma de tiamina monofosfato; a forma livre não foi analisada (**Tabela 2**). Salienta-se que, o análogo da bacimetrina está inibindo a biossíntese da vitamina B₁, embora não se saiba qual seria seu mecanismo de ação.

Parasitas tratados como o análogo 3CIDHP também foram marcados com L-[³⁵S] cisteína, e os resultados foram conflitantes e inconclusivos.

Para observar se a droga (3CIDHP) apresentava efeito sobre a biossíntese protéica, avaliou-se parasitas tratados, ao longo de 48 h, com diferentes concentrações de 3CIDHP e, posteriormente marcados com L-[³⁵S] metionina (**Tabela 3**). Os resultados indicaram que o efeito do 3CIDHP é específico para a biossíntese de tiamina foi, pois a síntese protéica não é alterada nos parasitas tratados com 3CIDHP.

A identificação e a caracterização química da biossíntese de tiamina nos estágios intreritrocitários de *P. falciparum* abre novas possibilidades de estudos que objetivam o bloqueio do desenvolvimento parasitário. Por ser uma via exclusiva do parasita, representa

interessante alvo para a ação de quimioterápicos para o controle e/o combate de parasitas apicomplexas.

6 CONCLUSÕES

6.1- A via de biossíntese de tiamina encontra-se ativa em todos os estágios intraeritrocitários de *P. Falciparum*;

6.2- O aminoácido tirosina pode ser o precursor da biossíntese de tiamina e não glicina como em outros organismos;

6.3- O enxofre presente na molécula de tiamina pode ser originado da cisteína e não da metionina;

6.4- A fosmidomicina e o 3CIDHP (análogo da bacimetrina) inibem a biossíntese de tiamina no estágio de esquizonte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization WH. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO Press; 2006.
2. WHO. The use of antimalarial drugs, report of an informal consultation. WHO/CDS/RBM/2001.4. Geneva 2001.
3. Bhattacharjee AK, Geyer JA, Woodard CL, Kathcart AK, Nichols DA, Prigge ST, et al. A three-dimensional in silico pharmacophore model for inhibition of Plasmodium falciparum cyclin-dependent kinases and discovery of different classes of novel Pfmrk specific inhibitors. *J Med Chem.* 2004 Oct 21;47(22):5418-26.
4. Go ML. Novel antiplasmodial agents. *Med Res Rev.* 2003 Jul;23(4):456-87.
5. Knockaert M, Greengard P, Meijer L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Sep;23(9):417-25.
6. Waters NC, Geyer JA. Cyclin-dependent protein kinases as therapeutic drug targets for antimalarial drug development. *Expert Opin Ther Targets.* 2003 Feb;7(1):7-17.
7. Waters NC, Woodard CL, Prigge ST. Cyclin H activation and drug susceptibility of the Pfmrk cyclin dependent protein kinase from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Mar 15;107(1):45-55.
8. Krungkrai J. The multiple roles of the mitochondrion of the malarial parasite. *Parasitology.* 2004 Nov;129(Pt 5):511-24.
9. Belgareh-Touze N, Corral-Debrinski M, Launhardt H, Galan JM, Munder T, Le Panse S, et al. Yeast functional analysis: identification of two essential genes involved in ER to Golgi trafficking. *Traffic.* 2003 Sep;4(9):607-17.
10. Krungkrai J, Kanchanarithsak R, Krungkrai SR, Rochanakij S. Mitochondrial NADH dehydrogenase from Plasmodium falciparum and Plasmodium berghei. *Exp Parasitol.* 2002 Jan;100(1):54-61.
11. Vaidya AB. Mitochondrial and plastid functions as antimalarial drug targets. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2004 Mar;4(1):11-23.
12. Rodriguez-Concepcion M. The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr Pharm Des.* 2004;10(19):2391-400.
13. Cheresch P, Harrison T, Fujioka H, Haldar K. Targeting the malarial plastid via the parasitophorous vacuole. *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):16265-77.
14. Fichera ME, Roos DS. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature.* 1997 Nov 27;390(6658):407-9.

15. Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, et al. Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2003 Jan 31;299(5607):705-8.
16. Ralph SA, D'Ombrain MC, McFadden GI. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resist Updat*. 2001 Jun;4(3):145-51.
17. Waller RF, Ralph SA, Reed MB, Su V, Douglas JD, Minnikin DE, et al. A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan;47(1):297-301.
18. Proteau PJ. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorg Chem*. 2004 Dec;32(6):483-93.
19. Sacchettini JC, Poulter CD. Creating isoprenoid diversity. *Science*. 1997 Sep 19;277(5333):1788-9.
20. Tarshis LC, Proteau PJ, Kellogg BA, Sacchettini JC, Poulter CD. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):15018-23.
21. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990 Feb 1;343(6257):425-30.
22. Flesch G, Rohmer M. Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur J Biochem*. 1988 Aug 1;175(2):405-11.
23. 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.
24. 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.
25. Himmerdrik k, Kennedy, IA., Hill, RE., Sayer, BG., Spenser, ID., . Biosynthesis of vitamins B₁ and B₆ in *Escherichia coli*: concurrent incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into thiamin and pyridoxol. *J Chem Soc Chem Commun*. 1996:1187-8.
26. Cane DE, Du S, Robinson JK, Hsiung Y, Spenser ID. Biosynthesis of vitamin B₆: Enzymatic conversion of 1-deoxy--xylulose-5-phosphate to pyridoxol phosphate. *J Am Chem Soc*. 1999 25 August 1999;121(33):7722-3.

27. Cane DE, Du S, Spenser ID. Biosynthesis of vitamin B6: Origin of the oxygen atoms of pyridoxol phosphate. *J Am Chem Soc.* 2000 3 May 2000;122(17):4213-4.
28. 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.
29. Kuzuyama T, Takahashi S, Watanabe H, Seto H. Direct Formation of 2-C-Methyl-d-Erythritol 4-Phosphate from 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate by 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, a New Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway to Isopentenyl Diphosphate. *Tetrahedron Lett.* 1998 18 June 1998;39(25):4509-12.
30. 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.
31. 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.
32. Zeidler J, Schwender J, Mueller C, Lichtenthaler HK. The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. *Biochem Soc Trans.* 2000 Dec;28(6):796-8.
33. Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S, Seto H. Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy--xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 1998 22 October 1998;39(43):7913-6.
34. Boucher Y, Doolittle WF. The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol.* 2000 Aug;37(4):703-16.
35. Lichtenthaler HK. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999 June;50:47-65.
36. Flesh G, Rohmer, M. Prokariotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and novel type of carbon/ carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur J Biochem.* 1988;175:405-11.
37. Kuzuyama T, Takagi M, Takahashi S, Seto H. Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J Bacteriol.* 2000 Feb;182(4):891-7.
38. Takagi M, Kuzuyama T, Takahashi S, Seto H. A gene cluster for the mevalonate pathway from *Streptomyces* sp. Strain CL190. *J Bacteriol.* 2000 Aug;182(15):4153-7.

39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Chakrabarti D, Da Silva T, Barger J, Paquette S, Patel H, Patterson S, et al. Protein farnesyltransferase and protein prenylation in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):42066-73.
43. 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.
44. Rohdich F, Eisenreich W, Wungsintaweekul J, Hecht S, Schuhr CA, Bacher A. Biosynthesis of terpenoids. 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*. 2001 Jun;268(11):3190-7.
45. Lois LM, Campos N, Putra SR, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A. Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2105-10.
46. Windaus A. Darstellung von kristallisiertem antineurischem vitamins aus hefe. *Nachr Ges Wiss Gottingen*. 1931.
47. Williams RR, and Cline, J.K. Synthesis of vitamin B1. *JAmChemSoc*. 1936;58:1504.
48. Lohmann K, Schuster, P. On cocarboxylase. *Naturwissenschaften*. 1937;25.
49. Schellenberg A. Sixty years of thiamine diphosphate biochemistry. *Biochem BiophysActa*. 1998;1385:177-86.
50. Burdick D. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Tecnology. (edHowe-Grant, M). 1998;25:152-71.
51. Fenster R. Feed Additives: A Global Market Study PJB Publications. 2001.

52. Singleton CK, Martin PR. Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Curr Mol Med*. 2001 May;1(2):197-207.
53. Begley TP, Downs DM, Ealick SE, McLafferty FW, Van Loon AP, Taylor S, et al. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol*. 1999 Apr;171(5):293-300.
54. Wightman R, Meacock PA. The THI5 gene family of *Saccharomyces cerevisiae*: distribution of homologues among the hemiascomycetes and functional redundancy in the aerobic biosynthesis of thiamin from pyridoxine. *Microbiology*. 2003 Jun;149(Pt 6):1447-60.
55. Spenser ID W, RL. Biosynthesis of vitamin B1: an instance of biochemical diversity. *Angew Chem Int Ed Eng*. 1997;36:1032-46.
56. Yamada K, Morisaki M, Kumaoka H. Different biosynthetic pathways of the pyrimidine moiety of thiamin in procaryotes and eucaryotes. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Mar 15;756(1):41-8.
57. Tazuya K, Morisaki M, Yamada K, Kumaoka H, Saiki K. Biosynthesis of thiamin. Different biosynthetic routes of the thiazole moiety of thiamin in aerobic organisms and anaerobic organisms. *Biochem Int*. 1987 Jan;14(1):153-60.
58. Settembre E, Begley TP, Ealick SE. Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. *Curr Opin Struct Biol*. 2003 Dec;13(6):739-47.
59. Julliard JH, Douce R. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 15;88(6):2042-5.
60. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*. 2002 Oct 31;419(6910):952-6.
61. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet*. 2004 Jan;20(1):44-50.
62. DeMoll E, Shive W. Determination of the metabolic origin of the sulfur atom in thiamin of *Escherichia coli* by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Oct 15;132(1):217-22.
63. Tazuya K, Yamada K, Nakamura K, Kumaoka H. The origin of the sulfur atom of thiamin. *Biochim Biophys Acta*. 1987 Apr 16;924(1):210-5.
64. David S, Estramareix, B., Fischer, J.C., Therisod, M. The biosynthesis of thiamine. Synthesis of [1,1,1,5-2H4]-1-deoxy-D-threo-2-pentulose and incorporation of this sugar in biosynthesis of thiazole by *Escherichia coli* cells. *J ChemSoc, Perkin TransL*, . 1982:2131.

65. Himmerdirk k, Kennedy, IA., Hill, RE., Sayer, BG., Spenser, ID., . Biosynthesis of vitamins B₁ and B₆ in *Escherichia coli*: concurrent incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into thiamin and pyridoxol. J Chem Soc Chem Commun. 1996:1187-8.
66. Estramareix B, Therisod M. [Tyrosine as a factor of biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*]. Biochim Biophys Acta. 1972 Jul 19;273(2):275-82.
67. Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. J Biol Chem. 2002 Dec 13;277(50):48949-59.
68. Estramareix B, David S. Conversion of 5-aminoimidazole ribotide to the pyrimidine of thiamin in enterobacteria: study of the pathway with specifically labeled samples of riboside. Biochim Biophys Acta. 1990 Aug 17;1035(2):154-60.
69. Estramareix B, Therisod, M. . Biosynthesis of thiamine: 5-aminoimidazole ribotide as the precursor of all the carbon atoms of the pyrimidine moiety. J Am Chem Soc. 1984;106:3857-60.
70. Himmerdirk k, Sayer, BG., Spenser, ID.,. Comparative biogenetic anatomy of vitamin B₁: A ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of thiamin in *Escherichia coli* and in *Saccharomyces cerevisiae*. J Am Chem Soc. 1998;120:3581-9.
71. Zhang Y, Taylor SV, Chiu HJ, Begley TP. Characterization of the *Bacillus subtilis* thiC operon involved in thiamine biosynthesis. J Bacteriol. 1997 May;179(9):3030-5.
72. Praekelt UM, Byrne KL, Meacock PA. Regulation of THI4 (MOL1), a thiamine-biosynthetic gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 1994 Apr;10(4):481-90.
73. Hohmann S, Meacock PA. Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. Biochim Biophys Acta. 1998 Jun 29;1385(2):201-19.
74. Nosaka K, Kaneko Y, Nishimura H, Iwashima A. Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, THI80, from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 1993 Aug 15;268(23):17440-7.
75. Jurgenson CT, Chatterjee A, Begley TP, Ealick SE. Structural insights into the function of the thiamin biosynthetic enzyme Thi4 from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry. 2006 Sep 19;45(37):11061-70.
76. Chatterjee A, Jurgenson CT, Schroeder FC, Ealick SE, Begley TP. Biosynthesis of thiamin thiazole in eukaryotes: conversion of NAD to an advanced intermediate. J Am Chem Soc. 2007 Mar 14;129(10):2914-22.

77. Tazuya K, Azumi C, Yamada K, Kumaoka H. Pyrimidine moiety of thiamin is biosynthesized from pyridoxine and histidine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Int*. 1995 Jul;36(4):883-8.
78. Lawhorn BG, Gerdes SY, Begley TP. A genetic screen for the identification of thiamin metabolic genes. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):43555-9.
79. Reddick JJ, Saha S, Lee J, Melnick JS, Perkins J, Begley TP. The mechanism of action of bacimethrin, a naturally occurring thiamin antimetabolite. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001 Sep 3;11(17):2245-8.
80. Singer I. Tissue thiamine changes in rats with experimental trypanosomiasis or malaria. *Exp Parasitol*. 1961 Nov;11:391-401.
81. Singer I, Trager W. Coenzyme A changes in liver, spleen and kidney of rats with infections of *Plasmodium berghei*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956 Feb;91(2):315-8.
82. Krishna S, Taylor AM, Supanaranond W, Pukrittayakamee S, ter Kuile F, Tawfiq KM, et al. Thiamine deficiency and malaria in adults from southeast Asia. *Lancet*. 1999 Feb 13;353(9152):546-9.
83. Mayxay M, Taylor AM, Khanthavong M, Keola S, Pongvongsa T, Phompida S, et al. Thiamin deficiency and uncomplicated falciparum malaria in Laos. *Trop Med Int Health*. 2007 Mar;12(3):363-9.
84. Bozdech Z, Ginsburg H. Data mining of the transcriptome of *Plasmodium falciparum*: the pentose phosphate pathway and ancillary processes. *Malar J*. 2005 Mar 18;4(1):17.
85. Wrenger C, Eschbach ML, Muller IB, Laun NP, Begley TP, Walter RD. Vitamin B1 de novo synthesis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* depends on external provision of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine. *Biol Chem*. 2006 Jan;387(1):41-51.
86. Eschbach ML, Muller IB, Gilberger TW, Walter RD, Wrenger C. The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* expresses an atypical N-terminally extended pyrophosphokinase with specificity for thiamine. *Biol Chem*. 2006 Dec;387(12):1583-91.
87. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976 Aug 20;193(4254):673-5.
88. Pasvol G, Wilson RJ, Smalley ME, Brown J. Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978 Feb;72(1):87-8.
89. 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.

90. 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.
91. Lynch PL, Young IS. Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2000 Jun 9;881(1-2):267-84.
92. Enos-Berlage JL, Downs DM. Biosynthesis of the pyrimidine moiety of thiamine independent of the PurF enzyme (Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase) in *Salmonella typhimurium*: incorporation of stable isotope-labeled glycine and formate. *J Bacteriol.* 1999 Feb;181(3):841-8.
93. Mancinelli R, Ceccanti M, Guiducci MS, Sasso GF, Sebastiani G, Attilia ML, et al. Simultaneous liquid chromatographic assessment of thiamine, thiamine monophosphate and thiamine diphosphate in human erythrocytes: a study on alcoholics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003 Jun 15;789(2):355-63.
94. Kirchmeier RL, Upton RP. Simultaneous determination of niacin, niacinamide, pyridoxine, thiamine, and riboflavin in multivitamin blends by ion-pair high-pressure liquid chromatography. *J Pharm Sci.* 1978 Oct;67(10):1444-6.
95. Tallaksen CM, Bohmer T, Karlsen J, Bell H. Determination of thiamin and its phosphate esters in human blood, plasma, and urine. *Methods Enzymol.* 1997;279:67-74.
96. Lewin LM, Wei R. Microassay of thiamine and its phosphate esters after separation by paper chromatography. *Anal Biochem.* 1966 Jul;16(1):29-35.
97. Pinto E, Pedersen M, Snoeijs P, Van Nieuwerburgh L, Colepiccolo P. Simultaneous detection of thiamine and its phosphate esters from microalgae by HPLC. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 22;291(2):344-8.
98. Linnett PE, Walker J. Biosynthesis of thiamine. Incorporation experiments with ¹⁴C-labelled substrates and with (¹⁵N)glycine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 1968 Sep;109(2):161-8.
99. Maundrell K. nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem.* 1990 Jul 5;265(19):10857-64.
100. Kumaoka H. Incorporation of Radioactive Sulfur of S³⁵-Labelled L-Cystine and L-Methionine into the Thiazole Moiety of Thiamine. *J Vitaminol (Kyoto).* 1963 Sep 10;26:188-90.
101. Johnson DB, Howells DJ, Goodwin TW. Observations on the biosynthesis of thiamine in yeast. *Biochem J.* 1966 Jan;98(1):30-7.
102. Tomlinson RV, Kuhlman DP, Torrence PF, Tieckelmann H. Precursors of the pyrimidine and thiazole rings of thiamine. *Biochim Biophys Acta.* 1967 Oct 9;148(1):1-10.

103. Bellion E, Kirkley DH. The origin of the sulfur atom in thiamine. *Biochim Biophys Acta*. 1977 Mar 29;497(1):323-8.

104. Muller S, Kappes B. Vitamin and cofactor biosynthesis pathways in *Plasmodium* and other apicomplexan parasites. *Trends Parasitol*. 2007 Mar;23(3):112-21.