



**JOÃO PEDRO NOGUEIRA
MARQUES**

**IDENTIFICAÇÃO DE DETERMINANTES
DE RESISTÊNCIA EM *P. FALCIPARUM***



**JOÃO PEDRO NOGUEIRA
MARQUES**

**IDENTIFICAÇÃO DE DETERMINANTES
DE RESISTÊNCIA EM *P. FALCIPARUM***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação do Professor Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria de Fátima Carvalho Nogueira, Investigadora auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

O júri

Presidente

Prof. Dra. Rita Maria Pinho Ferreira
professora auxiliar convidada do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Prof. Dr. João Alexandre Guarita da Silva Rodrigues
investigador auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da
Universidade Nova de Lisboa

Prof. Dr. Rui Miguel Pinheiro Vitorino
investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de
Aveiro

Prof. Dra. Maria de Fátima Carvalho Nogueira
investigadora auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da
Universidade Nova de Lisboa

Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta Tese de Mestrado.

Ao meu orientador, Professor Doutor Rui Vitorino, agradeço a competência, a sabedoria, a boa disposição e as críticas construtivas, que me estimularam a crescer científica e pessoalmente, ao longo da elaboração deste trabalho. Agradeço ainda, e especialmente, a inesgotável paciência demonstrada mesmo quando eu não a merecia.

À Doutora Fátima Nogueira, pela co-orientação desta tese e pelos ensinamentos essenciais para a compreensão de todo o processo de cultura e avaliação das minhas amostras.

Ao grupo de espetrometria de massa, pela disponibilidade, bom ambiente e alegria constantes.

Aos meus colegas de mestrado, com quem compartilhei, mais de perto, dúvidas, angústias e conhecimentos. A eles agradeço a ajuda, o companheirismo e a amizade que me deram ao longo deste processo.

Aos meus colegas de casa pelo apoio incondicional e pelo bom ambiente que sempre me proporcionaram.

À Cátia e à Inês, pela inestimável ajuda dada, pelo incentivo e claro pela amizade.

Aos meus pais, irmão e a toda a minha família, pelo apoio incondicional e carinho que sempre me dedicaram, mesmo nos meus momentos mais casmurros e nos momentos mais difíceis.

À Fabiana, pelo apoio em todas as fases deste mestrado, pela paciência e por todas as sugestões e discussões. Acima de tudo por estar sempre ao meu lado.

Palavras-chave

Malária, *Plasmodium falciparum*, resistência a antimaláricos, mefloquine, proteómica

Resumo

O presente estudo teve como objetivo a análise de possíveis determinantes de resistência por parte do *Plasmodium falciparum* ao fármaco antimalárico mefloquina. Para tal foi utilizada a estirpe W2, resistente à cloroquina e sensível à mefloquina, e uma estirpe isogénica W2mef, derivada de W2 e obtida por pressão seletiva em meio rico em mefloquina. Procedeu-se a um fracionamento subcelular e analisaram-se os extractos obtidos, com recurso a marcação com isótopos, O^{18} e iTRAQ, seguida de LC MS/MS MALDI, tendo sido identificadas 248 proteínas, sendo 76 de *P. falciparum* e 172 de *Homo sapiens*. Verificaram-se alterações na expressão proteómica de 10 proteínas de *P. falciparum* e 7 de *Homo sapiens*.

A análise da atividade proteolítica por zimografia, revelou a diferenças relevantes de atividade proteásica nas amostras de W2mef, tendo sido identificada a aminopeptidase, “M1 family aminopeptidase”.

Através dos resultados a atividade proteolítica em conjugação com análise bioinformática verificou-se que a protease identificada, tem um papel relevante na via de degradação da hemoglobina, estabelecendo interações indiretas com proteínas que se sabe estarem envolvidas no processo de obtenção de a.a., fundamental para a sobrevivência e desenvolvimento parasitário.

Em suma as significativas diferenças de atividade proteolítica das amostras com a estirpe resistente e o facto da “M1 family aminopeptidase” estar associada a um processo vital para o desenvolvimento do parasita, faz com que esta protease possa ser apontada como o novo determinante para o desenvolvimento de novos fármacos, nomeadamente baseados em inibidores da PfA-M1.

Keywords

Malaria, *Plasmodium falciparum*, antimalaric resistance, mefloquine, proteomics

Abstract

The aim of the present study was to analyze resistance determinants of *Plasmodium falciparum* to the mefloquine antimalarial drug. With this propose was used a W2 strain, known to be chloroquine resistant and mefloquine sensitive, and a isogenic W2mef strain, derived from W2 and obtained by selective pressure on a mefloquine rich medium. Parasitic proteins were extracted with a optimized and aggressive extraction buffer, follow of cellular fractionation and ultracentrifuge. The protein profile of the samples was analyzed using labeling with O¹⁸ and iTRAQ, followed by LC MS/MS MALDI. Were identified 248 proteins, 76 of *P. falciparum* and 172 of *Homo sapiens* and has been identifying changes in the expression of 10 parasitic and 7 human proteins.

The proteolytic activity analysis by zimography reveals significant differences in protease activity in the samples of W2mef, and has been identified an aminopeptidase, the "M1 family aminopeptidase". Through the results of the proteolytic activity in conjunction with bioinformatics analysis reveals that the identified protease, plays a central role in the hemoglobin degradation pathway, establishing indirect interactions with proteins known to be involved in the obtaining of a.a., which is fundamental to parasite survival and development.

In conclusion, the significant proteolytic activity differences of resistant strain samples and the fact that "M1 family aminopeptidase" is being associated with a vital process to the parasite development, makes this protease, the new possible determinant for the development of new drugs, in particular, based in PfA-M1 inhibitors.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas	vii
I. Introdução	3
II. Revisão Bibliográfica	7
II.1. Doenças Parasitárias.....	7
II.2. <i>Plasmodium falciparum</i>	8
II.3. Processo de infecção	9
II.4. Antimaláricos	11
II.4.1. Mecanismos de Ação	13
II.4.2. Resistência aos antimaláricos	16
II.4.2.1. Degradação da hemoglobina	17
II.4.2.2. Interações membranares	19
II.4.2.3. Transportadores membranares.....	22
II.5. Identificação de determinantes de resistência	23
III. Objetivos.....	29
IV. Material e Métodos	33
IV.1. Desenho Experimental	33
IV.2. Fase inicial – IHMT UNL	34
IV.2.1. Caracterização da amostra - <i>Plasmodium falciparum in vitro</i>	34
IV.2.2. Cultura do <i>Plasmodium falciparum</i>	34
IV.2.3. Ensaio Toxicológico	34
IV.2.4. Extração Parasitária.....	34
IV.3. Análise Proteômica – DQ UA.....	35
IV.3.1. Extração Proteica.....	35
IV.3.2. Separação Celular	35
IV.3.3. Determinação da Concentração de Proteína total.....	35

IV.3.4.	Separação das proteínas por eletroforese SDS - PAGE	35
IV.3.5.	Marcação com O ¹⁸	35
IV.3.6.	Marcação com iTRAQ®	36
IV.3.7.	Zimografia por eletroforese SDS – PAGE	36
IV.3.8.	Coloração com Comassie Coloidal e Nitrato de Prata.....	37
IV.3.9.	Digestão Triptica <i>in-gel</i>	37
IV.3.10.	Separação proteica por LC	38
IV.3.11.	Análise por Espectrometria de Massa.....	38
IV.3.12.	Análise dos espectros obtidos	38
V.	Apresentação de Resultados.....	43
V.1.	Identificação de proteínas	43
V.2.	Comparação da expressão proteica	54
V.3.	Atividade Proteolítica.....	56
V.3.1.	Determinação da actividade proteolítica	56
VI.	Discussão	61
VII.	Conclusão.....	69
VIII.	Referências Bibliográficas	73
IX.	Anexos.....	III

ÍNDICE DE FIGURAS

Fíg. 1 - Distribuição da malária no mundo [1].....	7
Fíg. 2 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> , principal agente de transmissão da malária severa no mundo. O seu ciclo de vida é bastante complexo e contempla um grande número de estados de desenvolvimento, duas fases, uma assexuada e outra sexuada, e ainda inúmeros fenómenos de invasão-replicação-invasão. Imagem adaptada de [25].....	10
Fíg. 3 - Representação do método de acção dos agentes regularmente utilizados no tratamento da malária. Podemos ver que os agentes antimaláricos mais específicos, como a mefloquina, a artemisinina e a cloroquina atuam no vacúolo digestivo, enquanto que os restantes agentes também utilizados no tratamento de outras patologias têm outros alvos como o citosol (antifolatos) ou o apicoplasto (antibióticos) (Adaptado de [25])	14
Fíg. 4 - Via da degradação da hemoglobina no interior no vacúolo parasitário do <i>Plasmodium falciparum</i> (Adaptado de [67])	18
Fíg. 5 - Desenho experimental (SmartDraw)	33
Fíg. 6 - Classificação das proteínas de (a) <i>P. Falciparum</i> e (b) <i>Homo Sapiens</i> identificadas, por função molecular, com base no <i>Gene ontology annotation</i>	50
Fíg. 7 - Classificação das proteínas de (a) <i>P. falciparum</i> e (b) <i>Homo Sapiens</i> identificadas, por processo biológico, com base no <i>Gene ontology annotation</i>	51
Fíg. 8 - Classificação das proteínas de (a) <i>P. falciparum</i> e (b) <i>Homo Sapiens</i> identificadas, por classe proteica (baseada na classificação do <i>Panther</i>).....	52
Fíg. 9 - Classificação das proteínas de (a) <i>P. falciparum</i> e (b) <i>Homo Sapiens</i> identificadas, por localização subcelular (baseada na informação da base de dados <i>Uniprot</i>)	53
Fíg. 10 - Zimograma realizado com o objectivo de verificar a actividade das proteases presentes nas amostras analisadas. De P1 a P5 estão identificadas as bandas retiradas para análise por MS/MS MALDI. À direita é apresentada a intensidade das bandas observadas, sendo que a cor vermelha (-) corresponde à amostra Wmef K, a cor verde (-) à Wmef S, a cor amarela (-) à W2 K e a cor azul (-) à W2 S. Todas as amostras foram realizadas em duplicado.....	56
Fíg. 11 - Densidade óptica das bandas correspondentes à proteína "M1 family aminopeptidase" nas amostras Wmef K, Wmef S, W2 K e W2 S	57
Fíg. 12 - Domínio funcional da "Histone H2A", dados <i>Pfam</i> [142]	62
Fíg. 13 - Alinhamento realizado na base de dados Uniprot [136] entre a "Histone H2A" de <i>P. falciparum</i> e a "Histone H2AX" de <i>Homo sapiens</i> de forma a verificar a homologia. A vermelho encontra-se, salientada a sequência identificada por MS/MS MALDI e que deu origem à identificação da "Histone H2A"	62

Fíg. 14 – Estrutura da “M1-family aminopeptidase” com representação dos 4 domínios (A), do domínio catalítico (B) e da-estrutura do centro ativo (C) [139].64

Fíg. 15 - Esquema das interações proteína-proteína, obtido através do plug-in Apid do Cytoscape [154]. Legenda: ● – HeatShock Protein 70kDa; ● – Proteases associadas à via de degradação da hemoglobina (PfA-M1, Cathepsin C e Falcilysin; ● – intermediários na ligação das proteases (●);● – proteínas presentes na rede e identificadas no corrente trabalho.65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Listagem das proteínas de *P. falciparum* e *Homo sapiens* identificadas por MS/MS MALDI após marcação com O18 e iTRAQ.....43

Tabela 2 - Diferenças de expressão proteica, estatisticamente relevantes, obtidas através da análise por MS/MS MALDI das amostras marcadas com O¹⁸ e iTRAQ – *Plasmodium falciparum*. Legenda: ↑sub-expressa, 0 sem variações significativas e ↓sob expressa.....54

Tabela 3 - Diferenças de expressão proteica, estatisticamente relevantes, obtidas através da análise por MS/MS MALDI das amostras marcadas com O¹⁸ e iTRAQ – *Homo sapiens*. Legenda: ↑sub-expressa, 0 sem variações significativas e ↓sob expressa.....55

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	“ATP-binding cassette”
ACTs	Terapias combinadas baseadas em artemisinina
ART	Artemisinina
BSA	Albumina de s�rum de bovino
CQ	Cloroquina
CRT	Proteína transmembranar do vacúolo digestivo
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DO	Densidade �tica
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSH	Glutationa
GSSH	Glutationa na forma oxidada
iTRAQ [®]	“Isobaric tags for relative and absolute quantitation”
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
MEF	Mefloquina
MSP	Proteína superficial de membrana de meroz�ito
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfA-M1</i>	“M1 family aminopeptidase”
<i>pfcr1</i>	Gene precursor da proteína transportador resistente � cloroquina
PfCRT	Transportador resistente � cloroquina
<i>pfmdr1</i>	Gene precursor da proteína resistente a múltiplas drogas
PfSUB1	Subtilisina1
MDR1	Proteína resistente a múltiplas drogas
Pgps	Glicoprote�na P Humana
ROS	Esp�cies reativas de oxig�nio
SERA	Antig�nios repetidos de serina
SNPs	“Single nucleotide polymorphisms”
SILAC	“stable isotope labeling adaptation with aminoacids in cell culture”
SP	Sulfadoxina-Pirimetamina
TFA	�cido trifluoro acético
TMT	Tandem mass tags
TOF	Tempo de voo
VD	Vacúolo digestivo
VP	Vacúolo do parasitóforo

I. Introdução

I. Introdução

A malária é, atualmente, a doença parasitária tropical mais mortal do panorama mundial. Todos os anos aproximadamente metade da população mundial encontra-se em risco de contrair a doença, trezentos a quinhentos milhões de pessoas são afetadas e entre um e dois milhões, especialmente crianças com menos de cinco anos de idade nos países em vias de desenvolvimento da África subsariana, morrem devido à infeção por *Plasmodium falciparum* transmitido pelo mosquito do género Anopheles [1-5]. A malária é de tal modo mortal que em 2000 as Nações Unidas definiram a sua erradicação como um dos objetivos do milénio [6].

Sabe-se que atualmente existem cinco espécies de *Plasmodium* capazes de transmitir a doença a seres humanos, destas o *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) é o parasita responsável por aproximadamente 90% das mortes causadas [2]. Quando na corrente sanguínea os parasitas começam por invadir os eritrócitos do hospedeiro, num ciclo de invasão-replicação-invasão que muitas vezes leva a estados febris característicos e à consequente morte do hospedeiro [5].

Apesar de ser possível reduzir esta “praga”, com a utilização de inseticidas no interior das casas e de redes mosquiteiras tratadas com inseticidas de longa duração, estas medidas por si só não têm sido eficazes. A ausência de uma vacina eficaz leva a que a utilização de drogas antimaláricas no tratamento dos pacientes seja inevitável para a redução da transmissão da doença [5]. As cloroquinas e a sulfadoxina-pirimetamina foram durante largos anos as drogas mais utilizadas no tratamento, contudo o aparecimento de focos de resistência e o desenvolvimento da investigação levou a que a primeira linha de tratamento evoluísse para terapias combinadas baseadas em artemisinina (ACTs). Estas são fáceis de aplicar, rápidas a atuar e fiáveis, no entanto, começam a aparecer indícios de resistência [7, 8]. Esta situação torna prioritário o desenvolvimento de novos fármacos, mas mais do que soluções provisórias, torna-se urgente perceber como se processa o desenvolvimento do parasita no vetor, a invasão do hospedeiro humano pelo parasita, o modo de atuação dos diferentes fármacos e o desenvolvimento de resistência aos mesmos.

O foco deste estudo centrou-se no desenvolvimento da resistência por parte de *P. falciparum* às atuais terapias utilizadas mais particularmente à mefloquina (MEF), um derivado de quinina utilizado em ACTs.

Nos últimos anos foi sugerido, em diversos estudos realizados no sudeste asiático, que a P-glicoproteína (PfMDR1) de *P. falciparum* seria a principal responsável pela resistência parasitária à MEF e a outros antimaláricos atualmente utilizados, tendo sido inclusivamente referida como um ótimo indicador de falência terapêutica. No entanto, estudos realizados em África e na Ásia, em locais onde a resistência à MEF está largamente disseminada, apresentam conclusões divergentes, com estudos que não demonstram

ligações entre a aquisição de resistência à MEF e PfMDR1, sugerindo assim que o mecanismo por detrás da resistência a este fármaco tenha outra explicação [9, 10].

É com base nestes dados que surge este estudo, procurando a base proteómica responsável pela capacidade de adaptação do *P. falciparum* às drogas antimaláricas correntemente utilizadas, mais concretamente à MEF que é usualmente combinada com derivados de artemisinina como primeira linha de tratamento para infeções causadas por *P. falciparum*. Para tal, recorreu-se a culturas celulares *in vitro*, métodos de extração otimizados, avaliação da atividade proteolítica, análise proteómica avançada com recurso a marcação por iTRAQ's e O¹⁸ e análise por LC – MALDI MS/MS.

II. Revisão Bibliográfica

II. Revisão Bibliográfica

II.1. Doenças Parasitárias

As doenças transmitidas através de parasitas permanecem como das mais devastadoras e fustigantes para os seres humanos e afetam atualmente um quarto da população mundial. Apesar de muito associadas aos países subdesenvolvidos e às suas condições higiénicas e financeiras, algumas delas são especialmente perigosas nos países desenvolvidos ou industrializados. Estas doenças são muitas vezes crónicas, diminuindo drasticamente a qualidade e esperança de vida dos pacientes afetados [11].

A chave para a compreensão destas doenças é o estudo da interação entre o hospedeiro e o parasita. Esta complexa interação tem evoluído ao longo dos últimos milénios e está centrada na resposta imune do hospedeiro à infecção causada pelo parasita [11]. Esta relação é de tal modo complexa que se sabe atualmente que, por vezes os mecanismos de defesa do hospedeiro protegem-no do parasita e conseqüentemente da infeção, enquanto que noutros casos, os mesmos mecanismos de defesa, propiciam o desenvolvimento do parasita. Estas considerações são particularmente importantes aquando do desenvolvimento de novos tratamentos em especial vacinas, sendo que o essencial passa por potenciar a resposta imunitária que protege o hospedeiro do parasita e não a que estimula o seu desenvolvimento [12].

A diversidade parasitária é grande, existindo inclusive muitos parasitas que não causam doenças ou que apenas as causam indiretamente, através da produção de toxinas. No entanto, a grande maioria é prejudicial para a população humana. O mais grave, e que

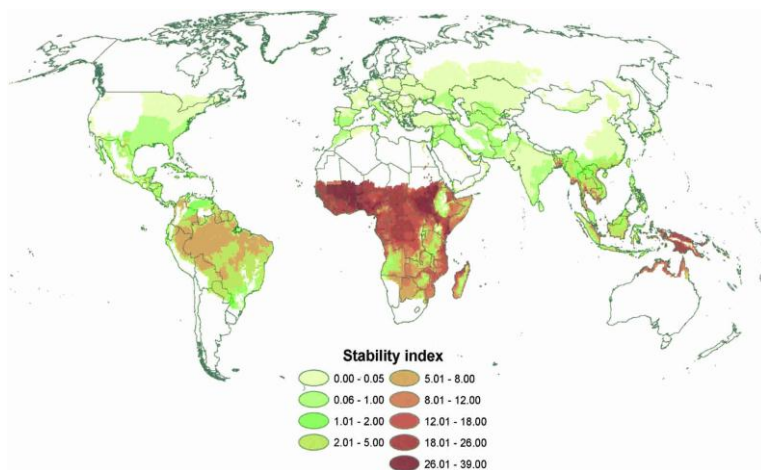


Fig. 1 - Distribuição da malária no mundo [1]

mais mortes induz, é o parasita responsável pelo maior número de casos de malária aguda, o *P. falciparum*, que entra no organismo do hospedeiro através da picada de algumas espécies do mosquito *Anopheles* [13].

A malária é nos nossos dias um grave problema de saúde pública com quase quinhentos milhões de casos clínicos anuais. Abrange sobretudo as zonas tropicais e

subtropicais, com particular incidência nos países da África subsaariana, da América do Sul e Central e do sudeste asiático (Fíg. 1). E os seus efeitos são devastadores não só ao nível das mortes que causa mas também às perdas económicas diretas e indiretas.

Esta devastadora doença parasitária apresenta características de propagação distintas entre zonas endémicas (Fíg. 1), o que se deve essencialmente ao complexo ciclo de vida e grande capacidade de adaptação dos parasitas responsáveis pela sua transmissão [14].

II.2. *Plasmodium falciparum*

Plasmodium é um género pertencente ao filo Apicomplexa, caracterizado pelo reduzido tamanho, sendo das células eucarióticas mais pequenas, o que é bastante importante no seu desenvolvimento e propagação. Devido à sua função e eficácia estes parasitas possuem grandes recursos ao nível da maquinaria celular que lhes permite invadir e parasitar os eritrócitos do hospedeiro.

Aquando da sua entrada no organismo humano o parasita invade os eritrócitos e aproveita-se das suas reservas para sobreviver, acabando na maioria dos casos por lhe induzir anemia severa [15].

Estes parasitas são de tal forma eficazes que após entrarem no meio intracelular, utilizam toda a "maquinaria celular" a seu favor. Referir ainda, que tudo se passa num meio altamente nutritivo que permite uma disseminação eficiente e com reduzidos "custos" para o parasita [16]. Diversas características observadas sugerem que o parasita e o sistema imunitário do hospedeiro, interagem através de um complexo mecanismo que o torna incapaz de eliminar o parasita e de resistir a infeções subsequentes [17].

Existem atualmente cinco espécies de parasitas consideradas capazes de infetar seres humanos com malária, nomeadamente, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e o, muito recentemente descoberto, *Plasmodium knowlesi* que também é capaz de infetar seres humanos [18, 19]. Destes o mais perigoso é o *P. falciparum*, sendo responsável por mais de 75% das mortes devidas a malária e 90% das infeções registadas [8, 20].

É estimado que o *P. falciparum* tenha aproximadamente 100 000 anos de idade, ou seja, a mesma idade que os seres humanos, sugerindo que o sistema imune e este parasita se desenvolveram em permanente interação e adaptação. A elevada pressão seletiva imposta pela mortalidade causada pela malária, sugere que qualquer mutação no genoma humano que tenha transmitido proteção contra esta doença severa, terá sido rapidamente selecionada e fixada no ser humano. Com isto sugere-se que a malária moldou os mecanismos de defesa imunes, o que torna a relação entre o parasita e o

sistema imune muito próxima. Esta proximidade poderá ser a responsável pelas recorrentes infecções que o nosso sistema imune é alvo por parte deste parasita responsável pela transmissão do maior número de casos de malária e pelas dificuldades encontradas na procura de mecanismo eficiente de extinção desta doença. O conhecimento atual indica que a sobrevivência do parasita está dependente da capacidade do mesmo em invadir um hospedeiro e ser capaz de se propagar de hospedeiro em hospedeiro. Esta capacidade torna-se ainda mais importante se pensarmos nas áreas de transmissão sazonal, como é o caso de grande parte dos países do oeste africano [21]. Com os meses de seca, os mosquitos deixam de ser o vetor de transmissão da doença durante seis meses, nesse período o parasita terá de ser capaz de se manter no organismo humano, o que só acontece pois o sistema imune humano, na grande maioria dos casos, não é capaz de o combater eficazmente [17].

Por ser altamente virulento para a espécie humana, *P. falciparum* está a criar novos desafios a todos aqueles que pretendem erradicar a malária. Estes seres utilizam a sua enorme capacidade de adaptação/resistência para se imunizar contra as drogas utilizadas nos tratamentos. Estas capacidades têm sido adquiridas com uma seleção natural de polimorfismos que se mostram mais eficazes perante os genes que intervêm na codificação da hemoglobina, de outras proteínas dos eritrócitos e até de proteínas essenciais ao sistema imunitário do hospedeiro. Este mortal Plasmodium demonstra possuir uma grande capacidade de mudança de antigénios de forma a combater as defesas do hospedeiro e assim invadir as células dos eritrócitos humanos.

II.3. Processo de infeção

Um dos maiores desafios colocados aos programas de controlo da malária é a elevada complexidade do ciclo de vida dos Plasmódios envolvidos na transmissão da malária, contando com uma fase assexuada (esquizogonia) que ocorre nos hospedeiros vertebrados e que tem um tempo de duração variável de acordo com a espécie infecciosa e uma fase sexuada (esporogonia) que ocorre no intestino médio do mosquito vetor [22].

Atualmente as etapas que levam à infeção do hospedeiro humano pelo parasita encontram-se bem delineadas (Fíg. 2), envolvendo genericamente duas fases: a hepática e a eritrocítica.

A fase hepática ou esquizogonia pré-eritrocítica inicia-se com a infeção de seres humanos com *P. falciparum* (na forma de esporozoítos haploides) através da inoculação do parasita por meio da picada de um mosquito Anopheles fêmea infetado. Um pequeno número de esporozoítos, provenientes das glândulas salivares dos mosquitos, é injetado através da pele conjuntamente com vasodilatadores e anticoagulantes, entrando na

corrente sanguínea e linfática onde aciona as células T (a), iniciando estas o mecanismo de resposta imune [23, 24]. Os esporozoítos libertados na corrente sanguínea chegam rapidamente ao fígado e invadem os hepatócitos, iniciando dessa forma a esquizogonia. Nesta fase a doença ainda não manifesta qualquer sintoma (b).

Nos hepatócitos, o parasita replica-se no interior de um vacúolo (vacúolo do parasitóforo) formado pela invaginação da membrana da célula hospedeira, num processo que é ativado pelo próprio parasita. Nesta fase um grupo de proteínas parasitárias é transportado, seletivamente, através da membrana vacuolar até ao citosol, à membrana celular e ao núcleo da célula hospedeira. No núcleo vão influenciar a expressão de diversos genes, criando um ambiente favorável para o crescimento do parasita [22]. Inicia-se então um processo de divisão intracelular assexuada que resulta na libertação de centenas de merozoítos por cada hepatócito infetado (c), terminando assim a fase hepática e iniciando-se a fase eritrocítica [25].

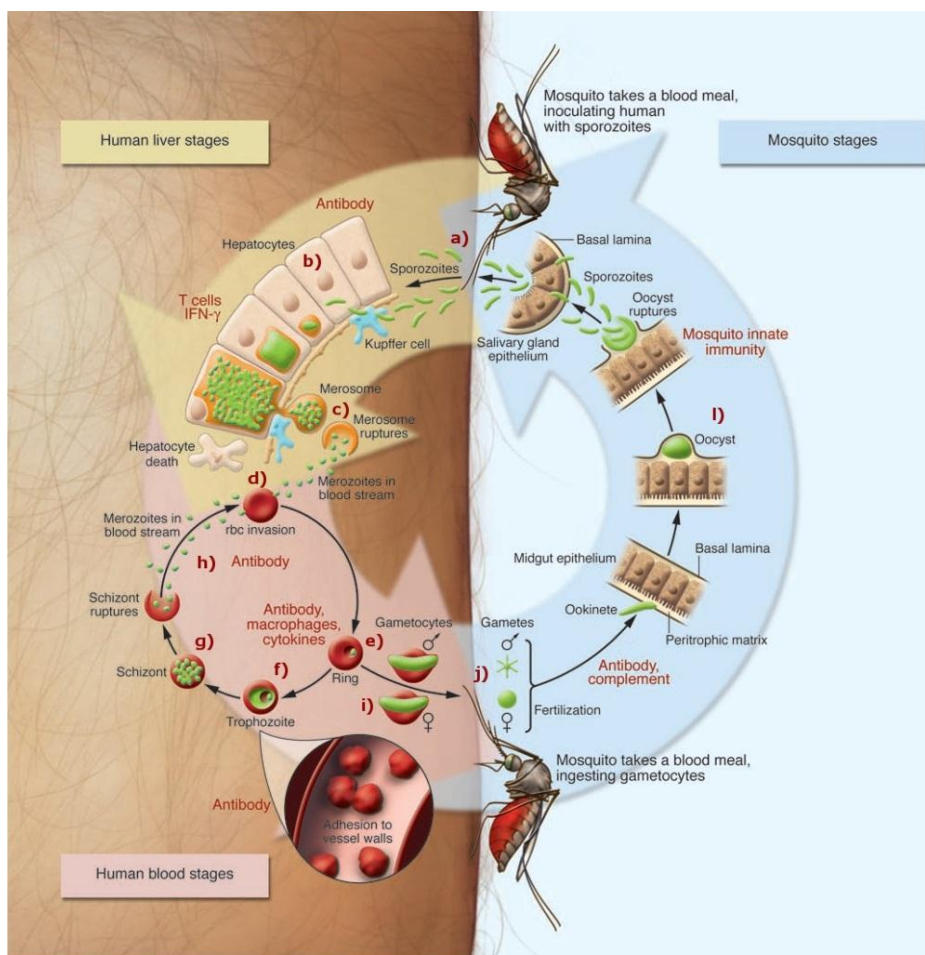


Fig. 2 - Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*, principal agente de transmissão da malária severa no mundo. O seu ciclo de vida é bastante complexo e contempla um grande número de estados de desenvolvimento, duas fases, uma assexuada e outra sexuada, e ainda inúmeros fenómenos de invasão-replicação-invasão. Imagem adaptada de [25].

Na fase eritrocítica ou esquizogonia eritrocítica os merozoítos libertados na corrente sanguínea invadem os eritrócitos (d). Nesta fase começam a aparecer no paciente os primeiros sintomas com estados febris característicos. O processo de invasão dos eritrócitos inicia-se com a adesão inicial, formando-se a junção apical através do contacto entre o parasita e o eritrócito. Esta junção vai permitir a entrada do parasita na célula hospedeiro. O parasita consegue sobreviver no interior do eritrócito através da formação do vacúolo do parasitóforo (VP) que o vai incorporar e proteger.

No entanto, de forma a evitar que o eritrócito afetado seja removido pelo sistema imune, o parasita promove alterações na membrana do eritrócito, permitindo (entre outras) que o mesmo adira ao endotélio de diferentes tecidos, o que garante a sua sobrevivência e uma rápida replicação (16 a 32 novos merozoítos por cada merozoíto original) [26]; Inicia-se desta forma o desenvolvimento do parasita nos estágios de anel (e), trofozoíto (f), esquizonte precoce e esquizonte maduro (g). Os esquizontes maduros encontram-se repletos de merozoítos eritrócitos que são libertados (h), através da lise do eritrócito, e que irão invadir novos eritrócitos não infetados, iniciando um novo ciclo de invasão, replicação e rutura. Durante o seu desenvolvimento, alguns destes merozoítos desenvolvem-se em gametócitos (feminino e masculino) (i); Os gametócitos diferenciados poderão posteriormente ser ingeridos por um novo mosquito (j), fundindo-se no intestino médio do inseto para formar um zigoto, o oocineto (l), onde irá ocorrer a meiose, iniciando-se assim a fase sexuada (esporogonia). O oocineto dá origem ao oocisto que se desenvolve em esporozoítos (forma infecciosa) que passam para a glândula salivar do mosquito, completando desta forma o ciclo de vida do parasita. Na esporogonia dura em média dez a vinte dias e o mosquito permanece infeccioso durante 1 a 2 meses [17, 27].

II.4. Antimaláricos

Seria de esperar que uma doença infecciosa responsável por tantas mortes ao longo dos anos como tem sido a malária tivesse um grande número de medicamentos associada. No entanto, o número de antimalárico disponível não é tão vasto quanto seria de supor, o que se deve sobretudo a ser uma doença comum dos países subdesenvolvidos onde os meios financeiros e científicos não são muitos. O panorama torna-se ainda mais preocupante quando atualmente se sabe que existe resistência para todos os antimaláricos disponíveis.

Os antimaláricos conhecidos dividem-se em: quinolinas (ex: quinina, cloroquina e mefloquina), antifolatos (ex: sulfadoxina - pirimetamina) e os compostos derivados de artimisinina (ex: artimisinina, artemether, artesunato e dihidroartemisinina), por vezes são também utilizados alguns antibióticos (ex: tetraciclina) e atovaquona.

O Quinino foi o primeiro fármaco utilizado no tratamento da malária, no entanto, o primeiro antimalárico específica descoberto foi a cloroquina (CQ) em 1934 e posteriormente implementado na década de cinquenta como forma de tratamento, essencialmente para os casos não severos, gerou-se então uma enorme expectativa em torno do que se pensou ser a extinção da doença no mundo [24, 28, 29].

A cloroquina é um derivado da 4-aminoquinolona e é um composto rápido a atuar, eficaz e barato, o que em conjunto com o aparecimento e uso do dicloro-difenil-tricloroetano (usualmente conhecido como DDT), um insecticida de largo espectro e eficiência, utilizado na época, produziu desde cedo excelentes resultados apresentando reduções na severidade e incidência de malária pelo mundo inteiro. No entanto, nalgumas regiões, devido a dificuldades sociais (difícil implementação das medidas de controlo, guerras, falta de verbas e migrações populacionais), e ao aparecimento de dificuldades biológicas (estirpes de mosquitos *Anopheles* resistentes e elevadas taxas de transmissão parasitária) os resultados não foram os esperados [24, 25, 30].

No final da década de cinquenta começaram a aparecer os primeiros indícios de resistência à CQ no sudeste asiático, indícios esses que se tornaram mais preocupantes na década seguinte com o aparecimento generalizado de resistências no continente africano [31, 32]. Na década de setenta a primeira linha de terapia passou a ser a combinação de antifolatos sulfadoxina - pirimetamina (SP), que têm a grande vantagem de poder ser tomados numa única dose e de serem economicamente acessíveis, mas também aqui o aparecimento de resistência e a quebra de eficiência terapêutica levou à adopção, no final do séc. XX, de uma nova linha de terapêutica a monoterapia com mefloquina (MEF) [29].

A MEF é um derivado da quinina, muito utilizado como procedimento profilático, mas cujas primeiras descrições de resistência clínica surgiram apenas alguns anos após a sua implementação, particularmente no sudeste asiático. [28, 33].

O aparecimento de parasitas resistentes a múltiplos antimaláricos teve como consequência o ressurgimento do aumento de casos e essencialmente da mortalidade causada pela malária. Nos últimos anos surgiu uma nova esperança com o uso da artemisinina e dos seus derivados. No entanto, e de forma a evitar os mesmos erros do passado, a organização mundial de saúde recomenda expressamente as terapias combinadas à base de artemisinina (ACT). Deste modo previne-se, ou pelo menos, dificulta-se bastante o ressurgimento de estirpes resistentes [34].

As propriedades farmacocinéticas da artemisinina (ART) e dos seus derivados, são eficazes na eliminação do parasita, no entanto, o tempo de meia-vida, é bastante

diminuta, o que se traduz em taxas de eficácia reduzida quando utilizada como monoterapia [35]. No entanto, a combinação de um membro desta classe de drogas com um outro de longa duração, como por exemplo a MEF, assegura uma taxa de eficácia muito superior à obtida com a monoterapia. Este processo aumenta a eficácia do tratamento antimalárico e reduz a pressão seletiva para a resistência. Idealmente, as drogas antimaláricas combinadas teriam propriedades farmacocinéticas semelhantes, para que nenhuma fosse "desprotegida" pela outra. Isto quer dizer que as ACTs beneficiam substancialmente com a capacidade da ART e dos seus derivados para reduzir rapidamente a biomassa do parasita, dando origem à eliminação de parasitas, o que reduz a probabilidade de surgir resistência e do elevado tempo de meia vida dos fármacos combinados que mantêm a concentração antimalárica no sangue do hospedeiro elevada durante um maior período de tempo, evitando reincidências [36].

Assim, após diversos testes clínicos foi introduzida, no ano 2000 nas regiões onde se verificavam resistências a múltiplas drogas, a combinação terapêutica composta por artesunato e MEF. Juntando assim a elevada capacidade antiparasitária do artesunato com o elevado tempo de meia vida da MEF (14 a 18 dias), que é muito superior à grande maioria dos compostos antimaláricos [24].

Em relação aos antibióticos são utilizados na maioria das vezes como medida profiláctica ou em conjugação com a quinina em casos severos e em zonas onde exista resistência significativa. Os principais antibióticos utilizados são a tetraciclina e os seus derivados como a doxiciclina [24].

Apesar de tudo, com o evoluir dos antimaláricos, a malária deixou de ser uma doença vastamente disseminada, para atualmente se concentrar essencialmente em África, Ásia e América Latina, muito pelas condições climatéricas favoráveis ao desenvolvimento de plasmódios e vetor, mas também pelas carências socioeconómicas, limitadoras da compra e fornecimento de antimaláricos eficazes e de implementação de medidas de higiene e diagnósticos clínicos eficazes.

II.4.1. Mecanismos de Ação

O mecanismo de ação dos diferentes antimaláricos varia significativamente entre cada grupo de compostos, no entanto, a ação dos antimaláricos correntemente utilizados ocorre na fase eritrocítica, uma vez que em contraste com a fase hepática esta é sintomática e de longa duração. Enquanto os antibióticos têm a sua ação focada no apicoplasto, os antifolatos incidem no citosol do parasita e os derivados de quinolina e artemisinina no vacúolo digestivo (VD) (Fíg. 3) [25].

Mais pormenorizadamente os antibióticos correntemente utilizados para o tratamento da malária, a tetraciclina e a doxiciclina, têm o seu mecanismo de ação focado no apicoplasto e na subunidade 30S do ribossoma, inibindo entre outras a síntese de proteínas do parasita [37]. Devido a serem apenas eficazes após alguns dias de tratamento têm de ser utilizados de forma combinada com um antimalárico de ação rápida. Apresentam um grande número de efeitos secundários que os desaconselha a ser utilizados na grande maioria dos casos, como grávidas e crianças com menos de oito anos, a grande faixa de mortalidade da doença [24]. Em relação aos antifolatos, interferem no metabolismo da síntese de folato, que é essencial na replicação parasitária. No entanto, está demonstrado que os antifolatos são suscetíveis ao aparecimento de mecanismos de resistência eficazes nos parasitas maláricos. Assim o seu uso tem diminuído ao longo dos anos não sendo considerados na maioria dos casos clínicos [29].

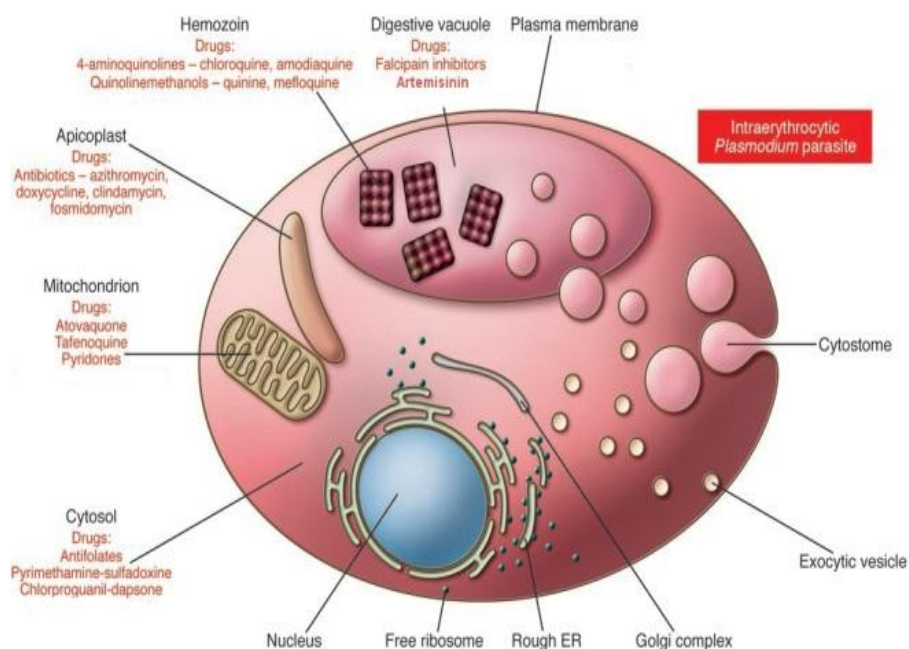


Fig. 3 - Representação do método de ação dos agentes regularmente utilizados no tratamento da malária. Podemos ver que os agentes antimaláricos mais específicos, como a mefloquina, a artemisinina e a cloroquina atuam no vacúolo digestivo, enquanto os restantes agentes também utilizados no tratamento de outras patologias têm outros alvos como o citosol (antifolatos) ou o apicoplasto (antibióticos) (Adaptado de [25])

Como já foi referido, pensa-se que a ação das quinolinas e dos derivados de artemisinina esta localizada no VD do parasita. Na fase eritrocítica, o plasmódio através de um mecanismo de endocitose, incorpora no seu VD uma porção do citosol da célula infetada. Este citosol, constituído em grande parte por hemoglobina é uma fonte de aminoácidos essencial para o desenvolvimento do parasita. No VD, proteases aspárticas dissociam a parte proteica (globinas) do grupo heme ou ferriprotoporfirina IX, cuja

presença é tóxica para o parasita, podendo gerar espécies reativas de oxigénio (ROS) que podem induzir danos nas membranas e no ADN. De forma a destoxificar o heme, o plasmódio converte a maior parte dos grupos heme num biomineral cristalino insolúvel designado por beta-hematina mas habitualmente descrito como hemozoína ou pigmento malárico [48]. Esta reação no entanto só é possível graças às condições ácidas (pH 5,2) do VD. Os restantes grupos heme resultantes da digestão da hemoglobina passam através da membrana do vacúolo para o citosol onde são neutralizados através da interação com a glutathione (GSH), da ligação a outras proteínas como a glutathione S-transferase, glutathione reductase ou ainda através da reação com H_2O_2 , que promove a oxidação e consequente neutralização do grupo heme [25, 38].

A ação dos derivados da quinolina, como a quinina ou a cloroquina tem por base a sua capacidade, enquanto bases fracas, de fazer subir o pH das vesículas ácidas através da captação de prótons [39]. No caso particular da malária, esta capacidade permite a inibição da degradação da hemoglobina, através da subida do pH do VD. Já a mefloquina, a quinolina mais utilizada em combinação com os derivados de artemisinina, é uma 4-aminoquinolina fluorada relativamente bem absorvida por via oral e possui um tempo de meia vida de cerca de 2 a 3 semanas, em parte devido à sua alta lipofilicidade e distribuição extensiva. Apesar de não se conhecer detalhadamente o seu mecanismo de ação, sabe-se que a MEF não tem a sua ação unicamente situada no VD mas também no citosol. Sabe-se que no VD inibe a formação da hemozoína intra-eritrocitária e existem indícios que a sua ação no citosol passe por inibir a neutralização dos grupos heme, quer no caso das reações de oxidação, quer nas conversões enzimáticas. Esta ação acontece uma vez que a MEF forma um complexo com o grupo heme que é tóxico para o parasita. O seu modo de ação citosólico foi entretanto apoiado por diversos estudos com linhas transgênicas de *P. falciparum* sujeitas a mefloquina e que expressaram diferentes números de cópias do gene *pfmdr1*, que codifica a proteína PfMDR1, o que sugere evidências da sua ação citosólica [40, 41].

Em relação aos derivados de artemisinina, os mecanismos pelos quais exercem a sua atividade antimalárica permanecem controversos. No entanto, a maioria dos estudos concordam que a atividade da ART e de muitos, se não todos, os seus derivados, resulta da cisão redutiva das pontes de peróxido por parte do ferro heme reduzido, que é produzido dentro do VD à medida que é digerida a hemoglobina [8, 40, 42]; (Fíg. 3). Para além da formação de hemo-adutos potencialmente tóxicos, a ART pode gerar radicais livres, alquilação e oxidação de proteínas e (possivelmente) de lípidos em eritrócitos parasitados [41, 43, 44]. Assim, a atividade da ART pode ser potencializada pelo oxigénio

e por agentes oxidantes e atenuada por agentes redutores. Alternativamente, os derivados de ART podem ser ativados por clivagem de ligações peróxido através dos centros redox intracelulares de ferro-enxofre, encontrados em múltiplas enzimas de *Plasmodium spp.* A alquilação destas enzimas poderá resultar na morte do parasita [45]. Estudos recentes de microscopia eletrónica de transmissão indicam que a ART e outros endoperóxidos, dependendo da dose e do tempo, podem comprometer a integridade do VD antes de ser observado qualquer efeito no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias [38, 42, 46, 47].

II.4.2. Resistência aos antimaláricos

Apesar do mecanismo que leva o parasita a adquirir resistência a antimaláricos não ser consensual, existem alguns indícios do envolvimento de algumas proteínas e vias metabólicas que se pensa serem pontos-chave do mecanismo de aquisição de resistência.

Analisando o mecanismo de invasão e desenvolvimento parasitário no hospedeiro existe um conjunto de processos fundamentais para a sobrevivência do parasita. Aqueles aos quais tem sido dado um maior enfoque nas investigações mais recentes são as interações entre as proteases parasitárias e as proteínas da membrana eritrocitárias, que possibilitam a entrada e saída do parasita dos eritrócitos e que impedem a sua remoção da corrente sanguínea por parte do sistema imunitário do hospedeiro e a manutenção do equilíbrio intracelular e desenvolvimento parasitário, nomeadamente a capacidade de degradar a hemoglobina do eritrócito e resistir às espécies reativas resultantes da hidrólise.

Por definição resistência a antimaláricos é "a capacidade de uma estirpe de um determinado parasita em sobreviver e/ou propagar-se apesar da administração e absorção de uma dose, igual ou superior à recomendada de antimalárico pelo hospedeiro, mas à qual este seja tolerável. O fármaco deverá ter acesso aos eritrócitos infetados pelo tempo necessário para a sua atuação eficaz" [24]. Para que o parasita adquira resistência a um antimalárico é necessário que ocorram algumas adaptações no seus mecanismos de ação, nomeadamente, a aquisição de processos que inativem, modifiquem ou alterem o local de atuação do fármaco, da alteração de vias metabólicas ou ainda de mecanismos que permitam reduzir a acumulação de fármacos nos organelos alvo [48]. Essas alterações são muitas vezes devidas a mutações pontuais ou múltiplas em genes que codificam proteínas essenciais para a sobrevivência e propagação do parasita, essas mutações se benéficas ao parasita acabam por fixar-se na população parasitária [24, 30].

Com a introdução dos antimaláricos no tratamento da malária os plasmódios tiveram de enfrentar um novo conjunto de desafios, sendo que existem indícios que apontam para aparecimento de modificações nalguns processos vitais, nomeadamente, em processos que envolvem as proteases na degradação da hemoglobina e as proteínas membranares no caso dos antimaláricos derivados de quinolina e da artemisinina [24] e mutações na enzimas-chave na via biossintética do folato, a dihidrofolato reductase e a dihidropteroato sintase no caso da resistência aos antifolatos [29, 49].

II.4.2.1. Degradação da hemoglobina

De modo a manter o equilíbrio intracelular aquando da invasão do eritrócito o parasita expressa um grande número de proteases de forma a digerir e assimilar os nutrientes da célula hospedeira e, de modo, a possibilitar a sua entrada e saída da mesma [50, 51].

Na fase eritrocitária o parasita, através das suas endocitoses, cataboliza quase a totalidade da hemoglobina da célula hospedeira [52], o que lhe permite a incorporação dos aminoácidos (a.a.) resultantes da hidrólise da hemoglobina na síntese proteica e no metabolismo energético [53-55]. No entanto, estudos recentes demonstraram que o acesso a a.a. não é a única função do catabolismo da hemoglobina. De facto o parasita apenas utiliza um quinto dos a.a. derivados da sua degradação [55]. Esta observação em conjunto com as alterações no volume eritrocitário durante o desenvolvimento intraeritrocitário sugere que a degradação da hemoglobina é importante para a prevenção da hemólise dos eritrócitos infetados uma vez que diminui a pressão osmótica e liberta espaço no interior do eritrócito para permitir o seu desenvolvimento [56-59].

Foi através destas novas descobertas que as proteases, mais precisamente as falcipainas (proteases cisteínicas), constituem promissores alvos para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos. Estas proteases têm um papel central na degradação da hemoglobina, na invasão e na rutura dos eritrócitos (Fíg. 4). No entanto, devido à dificuldade de analisar estas proteínas no seu estado ativo, o seu mecanismo de ação ainda suscita algumas dúvidas [59].

Das falcipainas existentes, sabe-se que a falcipaina-1 é importante no mecanismo de rutura da membrana da célula hospedeira, enquanto que, a falcipaina-2 e a falcipaina-3, são consideradas de particular importância para o processo de degradação da hemoglobina [60]. Estudos realizados com inibidores da falcipaina-1 demonstraram que esta proteína é vital para o processo de invasão do merozoíto [61]. Estes estudos foram mais tarde corroborados através de ensaios fluorométricos que avaliaram a atividade da

proteína, assim como estudo de imunolocalização que demonstram uma particular incidência no terminal apical dos merozoítos [61, 62].

No que diz respeito à falcipaina-2 e à falcipaina-3, os estudos já se encontram mais avançados, tendo sido demonstrado que é uma enzima chave do ciclo de vida de *P. falciparum*, uma vez que é responsável pela degradação da hemoglobina durante o estado de trofozoíto e pela clivagem da anquirina, que é a proteína que medeia a ancoragem das proteínas integrais de membrana ao esqueleto membranar dos eritrócitos. É esta família de proteínas, uma das principais responsáveis pela integridade membranar e pela ancoragem dos canais e transportadores de íões [63-65].

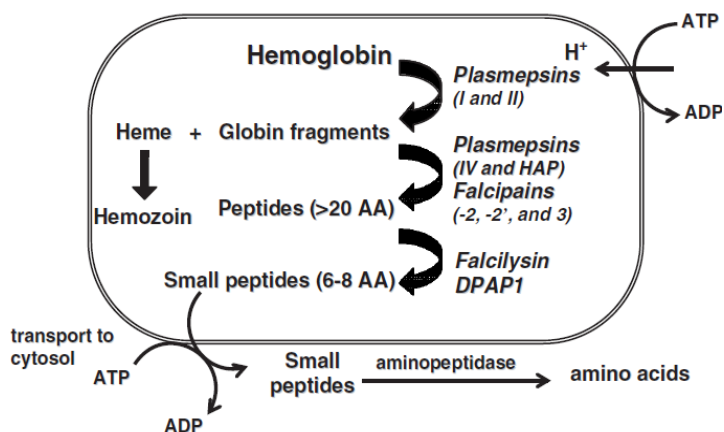


Fig. 4 - Via da degradação da hemoglobina no interior do vacúolo parasitário do Plasmodium falciparum (Adaptado de [67])

Como a degradação da hemoglobina é essencial para a replicação do parasita, é atualmente o grande foco de desenvolvimento das novas drogas antimaláricas, o que torna essencial a descoberta e compreensão das vias metabólicas que a originam [66].

Os passos iniciais do catabolismo da hemoglobina estão bem caracterizados, sabendo-se que o mesmo ocorre através da ação de um conjunto de endopeptidases no vacúolo digestivo, que tem um ambiente ácido. No lúmen do VD a ação das proteases asparticas, plasmopsina I, II e IV, que atuam sobre a cadeia de α -globina [67]. Após este primeiro processo, a ação da protease histo-aspartica e das proteases cisteínicas falcipainas 2, 2' e 3, promove a hidrólise das cadeias α e β globinas em oligopeptídeos [68]. Por fim a falcilisina, que é uma metaloproteína, converte as cadeias resultantes da degradação das cadeias de globinas em pequenas sequências (5 a 10 aminoácidos) de oligopeptídeos [69]. Estes dados foram comprovados através da utilização de inibidores de plasmepsinas e falcipainas, onde se verificou que era bloqueada a degradação da hemoglobina, provocando a morte do parasita [70]. Estes resultados fazem com que a inibição da degradação da hemoglobina esteja na base de alguns antimaláricos já desenvolvidos e que estão atualmente em desenvolvimento. Numa fase posterior pensa-se que os oligopeptídeos produzidos são hidrolizados a dipéptidos através da di-peptidil aminopeptidase 1, usualmente designada por Catepsina C, que é uma exopeptidase [71].

De modo a comprovar este modelo centrado na di-peptidil aminopeptidase 1 seria necessária uma compreensão detalhada da atividade enzimática, da sua importância para a replicação celular e a sua localização no interior do parasita [71, 72] O destino destes di e oligopéptidos produzidos permanece pouco claro, no entanto, alguns modelos defendem que o processo final da degradação da hemoglobina ocorre no citosol, através da ação de aminopeptidases citosolicas neutras [73] enquanto que outros estudos indicam que este processo ocorre no lúmen do VD [74].

É devido ao papel central no metabolismo parasitário que as proteases têm sido alvo de intensa investigação de forma a perceber o seu comportamento quando os parasitas estão sujeitos a fármacos antimaláricos de ação intensa. Sob o ponto de vista terapêutico apesar do recente interesse por estas moléculas, existem atualmente um conjunto conhecido de inibidores de proteases que começam agora a ser estudados como possíveis meios para combater a malária. Entre os conhecidos os mais promissores estão as isoquinolinas, as tiosemicarbozonas e as calconas [75, 76]

II.4.2.2. Interações membranares

Os parasitas intracelulares desenvolveram ao longo dos tempos estratégias para possibilitar a sua saída das células hospedeiro após atingirem o estado de total desenvolvimento e maturação, aproveitando-se para tal, da maquinaria celular e dos nutrientes da célula hospedeiro [77]. Este processo biológico é por norma desencadeado pelo patógeno e acompanhado por uma sequência de quebras na membrana do vacúolo parasitário, que durante todo o seu desenvolvimento protege o parasita do citosol da célula hospedeiro.

Plasmodium spp., tal como outros apicomplexa, necessita de entrar e sair eficientemente da célula hospedeira de modo a se propagar e dar sequência ao seu ciclo de vida. Estudos realizados com inibidores cisteínicos de largo espetro, demonstraram que a atividade proteolítica de algumas proteases desempenha um papel fundamental na saída dos merozoítos do vacúolo do parasitóforo e da membrana celular do hospedeiro [78, 79]. Aparentemente o parasita compartimenta as proteínas que atuam especificamente no momento da libertação dos merozoítos em compartimentos designados por exonemas [80-82]. Sabe-se que os exonemas contêm uma protease serínica semelhante à subtilisina com o nome de subtilase 1 (PfSUB1) que é essencial para o desenvolvimento do parasita e que medeia a maturação proteolítica de uma família de proteases putativas semelhantes à papaína, com o nome de "antígenos repetidos de serína" (serine-repeat antigen - SERA), que são abundantes e se sabe estarem implicadas no processo de libertação dos merozoítos [82, 83]. Quando ocorre a

maturação dos merozoítos o exonema liberta uma cascata proteolítica que leva à lise da membrana celular e consequente libertação do parasita [80, 82].

Estes dados foram confirmados através da inibição seletiva da PfSUB1, através da utilização de um composto natural de nome MRT12113 [80, 82] e por modificação covalente através da utilização de cloro-isocoumarinas [84] prevenindo assim a maturação das SERA e impedido a libertação dos merozoítos e consequente invasão eritrócitaria, deste modo ficou comprovado o envolvimento da PfSUB1 na ativação das enzimas SERA [80, 82].

Em *P. falciparum* oito das nove SERA estão localizadas em sequência no cromossoma 2 [85]. Do mesmo modo, em *P. berghei* (malária murina) as cinco SERA estão ligadas em sequência no cromossoma 3 [86]. Esta organização genética foi conservada ao longo da evolução e constituem uma marca única da família das SERA [87, 88]. Esta classe de proteínas está ausente na maior parte dos parasitas do filo Apicomplexa o que sugere que são exclusivos dos parasitas da malária.

Apesar de serem muito semelhantes no domínio proteolítico central, as SERA podem ser classificadas em quatro grupos que se dividem em dois grupos filogenéticos distintos [86-89]. O centro ativo das SERA cisteínicas (SERAcys) forma três grupos separados num único *cluster*, enquanto que as SERA serínicas (SERAser) têm centros ativos formados por quatro grupos monofiléticos. Os três grupos ortólogos aparentam ser bem conservados nos genes de *Plasmodium spp.* Dois desses grupos, o PfSERA6 e o PFsERA7 são expressos nos parasitas assexuados, enquanto, o PfSERA8, que é o grupo mais antigo, apenas está expresso nos sexuados [85].

Em contraste, o conhecimento acerca das proteínas SERAser, permanece centrado na PfSERA5, a primeira SERAser descoberta, que se localiza no VP dos esquizontes maduros [90]. Quando purificada a PfSERA5 exibe uma limitada atividade autoproteolítica semelhante à quimotripsina e a quebra de substratos polipéptidicos apresentasse quase insignificante [91]. No entanto, a PfSERA5 possui algumas particularidades como o facto de ser abundantemente expressa nos estadios mais desenvolvidos dos esquizontes, que são os estadios do parasita que precedem a libertação dos merozoítos [85, 90, 92]; dos seus anticorpos inibirem o desenvolvimento *in vitro* intraeritrocitário do parasita, através da aglutinação dos merozoítos e dos esquizontes danificados [93]; dos indivíduos infetados nas zonas endémicas exibirem um elevado número de anticorpos contra as proteínas SERAser, em particular contra a SERA5 [85, 93-95]; o aumento dos anticorpos anti-pFSERA5 parece estar correlacionado com a proteção contra as formas severas da doença [94].

As SERAs são substrato da SUB1, no entanto a pfSUB-1 não desempenha apenas um papel ativo na ativação da família de proteínas SERA, recentemente foi também associada ao complexo proteico constituído pelas proteínas membranares MSP1, MSP6 e MSP7 que se pensa regular o mecanismo que dá origem à libertação dos novos merozoítos, uma vez que é libertado no vacúolo do parasitóforo (VP) aquando da maturação dos merozoítos.

A PfSUB1 é fundamental para o desenvolvimento de merozoítos com a capacidade de invadir novos eritrocitos, uma vez que assim que é libertado no VP, tem a função de mediar o processamento proteolítico da MSP1/6/7. Mais uma vez aqui, foi demonstrado que a inibição da PfSUB1 impede a normal libertação dos merozoítos, indicando um papel chave da PfSUB1 na viabilidade do merozoíto [96]. Com estes novos dados, a PfSUB1 está não só associada ao processo de libertação dos merozoítos do VP, como também se sabe ser essencial na remodelação da superfície membrana dos merozoítos, sendo deste modo fundamental para a invasão de novos eritrócitos [96].

Estão identificadas aproximadamente 20 proteínas associadas à membrana do parasita, sendo que destas, nove são proteínas cerne ("core proteins") e estão ligadas com glicosilfosfatidilinositol (GPI) à membrana plasmática, enquanto que as restantes (proteínas periféricas) estão ancoradas às primeiras [97]. A proteína cerne mais abundante é a proteína de superfície do merozoíto-1 (MSP-1) [98], que é sintetizada no retículo endoplasmático do *P. falciparum* e processada no estado de esquizonte, sendo um complexo de quatro fragmentos que permanece ligado de forma não-covalente à superfície do parasita até se dar a invasão do hospedeiro [99]. A MSP1 é considerada como um antigénio candidato para a produção de uma vacina contra a doença [100], pois sabe-se ser indispensável para o ciclo de vida do parasita [101]. A MSP1 é sintetizada como um percussor âncora da GPI que se associa como um complexo a duas proteínas periféricas de membrana, de seu nome MSP6 e MSP7 [98, 102]. Este complexo MSP1/6/7 é o maior e mais abundante complexo proteico da membrana do merozoíto. E tem ainda a particularidade de estar distribuído uniformemente ao longo da membrana, estando envolvido nas interações mediadas por recetores que dão origem à rutura membrana que permite a libertação do merozoítos (processo designado por "egress") e posterior invasão eritrocitária [103, 104].

Os principais produtos dessas ruturas permanecem associados não-covalentemente à membrana dos merozoítos recém-libertados, sendo libertados aquando da invasão de um novo eritrócito [105]. As propriedades proteolíticas e a conservação dos locais de corte ao longo da evolução da MSP1 sugerem que a sua ação é determinante

para o correto funcionamento do complexo MSP1/6/7 e para a viabilidade do merozoíto [99]. Sabe-se que a atividade parasitária proteolítica é necessária durante o processo de libertação dos novos merozoítos no entanto, só agora começa a ser compreendido o seu verdadeiro mecanismo regulador [106].

II.4.2.3. Transportadores membranares

É consensual na grande maioria dos estudos dos mecanismos de resistência de *P. falciparum* aos diferentes antimaláricos que os processos que permitem ao parasita adquirir resistência a um antimalárico são complexos e envolvem alterações em mais do que um processo parasitário, no entanto, sabe-se que a capacidade de promover o efluxo de antimaláricos impedindo-os de atingir uma concentração suficiente para inibir o normal desenvolvimento e propagação parasitária é um dos fundamentais. Neste processo os transportadores membranares desempenham um papel fundamental, podendo chegar a registar valores de efluxo farmacológico superior 40 a 50 vezes no caso dos parasitas resistentes em relação aos sensíveis [107].

A maioria dos casos de fenómenos de resistência a antimaláricos derivados de quinolina e artemisinina aparenta estar dependente de mutações e aumento de cópias dos genes codificantes de transportadores localizados na membrana plasmática do parasita e na membrana do VD. O VD do parasita é um organelo vital para a eficácia dos agentes antimaláricos, uma vez que é o local de acumulação da grande maioria desses agentes, sendo também o principal local de destoxificação dos produtos de digestão da hemoglobina [107].

Têm sido apontados os genes *pfcr1*, o *pfmdr1* e o *pfmrp1* como os principais motores do mecanismo de resistência antimalárica. Enquanto o *pfcr1* codifica o transportador resistente à cloroquina, também designado por proteína transmembranar do vacúolo digestivo (CRT), os outros dois genes codificam proteínas da família dos transportadores ABC, a proteína homóloga à P-glicoproteína humana (P-gps) a PfMDR1 e a proteína homóloga da proteína resistente a múltiplas drogas, a PfMRP1.

A PfCRT é uma proteína de 45 kDa com dez domínios transmembranares [108] e sabe-se que assegura o transporte de drogas antimaláricas do VD para o citoplasma [109, 110], o que a torna fundamental no processo de resistência às drogas antimaláricas que atuam no VD como a cloroquina [111] ou a mefloquina, pois impede a sua acumulação no organelo de ação.

A PfMDR1, ou Pgh-1 como também é designada, é uma proteína de 162 kDa, composta por duas metades homólogas, cada uma com seis domínios transmembranares. Estudos recentes de fluorescência demonstraram que a PfMDR1 é,

muito provavelmente, responsável pelo transporte para o VD de solutos, incluindo alguns agentes antimaláricos [112]. Outros estudos realizados indicam que polimorfismos no gene precursor da PfMDR1, *pfmdr1*, estão associados a respostas *in vivo* e / ou *in vitro* do parasita à mefloquina [113, 114], à lumefantrina [115] e à artemisinina [113, 114]. Estes dados são corroborados por investigações realizadas, que relacionam o aumento do número de cópias de PfMDR1 com o crescimento do risco de falha do tratamento com ART e MEF num estudo clínico realizado na Tailândia [116], e a amplificação do PfMDR1 e a redução da suscetibilidade à ART e MEF, noutro estudo realizado *in vitro* [117].

Já no que diz respeito à PfMRP1, é uma proteína transmembranar situada na membrana plasmática do parasita e sabe-se que desempenha um papel de relevo no efluxo da forma oxidada da glutathione (GSSG), que é de elevada importância na resposta redox de inúmeros organismos, pelo que se pensa desempenhar semelhantes funções no *P. falciparum* [17, 118]. Esta classe de transportadores ABC está envolvida no efluxo de fármacos inalterados ou após metabolização (quando conjugados) entre o citoplasma e o exterior do parasita ou seja na diminuição da acumulação de compostos antimaláricos no citoplasma [118].

Tal como no caso da PfMDR1, estudos recentes indicam que o *pfmrp1* participa ativamente em *in vivo* e / ou *in vitro* na resposta do parasita à cloroquina [17, 119], quinina [119, 120], lumefantrina [121] e de artemisinina [17]. E que mudanças no loci onde está localizado o gene *pfmdr1* interferem com a suscetibilidade de parasitas ao tratamento com artemisinina [17].

II.5. Identificação de determinantes de resistência

A capacidade de adaptação do *P. falciparum* às drogas antimaláricas tem gerado novos desafios na quimioterapia malárica. O genoma do parasita *Plasmodium falciparum* está totalmente sequenciado e disponível [122]. A conjugação da sequência genética do parasita, com a bioinformática, a proteómica e o perfil de expressão do ARN permite o desenvolvimento de novas estratégias de controlo da malária [123]. No entanto, só a combinação da informação genética com as mais potentes tecnologias de análise, permitirá a obtenção de resultados na procura de novos alvos terapêuticos [124].

Uma das áreas que maior desenvolvimento tem tido nos últimos anos é a proteómica, uma vez que combina a separação de alta-resolução de péptidos e proteínas, através das técnicas de separação proteica como a separação por eletroforese em gel e a cromatografia líquida ou gasosa, com a identificação através de espectrometria de massa e posterior análise com softwares de identificação e análise bioinformática cada vez mais eficientes e completos, permitindo dessa forma, a rápida identificação de

um grande número de proteínas expressas e interações. Aplicando esta tecnologia ao *P. falciparum*, temos a possibilidade de obter a comparação da expressão proteica e respectivas interações entre diferentes amostras, como por exemplo, diferentes estados de desenvolvimento ou parasitas resistentes e não resistentes [123].

A proteômica permite a realização de estudos ao nível da localização subcelular, função celular, composição dos organelos, alteração nos padrões de expressão proteica em resposta à exposição do parasita a antimaláricos, a interação entre o parasita e as drogas antimaláricas e, principalmente, os avanços nas tecnologias de análise proteômicas permitem complementar as análises realizadas através da genómica, transcriptómica e metabonómica, o que dará certamente origem à identificação de novas vias metabólicas, metabolitos e interações entre diferentes agentes parasitários [125]. Os avanços na espetrometria de massa, em particular, permitiram uma análise mais detalhada dos metabolitos endógenos e avanços nas análises metabólicas, possibilitando uma abordagem global para identificar alterações na expressão dos metabolitos parasitários.

As vantagens apresentadas pelas técnicas proteômicas têm originando o aparecimento de diversos estudos que têm providenciado novas descobertas, que vão desde o perfil de expressão proteica do plasmódio em condições pré-determinadas até à análise de interações entre diferentes proteínas. No entanto, nos últimos tempos, é o estudo dos mecanismos de ação e resistência das drogas antimaláricas, o grande alvo da investigação proteômica uma vez que na maioria dos casos os processos através dos quais se dá a sua atuação permanecem desconhecidos.

Estes desenvolvimentos são ainda mais relevantes no caso específico do *P. falciparum* uma vez que este parasita eucariota, possui um complexo e dinâmico ciclo de vida que decorre entre dois organismos. Esta complexidade no seu ciclo de vida, faz com que existam variações bastante significativas entre populações, o que torna particularmente complicado o seu estudo. Atualmente encontram-se identificadas aproximadamente metade das 5300 proteínas que se deduz existirem no *P. falciparum* através da análise do seu genoma, sendo ainda de considerar que, uma grande quantidade das proteínas previstas através da análise do genoma, permanece como hipotética. Apesar de se poder considerar que já muito foi feito, serão necessárias novas abordagens para identificar as proteínas menos abundantes.

A grande maioria dos estudos realizados baseou-se na separação e identificação das proteínas dos diferentes estados de desenvolvimento, através de eletroforese mono e bi-dimensional seguida de identificação por espetrometria de massa [92, 126-129]. Dos

estudos realizados resultaram inúmeras informações acerca das diferentes no perfil proteico do parasita ao longo dos seus estados de desenvolvimento [126]

No entanto, apesar destes profundos estudos de separação e identificação, é necessário analisar as modificações pós-traducionais e as diferenças quantitativas nos níveis proteicas em resposta a diferentes condições e perturbações como a presença de drogas antimaláricas. Se para a identificação de modificações pós-traducionais o método encontra-se bem detalhado e tem como ferramenta fundamental a análise por espectrometria de massa, já no caso da quantificação proteica o processo é mais complexo e para além de todas as técnicas de identificação proteica, é ainda necessária a diferente marcação das diferentes amostras em análise com vista a uma eficaz comparação entre elas [123].

Esta marcação pode ser realizada aquando da fase de cultura através da utilização de SILACs "stable isotope labeling adaptation with aminoacids in cell culture" (SILACs), ou após a extração proteica com "isobaric tags for relative and absolute quantitation" (iTRAQ[®]) ou "tandem mass tags" TMT). Os SILAC, os iTRAQs e os TMTs têm como princípio a marcação com isótopos radioativos de aminoácidos e apesar de muito fiáveis são extremamente caros, o que faz com que sejam técnicas ao alcance de poucos e exigem um grande rigor na preparação da amostra. Muito recentemente, foi descrito um novo método de marcação que recorre à catálise ácida com O¹⁸ [123, 130, 131]. Este apresenta-se como uma boa alternativa aos métodos de marcação com iTRAQ uma vez que são bastante menos dispendiosos, no entanto, exigem uma análise detalhada pois baseiam-se na incorporação de O¹⁸ (isótopo de oxigénio) no terminal carboxílico dos péptidos tripticos no decorrer da proteólise. Estes péptidos servirão como padrões internos, uma vez misturados com péptidos homólogos não marcados, produzindo diferenças de 4Da (por cada resíduo ácido que possuam) nos sinais iónicos em MS. Este método só é possível graças à elevada frequência de ocorrência de resíduos ácidos (Aspartato e Glutamato) nos péptidos resultantes da proteólise.

A possibilidade de explorar novas técnicas levou à adoção da marcação com O¹⁸ e iTRAQ, complementadas por separação proteica por SDS-PAGE, zimografia e nano-LC MALDI MS/MS no desenvolvimento do presente estudo. Foi optada a marcação como ponto-chave em detrimento da análise por eletroforese, pois a análise de quantidade proteica baseia-se nas diferenças de densidade ótica, ou seja, no pressuposto de que cada banda corresponde apenas a uma proteína, o que se sabe não acontecer na grande maioria das amostras complexas como é o caso do proteoma de *Plasmodium spp.*

III. Objetivos

III. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para um maior esclarecimento de alguns fenómenos associados ao processo de resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos atualmente existentes, para tal foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- A identificação do perfil de expressão proteómica de *Plasmodium falciparum* em resposta à ação da mefloquina;
- A análise quantitativa e qualitativa da atividade proteolítica do *Plasmodium falciparum*;

De forma a alcançar os objetivos propostos para o presente trabalho, foram utilizadas duas estirpes de *P. falciparum*, uma sensível à mefloquina (W2) e uma resistente à mefloquina (W2mef). As duas estirpes foram analisadas na ausência e presença do fármaco, sendo que os clones resistentes à MEF, são derivados de (W2) e foram obtidos por pressão seletiva em meio rico em MEF.

IV. Material e Métodos

IV. Material e Métodos

IV.1. Desenho Experimental

No sentido de concretizar os objetivos apresentados para este estudo, foi concebido um desenho experimental que é apresentado resumidamente na Fig. 5.

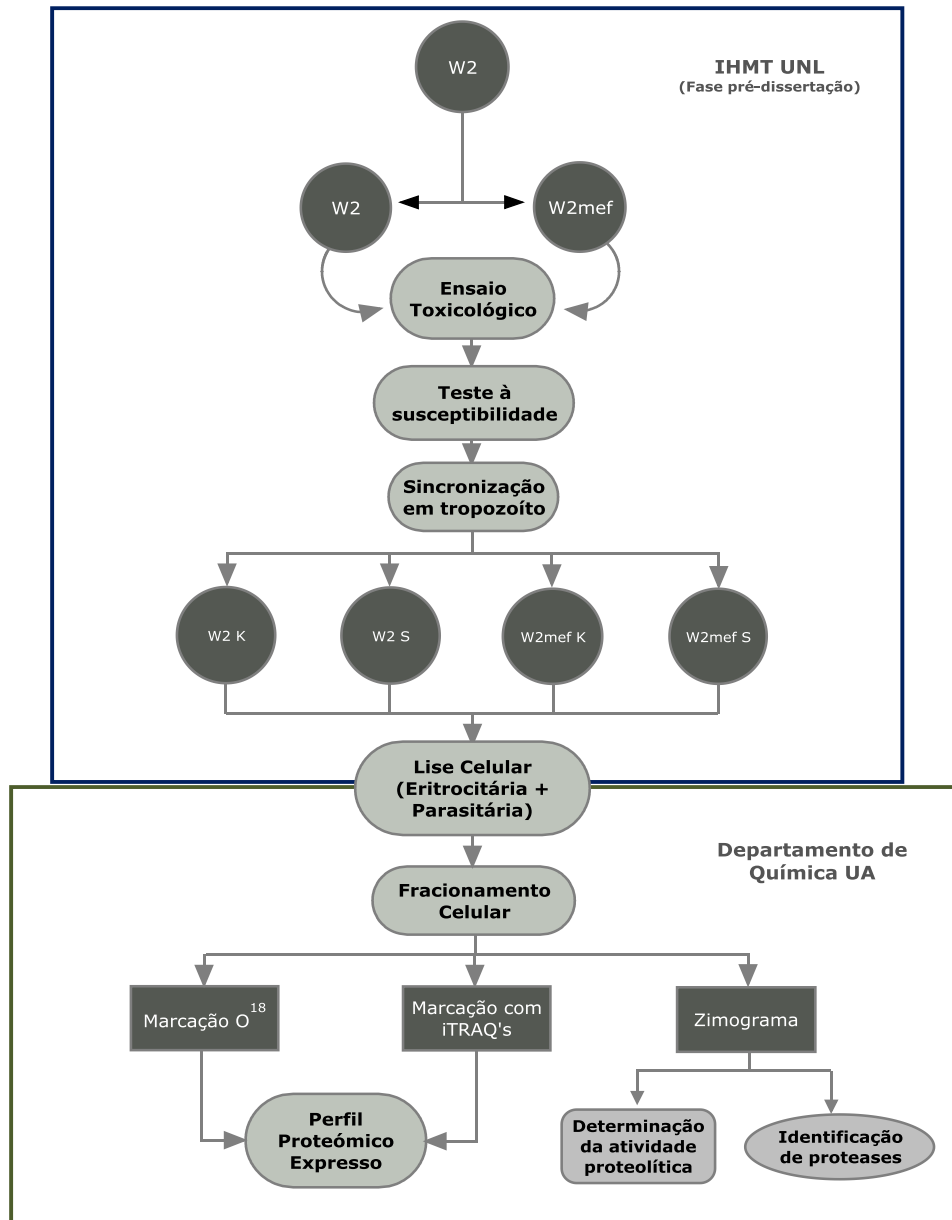


Fig. 5 - Desenho experimental (SmartDraw)

O procedimento experimental desenvolveu-se em duas instituições, tendo sido realizada uma primeira parte, pré-dissertação, relacionada com a cultura e análise dos parasitas nas instalações do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (IHMT UNL) e a segunda parte de análise proteómica nas instalações do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (DQ UA).

IV.2. Fase inicial – IHMT UNL

IV.2.1. Caracterização da amostra - *Plasmodium falciparum* in vitro

Neste estudo foram utilizados clones adaptados em laboratório de *P. falciparum*, sendo um sensível, W2, e outro resistente, W2mef, à mefloquina. Foram utilizadas estas duas estirpes por serem isogénicas, o que permite análises proteómicas mais precisas.

O procedimento experimental utilizado baseou-se no facto de se saber que é preferível utilizar trofozoítos maduros de forma a obter quantidade de proteína suficiente para as análises proteómicas e de que o máximo efeito da mefloquina ocorre no estado de maior desenvolvimento do trofozoíto uma vez que este é o período em que ocorre o maior índice de atividade sintética e glicolítica. É também sabido que os trofozoítos são mais suscetíveis às quinolinas do que os anéis ou os esquizontes e que os efeitos da mefloquina são mais visíveis após 12h da sua administração [24, 92, 126].

IV.2.2. Cultura do *Plasmodium falciparum*

Os parasitas foram cultivados em meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com eritrócitos O⁺ e 5% plasma artificial (Albumax), tendo sido mantidos entre 1-5% de parasitémia e 5% de hematócrito a 37°C e 5% de CO₂. A sincronização dos parasitas no estado de anel foi conseguida através de diversos tratamentos com Sorbitol 5% (w/v). A parasitémia e o crescimento parasitário foram monitorizados através da visualização de esfregaços das culturas ao microscópio ótico, com recurso a coloração de Giemsa.

IV.2.3. Ensaio Toxicológico

A sincronização dos parasitas em anéis antes da exposição à mefloquina, foi obtida por repetidas induções através sorbitol às 48, 96 e 144 horas. Posteriormente (24 a 28 horas após a re-invasão) as culturas parasitárias em anel (10% parasitémia, 2% hematócrito em 20mL de meio de cultura) foram divididas em dois grupos de 10mL cada. Um dos grupos tornou-se o grupo de controlo (K) enquanto que o outro foi exposto a uma concentração de mefloquina de duas vezes o IC₅₀ (previamente determinado) e tornou-se o grupo de estudo (S), (W2 clone, 30nM e o W2mef, 104nM). As duas culturas foram de seguida mantidas durante 12 horas a 37°C, 5% CO₂ e com uma humidade de 95%. Após as 12 horas de exposição à mefloquina os parasitas atingiram o estágio de trofozoíto/esquizonte e foram recolhidos em simultâneo com o grupo de controlo (K).

IV.2.4. Extração Parasitária

Os parasitas foram isolados a partir dos eritrócitos através da utilização de um tampão com saponina (0,05% saponina em PBS, pH 7.5), seguida de intensivas lavagens com PBS. Posteriormente os parasitas foram armazenados a -80°C até à extração proteica.

IV.3. Análise Proteómica – DQ UA

IV.3.1. Extração Proteica

A lise parasitária foi realizada com recurso a um tampão de lise (4M Urea, 0,4% Triton X-100, 50mM Tris – HCl, 10 mM MgSO₄, EDTA 10mM, pH 8,0) e a três ciclos de congelação/descongelação auxiliados por homogeneização com recurso ao UltraSonicador (30 seg, a 60% com pulsos de 1seg, com 1 segundo de intervalo).

IV.3.2. Separação Celular

O procedimento utilizado para o isolamento das proteínas parasitárias foi adaptado do protocolo experimental descrito por Becker et al.[128], que utiliza centrifugações diferenciais. De forma a otimizar as análises proteómicas foram então realizadas duas centrifugações, uma primeira a 15 000 g durante, 10m, com o objetivo de remover a hemozoína, uma vez que a presença deste cristal condiciona a análise proteómica, e uma segunda centrifugação a 66 000 g, durante 1h30m, que permitiu uma separação do *pellet* correspondente a agregados e partículas sólidas. Para as nossas análises foram considerados os *pellet* obtidos. Os *pellet* foram guardados a -80°C para futuras utilizações.

IV.3.3. Determinação da Concentração de Proteína total

A concentração total de proteína presente em cada uma das amostras isoladas a partir dos eritrócitos foi determinada com o kit comercial *RC DC Protein Assay* (BioRad®), que se baseia no método de Lowry *et al.*[132]. A densidade ótica foi lida a 750nm num leitor de placas (Multiskan Go, Thermo Scientific®). Simultaneamente foi efetuada uma reta de calibração com padrões de BSA, com concentrações entre os 10 mg/ml e os 0,08 mg/ml.

IV.3.4. Separação das proteínas por eletroforese SDS - PAGE

Com a finalidade de separar e verificar possíveis diferenças significativas entre as proteínas parasitárias, procedeu-se à separação eletroforética de 15µg de proteína num gel SDS-PAGE (10%) realizada de acordo com o previamente descrito por Vitorino *et al.* [133].

IV.3.5. Marcação com O¹⁸

Em relação à marcação com O¹⁸ suspenderam-se 20 µl de amostra W2 e 40 µl de amostra Wmef com 25 µl TEAB e 10 µl Rapidgest 1%. Colocaram-se então as suspensões num UltraSonicador durante 30 segundos (pulsos de 1 segundo a 60%) e adicionaram-se posteriormente 4 µl de TCEP 5mM.

Estas amostras foram então deixadas a incubar a 60 °C durante uma hora. De seguida adicionou-se tripsina (1:20) deixando-se em incubação “overnight” com agitação suave. De seguida aumentou-se a temperatura 95 °C durante 10 minutos de forma a parar a reação.

De forma a retirar os sais e a tripsina presente nas amostras, estas passaram numa coluna. A coluna de 1:1 (v/v) de TFA a 0.1 % com pH passou por um pré-tratamento de três passos, primeiro humedeceu-se (400 µl de ACN) de seguida lavou-se (300 µl de TFA a 0,1% em 80% ACN) e por fim equilibrou-se (300 µl de TFA a 0,1%). As amostras foram, então, carregadas e a coluna foi, novamente, lavada com 300 µl de TFA a 0,1%. Por último, a coluna foi colocada num novo eppendorf de 1,5 mL e os péptidos foram eluídos lentamente 200 µl de TFA a 0,1% em 80% ACN. Secaram-se por fim as amostras na SpeedVac e armazenaram-se a -20 °C para posterior análise.

Como esta técnica só permite a comparação entre duas amostras ao mesmo tempo. Assim, foram analisadas seis combinações: W2K/W2S, W2K/W2mefK, W2S/W2mefS, W2K/W2mefS, W2S/W2mefK e W2mefK/W2mefS.

IV.3.6. Marcação com iTRAQ®

Para proceder à marcação com iTRAQ® (AB Sciex®), suspenderam-se 70µg de amostra em 300µl TEAB e 36µl de 50mM TECEP de forma a neutralizar as amostras devido à presença da ureia e do triton X-100.

As amostras foram deixadas a incubar durante uma hora, a 37°C, com agitação (850rpm). De seguida foram adicionados às amostras 18µl de MMTS, 200mM e de novo colocadas sobre agitação a incubar à temperatura ambiente. Por fim foi adicionada tripsina, 10ng/µl e deixadas em incubação “overnight”, a 37°C com agitação suave.

As amostras foram, então secas na speedvac tendo-se, posteriormente, adicionado 100µl de 30% TEAB 0,5M e 70% etanol. De seguida as amostras foram deixadas a incubar à temperatura ambiente durante duas horas. Findo este tempo foram adicionados 100 µl de H₂O (miliQ) de modo a parar a reação e deixados novamente a incubar durante 30 min, à temperatura ambiente.

Por fim as diferentes amostras foram misturadas e os *vials* foram lavados com 100 µl de ACN 50% de forma a minimizar perdas de amostra. No final as amostras foram secas na SpeedVac.

IV.3.7. Zimografia por eletroforese SDS – PAGE

A zimografia é uma técnica eletroforética específica para detetar atividade enzimática. O processo é muito semelhante à electroforese em SDS-PAGE normal. A atividade proteolítica das amostras foi analisada por zimografia em gel de SDS-PAGE (10%, com adição de 0,05% de gelatina, que atua como substrato das proteases). A corrida do gel durou aproximadamente 1hora a 180volts em tampão de corrida (100mM de Tris, 100mM de Bicina e 0,1%SDS). De seguida o gel foi incubado em tampão de renaturação (2,5% Triton X-100), durante 30 min, seguido de nova incubação durante 30min após substituição da

solução de renaturação. O gel foi posteriormente incubado em tampão de desenvolvimento (50mM Tris pH 7,4, 5mM NaCl, 10mM CaCl₂, 1mM ZnCl₂, 0,02% v/v Triton X-100), durante 30min à Tamb com agitação suave, seguida de nova incubação overnight a 37°C, com agitação suave, em tampão de desenvolvimento fresco. O procedimento foi posteriormente repetido com adição ao tampão de renaturação de inibidor S64, que é um inibidor cistaínico.

IV.3.8. Coloração com Coomassie Coloidal e Nitrato de Prata

Os géis realizados foram revelados utilizando o corante Azul de Coomassie Coloidal (0,12% G250 em 20% de metanol) por incubação de 12 horas após fixação com uma solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético durante 1 hora. Os géis foram descorados fazendo várias lavagens com 25% de metanol, até todo o ruído de fundo ter sido eliminado, e por fim foram colocados em água destilada. De modo a aumentar a sensibilidade da coloração alguns dos géis foram corados recorrendo à técnica de coloração com nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por Vitorino *et al.* [133]. Os géis foram digitalizados no Molecular Imager Gel Doc XR + System (Bio-Rad®) e analisados com o software *QuantityOne® 22.0 1-D Analysis Software*. Para esta análise começou-se por definir os limites de densidade ótica, selecionando-se para o efeito a banda com maior densidade ótica (DO), mas não saturado, e a banda com menor DO mas superior ao ruído de fundo do gel. As bandas foram assinalados automaticamente de acordo com os critérios definidos. Todos as bandas foram verificados manualmente, tendo particular atenção as bandas não assinalados bem como os sobrepostos nas bandas de maior dimensão. Após o *matchset* procedeu-se à normalização das DO tendo como fator de correção a razão da DO de cada banda individual vs a DO total do gel. Os valores obtidos de DO já normalizados foram exportados para uma folha de cálculo do Microsoft Office Excel® onde se procedeu ao cálculo dos rácios de DO, indicadores de expressão proteica, entre as diferentes amostras.

IV.3.9. Digestão Triptica *in-gel*

Os *spots* dos géis de SDS e da Zimografia foram excisados e posteriormente digeridos enzimaticamente de acordo com o protocolo descrito por Detweiler *et al.* [134]. Resumidamente, os *spots* foram lavados duas vezes com 50µl de hidrogenocarbonato de amónio a 50mM e 50% de acetonitrilo (ACN), de modo a desidratar e remover o corante do gel. Após secagem sob vácuo na SpeedVac® Plus SC 210 A (Thermo Savant, USA), as bandas foram incubadas com 25µl de tripsina porcina modificada (Catálogo nº V511A, Promega Corporation, USA) com a concentração de 10µg/ml preparada em hidrogenocarbonato de amónio 50mM. Após 1 hora a 37°C foi adicionado hidrogenocarbonato de amónio 50mM de modo a cobrir todos os pedaços de gel, que

permaneceram a 37°C durante a noite. As proteínas foram então extraídas com uma solução de ácido fórmico 10% e ACN 100%, secas sob vácuo e guardados a 80°C.

IV.3.10. Separação proteica por LC

Os péptidos foram carregados numa pré-coluna C18 (5µm de tamanho de partícula, 5mm, da Dionex) ligada a uma coluna RP PepMap100 C18 (150mm x 75 µm I.D., 3 µm de tamanho de partícula). O fluxo foi acertado para 300 nl/min. As fases móveis A e B foram compostas por 2% ACN 0.1% TFA em água e 95 % ACN, 0.045 % TFA respetivamente. O gradiente foi iniciado aos 10min, progredindo entre os 10 e os 50min até aos 60 % de solvente B, entre os 50 e 55 min, 60 a 100 % de B, e mantido a 100 % de B até aos 65 min. A coluna foi equilibrada com solvente A, durante vinte minutos até à injeção de nova amostra.

A separação peptídica foi monitorizada a 214 nm, através da utilização de um detetor de UV (Dionex/LC Packings, Sunnyvale, CA) equipado com uma célula de fluxo de 3nL. As alíquotas foram aplicadas automaticamente em placas de MALDI, através de um coletor automático *Probot* (Dionex/LC Packings), em frações de 12 segundos, 150nL/fração, com adição contínua de matriz do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (270 nL/min, 2mg/mL em 70% acetonitrilo e 0,3% de ácido trifluoracético suplementada com padrão interno Glu-Fib (15fmol)). Foram coletadas 208 frações por cada separação efetuada.

IV.3.11. Análise por Espetrometria de Massa

Os digestos secos resultantes da digestão dos *spots* retirados dos géis e provenientes do LC foram ressuspendidos em 5% de ACN e 0,3% de ácido fórmico e aplicados numa placa de MALDI com matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico (5mg/mL preparada em 50% ACN e 0,1% de ácido trifluoracético (TFA)).

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyser, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com refletão em modo positivo e no intervalo de massa entre 700 e 4500Da. Para cada amostra, foi criado um método de aquisição de dados para selecionar os seis picos mais intensos, excluindo os originados a partir da matriz, autólise da tripsina, ou picos de acrilamida, para subsequente aquisição de dados MS/MS. Os picos da autólise da tripsina foram utilizados para a calibração interna dos espectros de massa, o que permitiu uma exatidão de massa superior a 20 ppm.

IV.3.12. Análise dos espectros obtidos

Os espectros obtidos foram então processados e analisados pela Global Protein Server (GPS) Workstation (Applied Biosystems), que usa como motor de busca o MASCOT (v2.1.1.

Matrix Science, London, UK) [135] para a pesquisa de *peptide mass fingerprints* e dos dados de MS/MS nas bases de dados não redundantes da UniProt [136] e da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A tolerância de desvios de massa introduzidos na pesquisa para a massa do péptido foi de ± 25 ppm e para a massa dos iões fragmento foi de $\pm 0,3$ Da, a identificação das proteínas foi aceite para um grau de confiança superior a 98% e quando considerados mais de quatro péptidos.

Os espetros de massa foram também processados e analisados pelo software Protein Pilot (v4.0 AB Sciex, USA), que usa o algoritmo *paragon* para a identificação de péptidos/proteínas baseada em dados de MS/MS nas bases de dados não redundantes da UniProt [136] e da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Foram utilizados os seguintes padrões de pesquisa: a tripsina foi especificada como enzima de digestão, modificação na metiltio, nos resíduos de cisteína e iTRAQ 8plex, como tolerância para a massa dos precursores e fragmentos foram definidos os valores padrão do ProteinPilot[®], apenas foram aceites identificações com ProteoScore >1.3 (95%confiança).

Os resultados foram normalizados através do “bias correction”, que é um algoritmo do Protein Pilot que corrige a mistura desigual quando são combinadas amostras marcadas numa experiência. Esta correção é realizada através do cálculo da razão da proteína mediana das proteínas totais identificadas para cada amostra, ajustando para a unidade e atribuindo um factor autobias. No entanto, os resultados da quantificação foram analisados manualmente para todas as proteínas que se encontram a ser diferencialmente expressos.

V. Apresentação de Resultados

V. Apresentação de Resultados

V.1. Identificação de proteínas

Os extratos proteicos obtidos foram digeridos de forma a comparar as amostras procedeu-se à marcação isotópica com H₂O¹⁸ (O¹⁸) e iTRAQ. Os péptidos formados foram separados por LC e posteriormente analisados por MS/MS MALDI para a identificação de proteínas. As identificações proteómicas de *P. falciparum* e *Homo sapiens* são apresentadas na Tabela 1. De referir que a tabela apresentada representa o total das identificações realizadas durante a fase experimental da presente dissertação e que para a construção da lista de proteínas identificadas apenas foram consideradas as proteínas cujo “Total Ion Score C.I.%” obtido foi superior a 98%.

Tabela 1 - Listagem das proteínas de *P. falciparum* e *Homo sapiens* identificadas por MS/MS MALDI após marcação com O¹⁸ e iTRAQ

ID	Protein Name	Accession Number	Protein MW	Protein PI	Peptide Count	Total Ion Score	Total Ion Scor C.I. %	O ¹⁸	iTRAQ
1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 GN=PSMD2	PSMD2_HUMAN	100135,789	5,08	2	35,280	98,69	√	
2	40S ribosomal protein S18 GN=RPS18	RS18_HUMAN	17707,8593	10,99	2	45,520	99,87	√	
3	40S ribosomal protein S8 GN=RPS8	RS8_HUMAN	24190,1601	10,32	4	97,740	100,00	√	
4	40S ribosomal protein SA (isolate 3D7)	RSSA_PLAF7	29837,3007	5,91	4	125,450	100,00	√	
5	55 kDa erythrocyte membrane protein GN=MPP1	EM55_HUMAN	52263,6484	6,91	3	83,920	100,00	√	
6	60S acidic ribosomal protein P0 (isolate 7G8)	RLA0_PLAF8	34975,4101	6,62	3	37,470	99,98	√	
7	60S acidic ribosomal protein P2	RLA2_PLAFA	11940,8896	4,49	2	155,900	100,00	√	√
8	60S ribosomal protein L19 GN=RPL19	RL19_HUMAN	23451,256	11,48	4	45,374	99,87	√	
9	78 kDa glucose-regulated protein GN=HSPA5	GRP78_HUMAN	72288,4296	5,07	2	42,710	99,76	√	
10	78 kDa glucose-regulated protein homolog (isolate NF54)	GRP78_PLAFO	72731,252	5,18	11	997,610	100,00	√	
11	78 kDa glucose-regulated protein homolog (Fragment)	GRP78_PLAFA	30638,7890	4,73	5	393,190	100,00	√	√
12	Acetyl-CoA carboxylase 2 GN=ACACB	ACACB_HUMAN	276365,342	6,05	6	36,160	98,93	√	
13	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprot 32-related prot (3D7)	AN32_PLAF7	32985,8906	4,27	3	28,114	99,81	√	
14	Actin, alpha skeletal muscle GN=ACTA1	ACTS_HUMAN	42023,8515	5,23	5	235,994	100,00	√	
15	Actin, cytoplasmic 2 GN=ACTG1	ACTG_HUMAN	41765,7890	5,31	7	304,184	100,00	√	√
16	Actin-1 (isolate NF54)	ACT1_PLAFO	41816,0117	5,27	7	252,970	100,00	√	√
17	Actin-2 (isolate NF54)	ACT2_PLAFO	42651,1289	5,21	2	78,890	100,00	√	
18	Adenosylhomocysteinase (isolate 3D7)	SAHH_PLAF7	53804,2304	5,64	2	18,460	98,28	√	
19	Adenylate kinase isoenzyme 1 GN=AK1	KAD1_HUMAN	21621,3105	8,73	4	146,010	100,00	√	√
20	ADP-ribosylation factor 1	ARF1_PLAFA	20898,7695	5,83	3	84,040	100,00	√	
21	Alpha-enolase GN=ENO1	ENOA_HUMAN	47139,3203	7,01	4	168,470	100,00	√	
22	Ankyrin repeat domain-containing protein 11 GN=ANKRD11	ANR11_HUMAN	297731,062	6,7	4	38,934	99,42	√	

23	Ankyrin-1 GN=ANK1	ANK1_HUMAN	206136,921	5,65	29	1526,366	100,00	√	√
24	Ankyrin-3 GN=ANK3	ANK3_HUMAN	480113,437	6,07	2	111,744	100,00	√	
25	AP2/ERF domain-containing protein PFD0985w (isolate 3D7)	AP2A_PLAF7	399922,406	5,68	6	17,664	97,88	√	
26	Arf-GAP coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing prot 3	ACAP3_HUMAN	92436,7031	5,69	3	36,640	99,05	√	
27	Aspartic acid-rich protein (isolate fcm17 / Senegal)	ASP_PLAFS	30229,2793	4,14	4	127,290	100,00	√	
28	AT-hook-containing transcription factor GN=AKNA	AKNA_HUMAN	155043,609	5,91	3	34,834	98,58	√	
29	ATP-binding cassette sub-family A member 12 GN=ABCA12	ABCAC_HUMAN	293046,625	7,89	4	35,854	98,87	√	
30	Band 3 anion transport protein GN=SLC4A1	B3AT_HUMAN	101727,406	5,08	17	1329,680	100,00	√	√
31	Beta-actin-like protein 2 GN=ACTBL2	ACTBL_HUMAN	41975,9687	5,39	4	253,450	100,00	√	
32	Beta-enolase GN=ENO3	ENOB_HUMAN	46902,2812	7,59	4	117,760	100,00	√	
33	Blood group Rh(D) polypeptide GN=RHD	RHD_HUMAN	45180,9414	8,71	2	52,740	99,98	√	
34	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 GN=CELSR2	CELR2_HUMAN	317252,906	5,14	3	36,374	98,98	√	
35	Cadherin-23 GN=CDH23	CAD23_HUMAN	369296,781	4,5	2	38,390	99,34	√	√
36	Carbonic anhydrase 1 GN=CA1	CAH1_HUMAN	28852,3906	6,59	7	242,030	100,00	√	√
37	Carbonic anhydrase 2 GN=CA2	CAH2_HUMAN	29227,9199	6,87	2	92,320	100,00	√	
38	Catalase GN=CAT	CATA_HUMAN	59718,752	6,9	2	49,900	99,95	√	
39	Centrosomal protein of 170 kDa GN=CEP170	CE170_HUMAN	175186,765	6,64	6	43,001	99,78	√	
40	Centrosome and spindle pole-associated protein 1 GN=CSPP1	CSPP1_HUMAN	145432,656	6,37	7	37,360	99,17	√	
41	Chaperonin CPN60, mitochondrial (isolate FCR-3 / Gambia)	CH60_PLAFG	79395,3906	4,91	5	41,460	99,99	√	
42	Cofilin/actin-depolymerizing factor homolog 1 (isolate HB3)	CADF1_PLAFX	13731,9697	7,66	3	115,330	100,00	√	
43	Coiled-coil domain-containing protein 151 GN=CCDC151	CC151_HUMAN	69097,3437	9,11	3	34,764	98,53	√	
44	Coiled-coil domain-containing protein 39 GN=CCDC39	CCD39_HUMAN	109832,664	6,1	5	47,880	99,93	√	
45	Collagen alpha-1(XII) chain GN=COL12A1	COCA1_HUMAN	332940,531	5,38	8	37,379	99,17	√	
46	Cullin-7 GN=CUL7	CUL7_HUMAN	191039,265	5,57	4	39,460	99,50	√	
47	Death-inducer obliterator 1 GN=DIDO1	DIDO1_HUMAN	243720,734	8,09	6	36,780	99,05	√	
48	Dematin GN=EPB49	DEMA_HUMAN	45486,2187	8,94	4	93,910	100,00	√	
49	Dynein heavy chain 1, axonemal GN=DNAH1	DYH1_HUMAN	493655,625	5,66	6	43,444	99,80	√	
50	Dynein heavy chain 17, axonemal GN=DNAH17	DYH17_HUMAN	511459,687	5,56	6	37,111	99,14	√	
51	Dynein heavy chain 3, axonemal GN=DNAH3	DYH3_HUMAN	470468,312	6,04	4	34,854	98,52	√	
52	Dynein heavy chain-like protein MAL7P1.162 (isolate 3D7)	DYHC1_PLAF7	581963,187	6,13	12	57,658	100,00	√	
53	Dynein heavy chain-like protein PF11_0240 (isolate 3D7)	DYHC2_PLAF7	616992,812	5,41	10	27,631	99,79	√	
54	Dysferlin GN=DYSF	DYSF_HUMAN	237144,156	5,44	2	35,490	98,77	√	
55	Dystonin GN=DST	DYST_HUMAN	860127,312	5,14	11	47,577	99,92	√	
56	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 GN=HUWE1	HUWE1_HUMAN	481588,625	5,1	7	43,307	99,79	√	
57	Elongation factor 1-alpha (isolate K1 / Thailand)	EF1A_PLAFK	49009,9882	9,27	12	570,400	100,00	√	√
58	Elongation factor 1-alpha 2 GN=EEF1A2	EF1A2_HUMAN	50438,3085	9,11	3	183,710	100,00	√	
59	Elongation factor 2 GN=EEF2	EF2_HUMAN	95276,9531	6,41	4	64,540	100,00	√	
60	Enolase	ENO_PLAFA	48673,2812	6,21	11	572,157	100,00	√	√
61	Epiplakin GN=EPPK1	EPIPL_HUMAN	555278,937	5,44	9	51,125	99,97	√	
62	Erythrocyte band 7 integral membrane protein GN=STOM	STOM_HUMAN	31710,7402	7,71	9	303,650	100,00	√	√
63	Erythrocyte membrane protein band 4.2 GN=EPB42	EPB42_HUMAN	76960,7031	8,39	7	368,780	100,00	√	√
64	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 GN=EIF5A2	IF5A2_HUMAN	16782,2402	5,38	1	35,850	98,82	√	
65	Exostosin-2 GN=EXT2	EXT2_HUMAN	82201,9843	6,12	3	35,120	98,67	√	

66	FERM domain-containing protein 5 GN=FRMD5	FRMD5_HUMAN	65023,4882	8,62	4	36,990	99,13	√
67	Fibrous sheath-interacting protein 2 GN=FSIP2	FSIP2_HUMAN	780119,125	6,27	9	47,541	99,92	√
68	Flavin reductase GN=BLVRB	BLVRB_HUMAN	22105,4296	7,13	3	85,630	100,00	√
69	Flotillin-1 GN=FLOT1	FLOT1_HUMAN	47325,6210	7,08	3	42,170	99,73	√
70	Fructose-bisphosphate aldolase	ALF_PLAFA	40079,8789	8,33	4	105,970	100,00	√ √
71	Gamma-enolase GN=ENO2	ENOG_HUMAN	47239,1435	4,91	3	119,740	100,00	√
72	Glutathione reductase (isolate K1 / Thailand)	GSHR_PLAFK	56525,8007	8,44	5	25,031	99,61	√
73	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=GAPDH	G3P_HUMAN	36030,3984	8,57	3	295,360	100,00	√ √
74	Glycophorin-A GN=GYPA	GLPA_HUMAN	16321,4101	5,29	3	49,160	99,95	√
75	Glycophorin-binding protein (isolate 3D7)	GBP_PLAF7	95786,0390	5,02	3	35,934	99,97	√
76	Glycophorin-C GN=GYPC	GLPC_HUMAN	13801,6796	4,69	2	156,160	100,00	√
77	Golgin subfamily A member 3 GN=GOLGA3	GOGA3_HUMAN	167252,281	5,34	3	39,660	99,52	√
78	Golgin subfamily A member 4 GN=GOLGA4	GOGA4_HUMAN	260979,734	5,33	5	39,644	99,51	√
79	G-protein coupled receptor 98 GN=GPR98	GPR98_HUMAN	692246,875	4,53	6	44,344	99,84	√
80	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN_PLAFA	24859,7693	7,72	2	138,150	100,00	√ √
81	GTP-binding nuclear protein Ran GN=RAN	RAN_HUMAN	24407,6191	7,01	2	79,510	100,00	√
82	Heat shock 70 kDa protein	HSP70_PLAFA	74240,6093	5,51	12	969,930	100,00	√ √
83	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B GN=HSPA1A	HSP71_HUMAN	70009,0312	5,48	2	194,020	100,00	√
84	Heat shock cognate 71 kDa protein GN=HSPA8	HSP7C_HUMAN	70854,2187	5,37	2	114,140	100,00	√
85	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial GN=TRAP1	TRAP1_HUMAN	80059,6875	8,3	4	84,874	100,00	√
86	Heat shock protein HSP 90-alpha GN=HSP90AA1	HS90A_HUMAN	84606,6796	4,94	4	174,084	100,00	√
87	Heat shock protein HSP 90-beta GN=HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83212,1015	4,97	3	141,380	100,00	√
88	Heat shock-related 70 kDa protein 2 GN=HSPA2	HSP72_HUMAN	69977,8593	5,56	3	37,840	99,26	√
89	Helicase SRCAP GN=SRCAP	SRCAP_HUMAN	343342,843	5,69	8	64,810	100,00	√
90	Hemicentin-1 GN=HMCN1	HMCN1_HUMAN	613001,312	6,07	9	35,829	98,81	√
91	Hemoglobin subunit alpha GN=HBA1	HBA_HUMAN	15247,9296	8,72	6	731,714	100,00	√ √
92	Hemoglobin subunit beta GN=HBB	HBB_HUMAN	15988,2900	6,75	8	655,690	100,00	√ √
93	Hemoglobin subunit delta GN=HBD	HBD_HUMAN	16045,2900	7,85	6	325,760	100,00	√
94	Hexokinase	HXK_PLAFA	55310,7695	7,04	3	44,614	100,00	√
95	Histone H2A	H2A_PLAFA	14113,7402	10,29	2	52,230	100,00	√ √
96	Histone H2A type 1-B/E GN=HIST1H2AB	H2A1B_HUMAN	14126,9502	11,05	2	52,230	99,97	√
97	Histone H2A.V GN=H2AFV	H2AV_HUMAN	13500,5302	10,58	3	37,270	99,19	√
98	Histone H2A.Z GN=H2AFZ	H2AZ_HUMAN	13544,5498	10,58	2	43,450	99,79	√
99	Histone H3.1 GN=HIST1H3A	H31_HUMAN	15394,4807	11,13	3	56,660	99,99	√
100	Histone H3.1t GN=HIST3H3	H31T_HUMAN	15498,5097	11,13	4	58,000	99,99	√
101	Histone H3.3C GN=H3F3C	H3C_HUMAN	15204,3496	11,1	4	55,340	99,99	√
102	Histone H4 GN=HIST1H4A	H4_HUMAN	11360,3798	11,36	3	70,580	100,00	√
103	Hornerin GN=HRNR	HORN_HUMAN	282227,625	10,05	9	295,481	100,00	√
104	Huntingtin GN=HTT	HD_HUMAN	347382,781	5,81	4	35,674	98,83	√
105	Hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase (FCR-/G)	HGXR_PLAFG	26331,5195	7,06	2	129,670	100,00	√
106	Integrin alpha-IIb GN=ITGA2B	ITA2B_HUMAN	113305,507	5,21	5	66,080	100,00	√
107	Kell blood group glycoprotein GN=KEL	KELL_HUMAN	82770,9218	8,09	1	44,050	99,82	√

108	Keratin, type I cytoskeletal 10 GN=KRT10	K1C10_HUMAN	58791,6914	5,13	8	297,900	100,00	√	√
109	Keratin, type I cytoskeletal 9 GN=KRT9	K1C9_HUMAN	62026,8085	5,14	9	628,140	100,00	√	√
110	Keratin, type II cytoskeletal 1 GN=KRT1	K2C1_HUMAN	65999,6345	8,15	5	557,350	100,00	√	√
111	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal GN=KRT2	K22E_HUMAN	65393,2109	8,07	10	351,670	100,00	√	√
112	Keratin, type II cytoskeletal 3 GN=KRT3	K2C3_HUMAN	64377,5585	6,12	2	37,460	99,22	√	√
113	Keratin, type II cytoskeletal 6A GN=KRT6A	K2C6A_HUMAN	60008,2695	8,09	4	101,894	100,00	√	√
114	Keratin, type II cytoskeletal 73 GN=KRT73	K2C73_HUMAN	58886,7382	6,93	3	46,040	99,89	√	√
115	Kinase suppressor of Ras 1 GN=KSR1	KSR1_HUMAN	101967,640	8,94	5	37,780	99,27	√	√
116	Limbin GN=EVC2	LBN_HUMAN	147855,046	6,53	5	35,260	98,69	√	√
117	L-lactate dehydrogenase (isolate CDC / Honduras)	LDH_PLAFD	34085,9882	7,12	5	153,040	100,00	√	√
118	LRR domain-containing protein PF14_0175 (isolate 3D7)	LRR1_PLAF7	548525,687	8,87	8	19,999	98,79	√	√
119	LRR domain-containing protein PFC0760c (isolate 3D7)	LRR4_PLAF7	402704,468	4,68	5	17,433	97,71	√	√
120	LRR domain-containing protein PFF0380w (isolate 3D7)	LRR2_PLAF7	324817,523	6,62	11	22,104	99,21	√	√
121	M1 family aminopeptidase (isolate FcB1 / Columbia)	AMP1_PLAFQ	125982,687	7,3	6	147,934	100,00	√	√
122	Malaria protein EXP-1	EXP1_PLAFA	17439,0195	5,24	2	152,190	100,00	√	√
123	MATH and LRR domain-containing protein PFE0570w (3D7)	MLRR1_PLAF7	1186842,43	7,36	21	43,484	99,99	√	√
124	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14	MED14_HUMAN	160504,015	8,97	5	40,740	99,62	√	√
125	Merozoite surface antigen 2 (isolate K1 / Thailand)	MSA2_PLAFK	29524,1308	5,66	2	21,700	99,18	√	√
126	Merozoite surface protein 1 (isolate Camp / Malaysia)	MSP1_PLAFC	196076,703	5,99	14	319,254	100,00	√	√
127	Merozoite surface protein 1 (FC27 / Papua New Guinea)	MSP1_PLAFF	193599,843	6,08	13	312,634	100,00	√	√
128	Merozoite surface protein 1 (isolate K1 / Thailand)	MSP1_PLAFK	187174,062	5,92	7	108,610	100,00	√	√
129	Merozoite surface protein 1 (mad20 / Papua New Guinea)	MSP1_PLAFM	193600,796	6,08	10	259,089	100,00	√	√
130	Merozoite surface protein 1 (isolate Palo Alto / Uganda)	MSP1_PLAFP	196053,687	5,98	15	316,374	100,00	√	√
131	Merozoite surface protein 1 (isolate ro-33 / Ghana)	MSP1_PLAF3	192343,703	6,36	13	330,709	100,00	√	√
132	Merozoite surface protein 1 (isolate Wellcome)	MSP1_PLAFW	187502,218	5,98	4	87,400	100,00	√	√
133	Misshapen-like kinase 1 GN=MINK1	MINK1_HUMAN	149728,562	7,85	3	37,354	99,17	√	√
134	Multidrug resistance protein (FC27 / Papua New Guinea)	MDR_PLAFF	162149,656	8,94	4	152,180	100,00	√	√
135	Myosin-10 GN=MYH10	MYH10_HUMAN	228857,953	5,44	8	41,644	99,70	√	√
136	Myosin-14 GN=MYH14	MYH14_HUMAN	227862,812	5,76	8	48,484	99,94	√	√
137	Myotubularin-related protein 9 GN=MTMR9	MTMR9_HUMAN	63421,1210	5,98	3	37,580	99,21	√	√
138	Nebulin GN=NEB	NEBU_HUMAN	772441,259	9,11	6	45,711	99,88	√	√
139	Nesprin-2 GN=SYNE2	SYNE2_HUMAN	795943,564	5,26	8	50,063	99,96	√	√
140	Ninein GN=NIN	NIN_HUMAN	243097,812	4,99	8	41,514	99,68	√	√
141	Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2 GN=TYK2	TYK2_HUMAN	133564,562	6,71	6	40,740	99,62	√	√
142	Nuclear mitotic apparatus protein 1 GN=NUMA1	NUMA1_HUMAN	238115,218	5,63	7	47,267	99,92	√	√
143	Nuclear pore complex protein Nup205 GN=NUP205	NU205_HUMAN	227776,265	5,81	5	54,770	99,99	√	√
144	Obscurin GN=OBSCN	OBSCN_HUMAN	867940,252	5,69	13	68,389	100,00	√	√
145	Origin recognition complex subunit 1 (isolate 3D7)	ORC1_PLAF7	138652,656	9,52	7	15,970	96,95	√	√
146	Ornithine aminotransferase (isolate CDC / Honduras)	OAT_PLAFD	46025,4492	6,47	3	117,687	100,00	√	√
147	Periplakin GN=PPL	PEPL_HUMAN	204623,015	5,47	4	42,104	99,72	√	√
148	Peroxiredoxin-2 GN=PRDX2	PRDX2_HUMAN	21878,2402	5,66	2	53,760	99,98	√	√
149	Phosphoglycerate kinase (isolate 3D7)	PGK_PLAF7	45398,0898	7,63	11	645,810	100,00	√	√
150	Plectin GN=PLEC	PLEC_HUMAN	531466,625	5,74	11	51,995	99,97	√	√

151	Plexin-D1 GN=PLXND1	PLXD1_HUMAN	211871,375	6,8	5	36,390	98,99	√
152	Polymeric immunoglobulin receptor GN=PIGR	PIGR_HUMAN	83231,6562	5,58	4	34,900	98,53	√
153	POTE ankyrin domain family member E GN=POTEE	POTEE_HUMAN	121285,656	5,83	3	94,374	100,00	√
154	POTE ankyrin domain family member F GN=POTEF	POTEF_HUMAN	121366,687	5,83	4	104,414	100,00	√
155	POTE ankyrin domain family member I GN=POTEI	POTEI_HUMAN	121204,507	5,83	4	123,210	100,00	√
156	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60 GN=DDX60	DDX60_HUMAN	197725,534	7,53	4	54,700	99,99	√
157	Probable cathepsin C (isolate 3D7)	CATC_PLAF7	80361,1406	5,82	4	78,200	100,00	√
158	Probable DNA repair protein RAD50 (isolate 3D7)	RAD50_PLAF7	267786,156	8,78	7	35,929	99,97	√
159	Probable helicase senataxin GN=SETX	SETX_HUMAN	302687,125	6,83	5	38,458	99,36	√
160	Profilin (isolate HB3)	PROF_PLAFX	18876,1406	4,24	2	36,390	99,97	√
161	Proliferating cell nuclear antigen (isolate K1 / Thailand)	PCNA_PLAFK	30567,5293	4,7	3	40,960	99,99	√
162	Protein 4.1 GN=EPB41	41_HUMAN	96957,2812	5,42	6	135,980	100,00	√
163	Protein BAT2-like 1 GN=BAT2L1	BA2L1_HUMAN	242817,390	8,55	10	71,666	100,00	√
164	Protein GREB1 GN=GREB1	GREB1_HUMAN	216329,812	6,49	4	38,480	99,37	√
165	Protein Shroom3 GN=SHROOM3	SHRM3_HUMAN	216724,312	7,87	5	38,224	99,35	√
166	Protein WWC2 GN=WWC2	WWC2_HUMAN	133808,640	5,4	4	34,714	98,54	√
167	Putative beta-actin-like protein 3 GN=POTEKP PE=5	ACTBM_HUMAN	41988,8398	5,91	3	75,620	100,00	√
168	Putative cell division cycle ATPase (isolate 3D7)	CDAT_PLAF7	141991,406	9,07	6	31,067	99,90	√
169	Putative E3 ubiquitin-protein ligase protein PFF1365c (3D7)	ALTH1_PLAF7	1205255,37	8,19	15	35,424	99,96	√
170	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 GN=EEF1AL3 PE=5	EF1A3_HUMAN	50153,1484	9,15	3	77,700	100,00	√
171	Putative histone-lysine N-methyltransferase PFF1440w (3D7)	HKNMT_PLAF7	795538,983	8,81	14	36,909	99,97	√
172	Putative Ras-related protein Rab-1C GN=RAB1C PE=5	RAB1C_HUMAN	22003,0293	5,25	2	73,940	100,00	√
173	Putative RNA-binding protein 15 GN=RBM15	RBM15_HUMAN	107124,023	10,09	5	37,564	99,23	√
174	Putative tropomyosin alpha-3 chain-like protein PE=5	TPM3L_HUMAN	26252,9101	4,47	2	44,570	99,84	√
175	Rab11 family-interacting protein 1 GN=RAB11FIP1	RFIP1_HUMAN	137110,921	5,32	4	36,334	98,95	√
176	RAD51-associated protein 1 GN=RAD51AP1	R51A1_HUMAN	38433,9101	9,18	3	40,004	99,56	√
177	Ras-related protein Rab-11B GN=RAB11B	RB11B_HUMAN	24473,4804	5,64	2	50,520	99,96	√
178	Ras-related protein Rab-15 GN=RAB15	RAB15_HUMAN	24375,1894	5,53	2	66,380	100,00	√
179	Ras-related protein Rab-33B GN=RAB33B	RB33B_HUMAN	25700,8183	6,71	3	80,300	100,00	√
180	Ras-related protein Rab-6B GN=RAB6B	RAB6B_HUMAN	23446,8828	5,41	2	66,380	100,00	√
181	Ras-related protein Rab-8A GN=RAB8A	RAB8A_HUMAN	23653,1894	9,15	2	55,504	99,99	√
182	Ras-related protein Rap-1b GN=RAP1B	RAP1B_HUMAN	20811,5898	5,65	2	67,660	100,00	√
183	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S GN=PTPRS	PTPRS_HUMAN	216903,516	6,06	5	36,170	98,95	√
184	Reticulocyte binding protein 2 homolog b (isolate 3D7)	RBP2B_PLAF7	373960,093	5,15	11	43,349	99,99	√
185	Reticulocyte-binding protein 2 homolog a (isolate 3D7)	RBP2A_PLAF7	370208,187	5,44	11	46,853	100,00	√
186	Reticulocyte-binding protein 3 (isolate 3D7)	RBP3_PLAF7	328742,812	5,97	12	25,546	99,65	√
187	Reticulocyte-binding protein PFD0110w (isolate 3D7)	RBP1_PLAF7	357601,593	8,01	5	25,540	99,65	√
188	Rho guanine nucleotide exchange factor 11 GN=ARHGEF11	ARHGB_HUMAN	167600,828	5,33	8	36,920	99,10	√
189	RIMS-binding protein 3B GN=RIMBP3B	RIM3B_HUMAN	169811,234	6,11	5	36,604	99,05	√
190	Ring-infected erythrocyte surface antigen (isolate FC27)	RESA_PLAFF	124830,023	4,46	2	69,270	100,00	√
191	Ryanodine receptor 2 GN=RYSR2	RYSR2_HUMAN	564206,25	5,73	7	47,344	99,92	√
192	Sentrin-specific protease 7 GN=SEN7	SEN7_HUMAN	119583,601	6,19	5	36,749	99,04	√

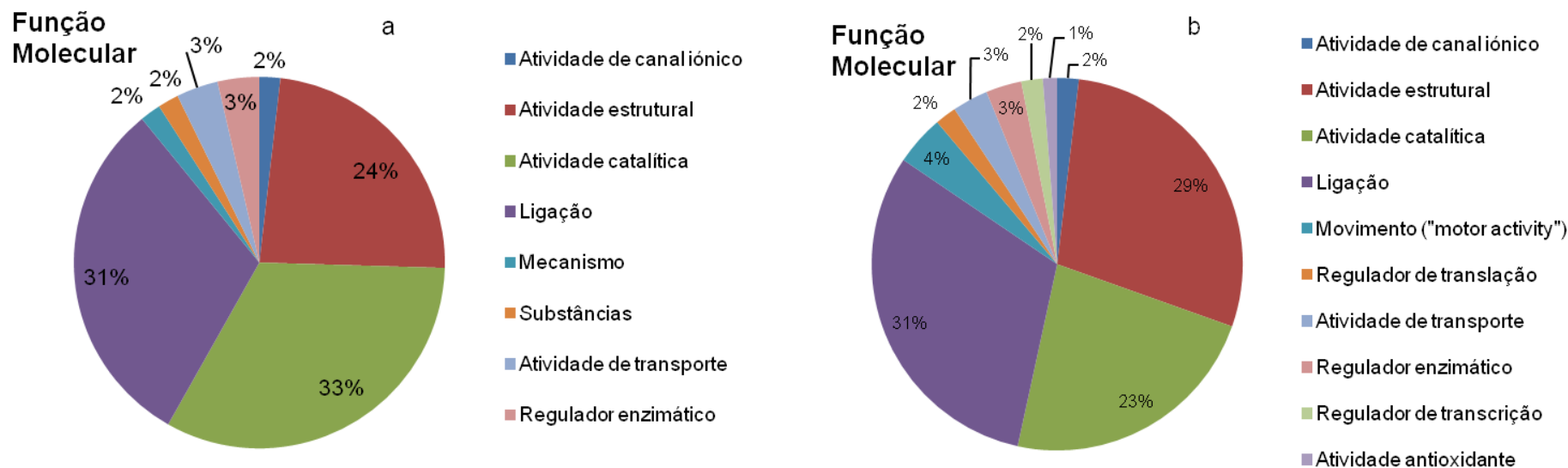
193	Serine/arginine repetitive matrix protein 2 GN=SRRM2	SRRM2_HUMAN	299434,593	12,05	5	39,190	99,48	√	
194	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1 GN=TLK1	TLK1_HUMAN	86646,1484	8,88	4	40,364	99,59	√	
195	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2 GN=TLK2	TLK2_HUMAN	87606,521	8,65	3	36,820	99,08	√	
196	Serum albumin GN=ALB	ALBU_HUMAN	69321,4921	5,92	3	135,270	100,00	√	√
197	Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic (isolate 3D7)	SYSC_PLAF7	73226,3281	9,58	4	16,440	97,12	√	
198	Solute carrier family2, facilitated glucose transporter member1	GTR1_HUMAN	54048,5312	8,93	5	237,170	100,00	√	√
199	Sorting nexin-5 GN=SNX5	SNX5_HUMAN	46787,1484	6,31	2	35,664	98,80	√	
200	Spectrin alpha chain, erythrocyte GN=SPTA1	SPTA1_HUMAN	279841,875	4,95	64	3238,656	100,00	√	√
201	Spectrin beta chain, brain 1 GN=SPTBN1	SPTB2_HUMAN	274438,687	5,39	6	53,710	99,98	√	
202	Spectrin beta chain, brain 2 GN=SPTBN2	SPTN2_HUMAN	271157,125	5,79	7	49,610	99,95	√	
203	Spectrin beta chain, erythrocyte GN=SPTB	SPTB1_HUMAN	246315,734	5,15	60	2937,027	100,00	√	√
204	StAR-related lipid transfer protein 9 GN=STARD9	STAR9_HUMAN	506434,875	6,02	9	44,097	99,83	√	
205	STI1-like protein (isolate 3D7)	STI1L_PLAF7	66015,4296	6,63	5	38,000	99,98	√	
206	Stomatin-like protein 3 GN=STOML3	STML3_HUMAN	32115,2109	8,83	2	42,280	99,73	√	
207	Stress-70 protein, mitochondrial GN=HSPA9	GRP75_HUMAN	73634,7734	5,87	2	114,640	100,00	√	√
208	Striated muscle preferentially expressed protein kinase	SPEG_HUMAN	354070,562	8,82	5	42,403	99,75	√	
209	Structural maintenance of chromosomes prot3 homolog (3D7)	SMC3_PLAF7	141136,921	6,48	6	30,560	99,89	√	
210	TATA-box-binding protein	TBP_PLAFA	26143,8906	9,27	2	17,710	97,91	√	
211	Tau-tubulin kinase 2 GN=TTBK2	TTBK2_HUMAN	137327,687	6,54	4	40,460	99,61	√	
212	T-complex protein 1 subunit alpha GN=TCP1	TCPA_HUMAN	60305,5781	5,8	4	34,990	98,63	√	
213	Titin GN=TTN	TITIN_HUMAN	3813809,57	6,01	39	93,890	100,00	√	
214	TPR and ankyrin repeat-containing protein 1 GN=TRANK1	TRNK1_HUMAN	336007,476	6,34	7	48,963	99,94	√	
215	Translation factor GUF1 homolog, mitochondrial (isolate 3D7)	GUF1_PLAF7	126848,093	8,97	6	36,344	99,97	√	
216	Translationally-controlled tumor protein homolog (3D7)	TCTP_PLAF7	19966,6894	4,58	2	39,940	99,99	√	
217	Transmission-blocking target antigen S230 (isolate NF54)	S230_PLAFO	362989,843	5,3	7	27,110	99,77	√	
218	Trichohyalin GN=TCHH	TRHY_HUMAN	253776,906	5,73	9	58,227	99,99	√	
219	Triosephosphate isomerase	TPIS_PLAFA	27917,3300	6,01	5	123,950	100,00	√	
220	Triple functional domain protein GN=TRIO	TRIO_HUMAN	346682,753	5,94	10	48,541	99,94	√	
221	Tropomodulin-1 GN=TMOD1	TMOD1_HUMAN	40543,8789	5,03	3	60,810	100,00	√	
222	Tropomodulin-4 GN=TMOD4	TMOD4_HUMAN	39310,5898	4,69	2	40,960	99,64	√	√
223	Tropomyosin alpha-1 chain GN=TPM1	TPM1_HUMAN	32688,6796	4,69	3	70,590	100,00	√	
224	Tropomyosin alpha-4 chain GN=TPM4	TPM4_HUMAN	28504,4902	4,67	2	44,860	99,85	√	
225	Tubulin alpha chain (isolate K1 / Thailand)	TBA_PLAFK	50264,3515	4,93	2	65,150	100,00	√	
226	Tubulin alpha chain-like 3 GN=TUBAL3	TBAL3_HUMAN	49876,7304	5,68	2	47,790	99,92	√	
227	Tubulin beta chain	TBB_PLAFA	49781,8710	4,69	2	24,000	99,47	√	√
228	Tubulin beta chain (isolate K1 / Thailand)	TBB_PLAFK	49718,8515	4,73	7	233,580	100,00	√	
229	Tyrosine-protein kinase SYK GN=SYK	KSYK_HUMAN	72020,3203	8,43	2	36,570	99,00	√	
230	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	PTN23_HUMAN	178860,953	6,45	4	39,810	99,53	√	
231	Ubiquitin conjugation factor E4 B GN=UBE4B	UBE4B_HUMAN	146091,843	6,13	2	41,560	99,68	√	
232	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a GN=RPS27A	RS27A_HUMAN	17953,4902	9,68	2	186,570	100,00	√	√
233	Uncharacterized protein MAL7P1.13 (isolate 3D7)	PF08_PLAF7	34249,7187	5,66	3	20,760	98,93	√	
234	Uncharacterized protein PF11_0207 (isolate 3D7)	YPF05_PLAF7	116278,281	5,78	5	49,107	100,00	√	
235	Uncharacterized protein PF11_0213 (isolate 3D7)	YK213_PLAF7	312814,718	5,54	4	19,491	98,52	√	

236	Uncharacterized protein PF13_0277 (isolate 3D7)	YPF01_PLAF7	248103,937	8,52	6	34,690	99,96	√
237	Uncharacterized protein PFB0315w (isolate 3D7)	YPF14_PLAF7	207712,515	9,38	6	15,100	96,18	√
238	Uncharacterized protein PFB0460c (isolate 3D7)	YPF08_PLAF7	307952,156	5,95	5	18,824	98,38	√
239	Uncharacterized protein PFB0765w (isolate 3D7)	YPF11_PLAF7	166903,375	6,19	4	30,031	99,88	√
240	Uveal autoantigen coiled-coil domains and ankyrin repeats	UACA_HUMAN	162404,437	6,6	4	39,764	99,54	√
241	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1F	CAC1F_HUMAN	220536,531	5,76	5	34,850	98,52	√
242	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H	CAC1H_HUMAN	258997,328	7,12	5	36,364	98,95	√
243	von Willebrand factor GN=VWF	VWF_HUMAN	309055,5	5,29	6	36,154	98,95	√
244	V-type proton ATPase catalytic subunit A	VATA_PLAFA	68532,4531	5,51	6	29,590	99,86	√
245	WD repeat-containing protein 26 GN=WDR26	WDR26_HUMAN	72078,6562	5,74	2	36,620	99,01	√
246	WD repeat-containing protein 62 GN=WDR62	WDR62_HUMAN	165848,437	5,57	2	34,750	98,55	√
247	Zinc finger protein 106 homolog GN=ZFP106	ZF106_HUMAN	208754,437	6,73	5	40,754	99,62	√
248	Zinc finger protein 800 GN=ZNF800	ZN800_HUMAN	75188,7890	9,54	4	35,474	98,71	√

A análise dos digestos por LC-MS/MS MALDI resultou na identificação de um total de 248 proteínas, sendo que destas, 76 são de *P.falciparum* (realçadas a cinza na Tabela 1) e 172 de *Homo sapiens*. Das 76 identificações de proteínas de *P. falciparum*, 15 foram obtidas nas amostras marcadas com O¹⁸ e nas amostras marcadas com iTRAQ, enquanto que as restantes foram obtidas nas amostras marcadas com O¹⁸. Em relação às proteínas de *Homo sapiens* identificadas, das 172 identificações consideradas, 17 foram obtidas após marcação das amostras com O¹⁸ e iTRAQ, 145 apenas após a marcação com O¹⁸ e 10 apenas após a marcação com iTRAQ.

No sentido de catalogar as proteínas de *P. falciparum* e *Homo sapiens* identificadas com base no *Gene ontology annotation*, utilizou-se o *Panther* [137]. Assim, as proteínas identificadas foram classificadas e divididas consoante as “Funções Moleculares” desempenhadas e os “Processos Biológicos” nos quais estão envolvidas, na sua “Localização subcelular” e ainda de acordo com a sua “Classe Proteica” através do sistema de classificação do Panther [137].

Analisando a função molecular das proteínas de *P. falciparum* (Fig. 6a) verifica-se que 83% das proteínas identificadas têm a função de “Molécula de suporte” (20%), de “Atividade catalítica” (37%) e de “Ligação” (26%). O total das proteínas identificadas divide-se em 8 funções moleculares distintas. A análise das funções moleculares desempenhadas pelas proteínas de *Homo sapiens* identificadas (Fig. 6b), demonstra uma predominância das proteínas com função de: “Suporte” (29%), “Atividade catalítica” (23%) e “Ligação” (31%). Estas três classes sozinhas perfazem 83% da totalidade das 10 funções moleculares em que se dividem as proteínas identificadas.



A avaliação dos processos biológicos nos quais as proteínas identificadas de *P. falciparum* estão envolvidas (Fig. 7a), demonstrou que uma grande percentagem das proteínas identificadas, 42%, está relacionada com os processos metabólico (28%) e celular (16%), estando estes dois processos em clara evidência perante uma distribuição muito equitativa dos restantes 13 processos biológicos identificados. Em relação à análise dos processos biológicos nos quais as proteínas de *Homo sapiens* identificadas estão envolvidas (Fig. 7b) surge, tal como no caso da análise às proteínas do parasita, uma predominância dos processos: metabólico (18%) e celular (21%). As proteínas de *Homo sapiens* identificadas dividem-se em 15 processos biológicos distintos.

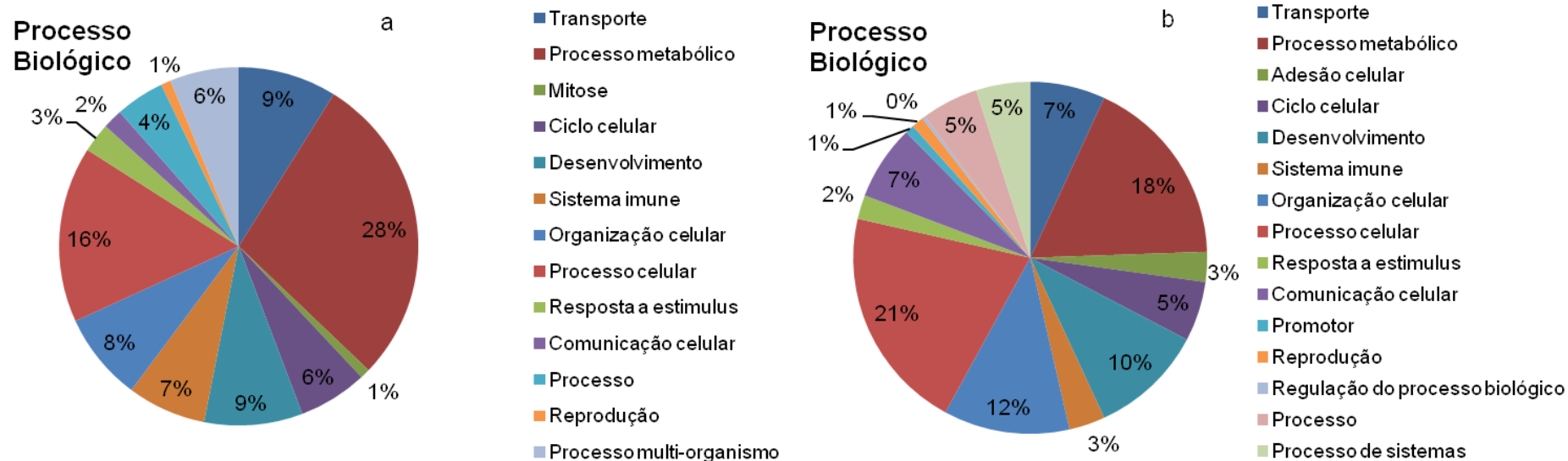


Fig. 7 - Classificação das proteínas de (a) *P. falciparum* e (b) *Homo Sapiens* identificadas, por processo biológico, com base no *Gene ontology annotation*

Analisando as identificações de *P. falciparum* obtidas (Fíg. 8a), através da divisão por classes, de acordo com o Panther [137], verifica-se uma predominância das classes de proteínas “Proteína do citoesqueleto” (21%) e “Ligação a ácidos nucleicos” (14%). As restantes classes apresentam distribuições semelhantes entre si. O total das proteínas identificadas divide-se em 12 classes diferentes. Realizada a mesma análise para as proteínas identificadas de *Homo sapiens* (Fíg. 8b), verifica-se que, tal como na análise realizada para as identificações de *P. falciparum*, existe uma predominância das classes “Proteína do citoesqueleto” (29%) e “Ligação a ácidos nucleicos” (17%) tendo sido identificadas 15 classes diferentes.

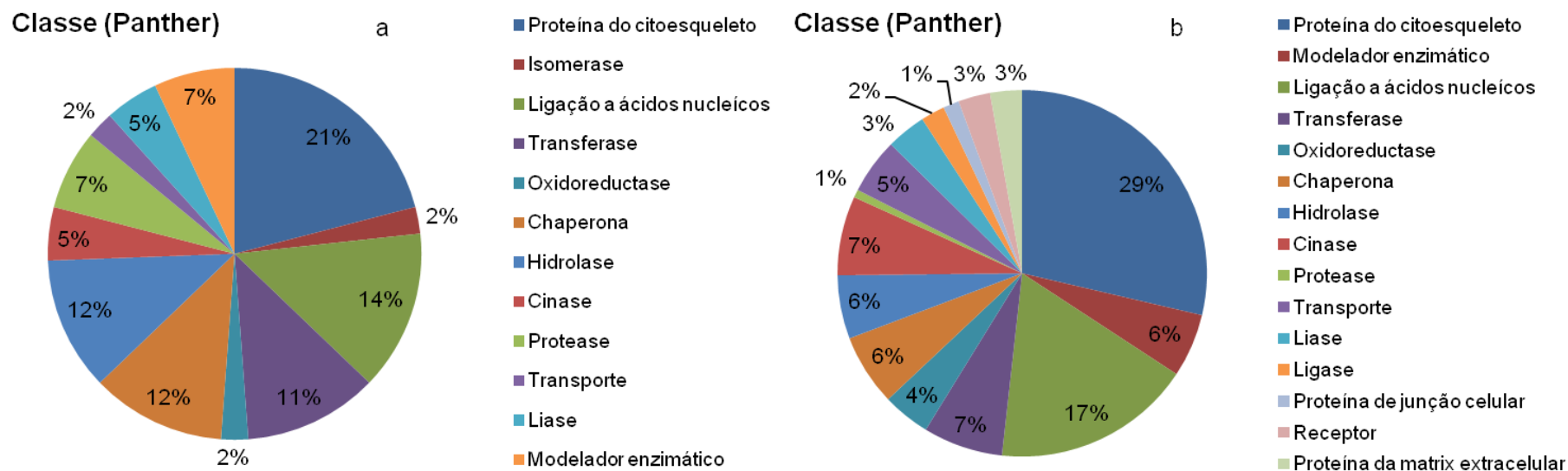


Fig. 8 - Classificação das proteínas de (a) *P. falciparum* e (b) *Homo Sapiens* identificadas, por classe proteica (baseada na classificação do Panther)

Relativamente à localização subcelular das proteínas de *P. falciparum* identificadas (Fíg. 9a), observar-se uma predominância das proteínas do citoplasma (41%) e da membrana celular (31%). Foram identificadas um total de 9 localizações subcelulares distintas. Já no que diz respeito à localização subcelular das proteínas de *Homo sapiens* (Fíg. 9b), verifica-se uma predominância das proteínas do citoplasma (51%). As proteínas de *Homo sapiens* identificadas estão distribuídas por 12 estruturas subcelulares distintas.

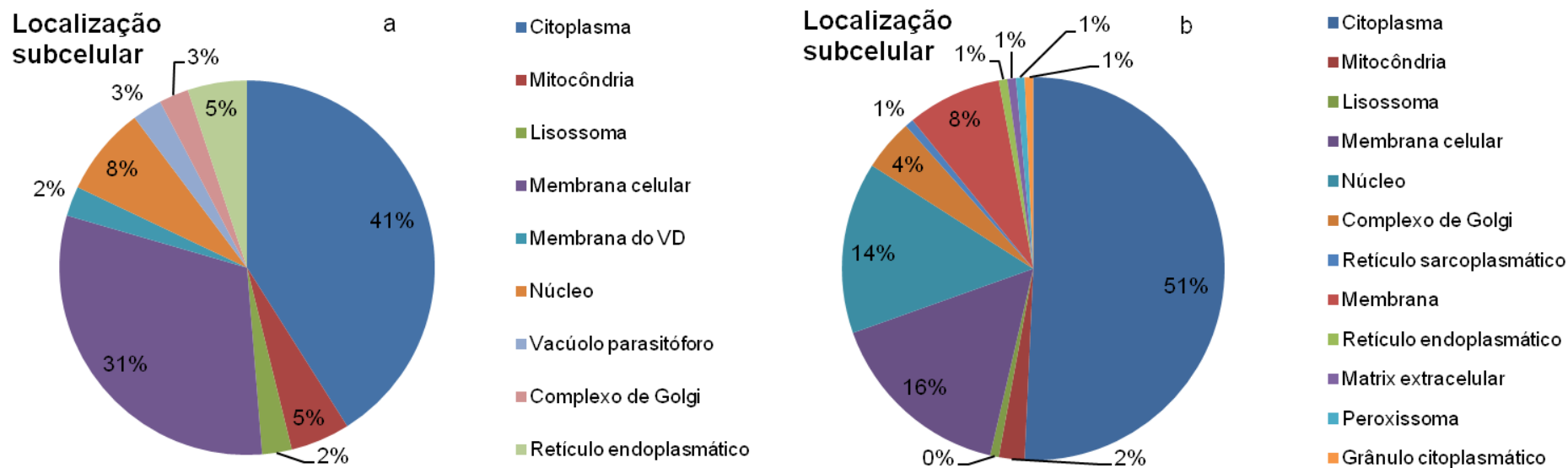


Fig. 9 - Classificação das proteínas de (a) *P. falciparum* e (b) *Homo Sapiens* identificadas, por localização subcelular (baseada na informação da base de dados Uniprot)

V.2. Comparação da expressão proteica

De modo a avaliar e comparar a expressão proteica das diferentes amostras, estas foram marcadas com O¹⁸ e iTRAQs. Na Tabela 2 e na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos, relativos às diferenças de expressão nas proteínas de *P. falciparum* e de *Homo Sapiens* respetivamente. As identificações foram divididas por espécie de forma a simplificar a discussão dos resultados obtidos. Apenas foram considerados para análise os resultados estatisticamente relevantes (de acordo com os critérios estabelecidos na seção de material e métodos).

Na Tabela 2 apresentam-se as proteínas de *P. falciparum*, nas quais foram verificadas diferenças de expressão após marcação com iTRAQs e O¹⁸. Foram identificadas diferenças de expressão em 10 proteínas (Tabela 2), no entanto, apenas foram obtidos resultados comparativos para todas as amostras em teste em 5 proteínas, nomeadamente, Actin-1, Histone H2A, 78 kDa glucose-regulated protein homolog (isolate NF54), Enolase (isolate FCR-3 / Gambia) e Heat shock 70 kDa protein). Estas 5 proteínas foram identificadas após marcação por iTRAQ e O¹⁸, enquanto que as restantes 5 proteínas apenas foram identificadas após marcação com O¹⁸ e os resultados obtidos apenas foram estatisticamente relevantes para alguns dos pares analisados, o que impediu uma análise global da expressão proteica.

Tabela 2 - Diferenças de expressão proteica, estatisticamente significativas, obtidas através da análise por MS/MS MALDI das amostras marcadas com O¹⁸ e iTRAQ – *Plasmodium falciparum*. Legenda: ↑sobre-expressa, 0 sem variações significativas e ↓sub expressa.

Nome	Nº de acesso	W ₂ K	W ₂ S	W ₂ mef K	W ₂ mef S	Péptidos	Metodologia
Actin-1 (isolate 3D7)	ACT1_PLAF7	↑ ↑	0 0	0 ↑	0	10 5	iTRAQ O ¹⁸
Histone H2A	H2A_PLAFA	0 0	↑ ↑	0	↑	7 6	iTRAQ O ¹⁸
78 kDa glucose-regulated protein homolog (isolate NF54)	GRP78_PLAFO	0	↑ ↑	0 ↑	↑↑ ↑↑	13 16	iTRAQ O ¹⁸
Enolase (isolate FCR-3 / Gambia)	ENO_PLAFG	↑↑ 0	0	↑ 0	0 0	33 15	iTRAQ O ¹⁸
Heat shock 70 kDa protein	HSP70_PLAFA	0	↑ ↑↑	0 0	↑ ↑↑	18 19	iTRAQ O ¹⁸
Hexokinase	HXK_PLAFA	↑	0			4	O ¹⁸
Ornithine aminotransferase (isolate 3D7)	OAT_PLAF7	0		↑		12	O ¹⁸
L-lactate dehydrogenase (isolate CDC / Honduras)	LDH_PLAFD	0		↑		13	O ¹⁸
Elongation factor 1-alpha (isolate K1 / Thailand)	EF1A_PLAFK	↑	0			12	O ¹⁸
Fructose-bisphosphate aldolase (isolate 3D7)	ALF_PLAF7	↑	0			3	O ¹⁸

Da análise global, é de salientar que a “Actin-1 (isolate 3D7)”, apresenta uma ligeira sobre-expressão para a estirpe W2 K e para a W2mef K, no entanto, para a amostra W2mef

K estes resultados apenas foram observados para a análise após marcação com O¹⁸. A “Histone 2A”, apresenta uma ligeira sobre-expressão para a estirpe W2 S e para a W2mefS. A análise realizada à “78 kDa glucose-regulated protein homolog (isolate NF54)” apresenta uma ligeira sobre-expressão para a estirpe W2 S e para a W2mef K e uma sobre-expressão muito significativa na amostra W2mef S. Em relação à “Enolase (isolate FCR-3 / Gambia)” apresenta ligeira sobre-expressão para a W2mef K e uma variação bastante significativa para a W2 K.

Proteínas como a “Hexokinase” na “Elongation factor 1-alpha (isolate K1 / Thailand)” e “Fructose-bisphosphate aldolase (isolate 3D7)”, apenas apresentaram um ligeiro aumento de expressão na amostra W2 K em comparação com a amostra W2 S; enquanto que a “Ornithine aminotransferase (isolate 3D7)” e “L-lactate dehydrogenase (isolate CDC / Honduras)” um ligeiro aumento de expressão na amostra W2mef K em comparação com a amostra W2 K;

No que respeita às proteínas humanas, (Tabela 3) foram identificadas diferenças de expressão em 7 proteínas, após marcação por iTRAQ e O¹⁸.

Tabela 3 - Diferenças de expressão proteica, estatisticamente significativos, obtidas através da análise por MS/MS MALDI das amostras marcadas com O¹⁸ e iTRAQ – *Homo sapiens*. Legenda: ↑sobre-expressa, 0 sem variações significativas e ↓sub expressa.

Nome	Número de acesso	W ₂ K	W ₂ S	W ₂ MEF K	W ₂ MEF S	Péptidos	Metodologia
Spectrin alpha chain, erythrocyte	SPTA1_HUMAN	0	↑↑	0	↓	73 11	iTRAQ O ¹⁸
Spectrin beta chain, erythrocyte	SPTB1_HUMAN	0	↑	0	0	65 5	iTRAQ O18
Band 3 anion transport protein	B3AT_HUMAN	0	↑↑	0	0	40 12	iTRAQ O ¹⁸
Ankyrin-1	ANK1_HUMAN	0	↑↑	0	↓	22	iTRAQ
Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN	0	↑↑	↓	0	11	iTRAQ
Keratin, type I cytoskeletal 9	K1C9_HUMAN	0	↑↑	0	↓	8	iTRAQ
Glycophorin-C	GLPC_HUMAN	0	↑↑	0	↓	8	iTRAQ

Da análise global é de salientar a existência de um padrão de expressão no qual as proteínas identificadas apresentam uma sobre-expressão na amostra W2 S e uma sub-expressão nas amostras da estirpe resistente (W2mef K e W2mefS) enquanto que a amostra W2 K não apresenta variações significativas.

V.3. Atividade Proteolítica

De forma a avaliar a atividade proteolítica, realizou-se uma zimografia em gelatina.

V.3.1. Determinação da actividade proteolítica

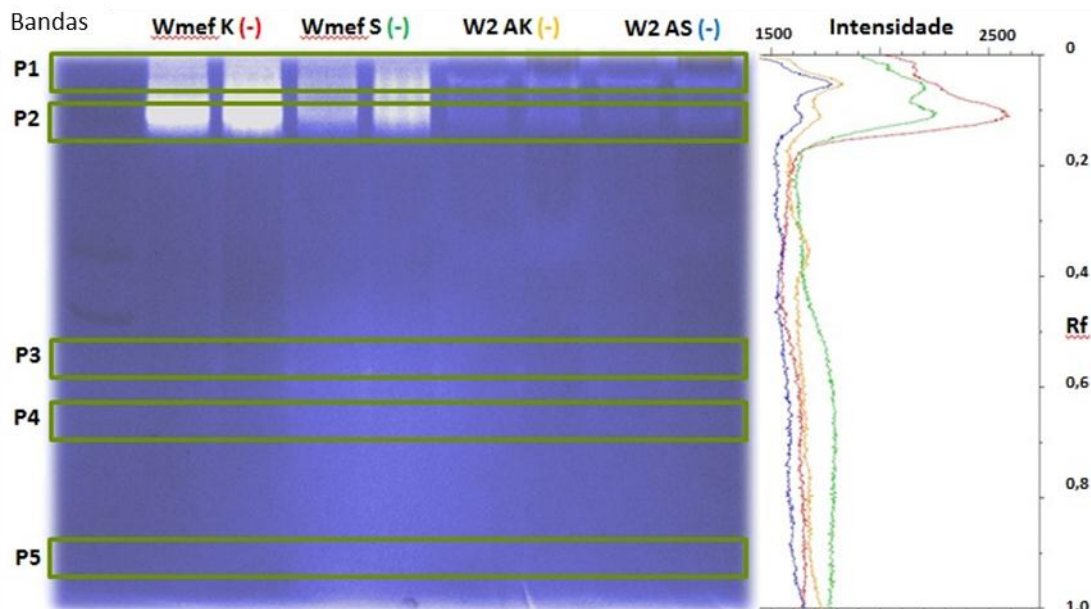


Fig. 10 - Zimograma realizado com o objetivo de verificar a atividade das proteases presentes nas amostras analisadas. De P1 a P5 estão identificadas as bandas retiradas para análise por MS/MS MALDI. À direita é apresentada a intensidade das bandas observadas, sendo que a cor vermelha (-) corresponde à amostra Wmef K, a cor verde (-) à Wmef S, a cor amarela (-) à W2 K e a cor azul (-) à W2 S. Todas as amostras foram realizadas em duplicado.

Como se pode verificar pela análise dos zimogramas, existem diferenças significativas de atividade entre as amostras de W2mef relativamente às amostras com a estirpe não resistente W2 (Figura 10), na zona correspondente às proteínas de alto peso molecular.

A zimografia realizada revelou diferenças significativas na atividade da “M1 family aminopeptidase”. A identificação desta enzima foi realizada com recurso à excisão das bandas, digestão e identificação por MS/MS MALDI. A localização das bandas no gel corresponde a uma proteína com alto peso molecular como é o caso da PfA-M1 uma vez que tem uma massa molecular de 126 kDa (spot 2, Figura 10).

Na Figura 11 são apresentadas as diferenças de densidade óptica registadas para as amostras de W2mef K, W2mef S, W2 K e W2 S. Os resultados obtidos demonstram uma diminuição da atividade nas amostras não resistentes o que nos permite concluir que esta proteína poderá estar sobre expressa nos parasitas resistentes (Wmef).

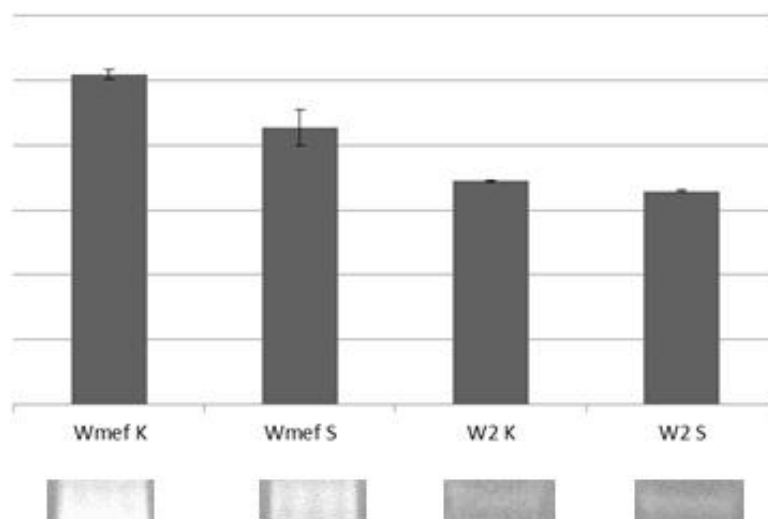


Fig. 11 - Densidade óptica das bandas correspondentes à proteína "M1 family aminopeptidase" nas amostras Wmef K, Wmef S, W2 K e W2 S

A análise das alterações da expressão da PfA-M1 na presença e ausência de fármaco revela que as amostras submetidas a mefloquina, Wmef S e W2 S, apresentam uma ligeira diminuição de atividade relativamente às amostras controlo, W2mef K e W2 K, respetivamente.

VI. Discussão

VI. Discussão

Com o intuito de alcançar o maior número de identificações possíveis foram otimizados os protocolos de extracção e separação, no entanto, o número de identificações estatisticamente válidas de *Plasmodium falciparum* foi inferior ao esperado e ao reportado em alguns artigos analisados [92, 128, 138]. O reduzido número de identificações obtidas poderá ser explicado devido à baixa concentração de proteínas de *P. falciparum* e à presença de uma elevada concentração de proteínas humanas. Seria de esperar a presença de proteínas humanas devido à cultura *in vitro* dos parasitas em eritrócitos de *Homo sapiens*, uma vez que de forma a manter a parasitemia elevada e constante é necessária a presença de uma concentração elevada de eritrócitos.

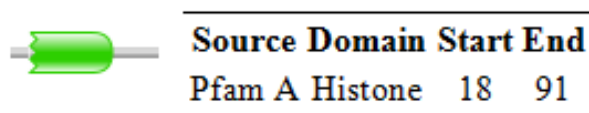
Entre as proteínas identificadas do *P. falciparum* é de salientar a presença de “M1 family aminopeptidase” (Id 121), da “Cathepsin C” (Id 157), da “Malaria protein EXP-1” (Id 120), de 7 proteínas da membrana do merozoíto (Id 125-132), da “Multidrug resistance protein” (Id 134) e da “Ring-infected erythrocyte surface antigen” (Id 190). São proteínas das quais ainda se conhece pouco. No entanto, poderão estar associadas à aquisição de resistência ou estar na base do desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos. Assim, a “M1 family aminopeptidase” e a “Cathepsin C” encontram-se associadas ao mecanismo de degradação da hemoglobina, mais particularmente à obtenção de a.a. através da degradação de di e oligopeptidos [139], e a PfMDR1, à capacidade de resistência a inúmeros anti-maláricos através da função de transporte molecular entre o citosol e o VD [116, 117].

Das proteínas de *Homo sapiens* identificadas salientar a identificação das subunidades α , β e δ da hemoglobina, no entanto, estas identificações foram realizadas com poucos péptidos o que poderá sugerir que já se encontram na forma de fragmentos resultantes da degradação pelo *P. falciparum*. Salienta-se também a identificação de inúmeras proteínas de resposta ao stress oxidativo, da classe das chaperonas, mesmo tendo por base um sistema *in vitro*, no qual não poderemos falar de uma resposta do organismo. É importante a presença desta classe de proteínas como forma de comparação com o sistema *in vivo*, pois estas proteínas são a primeira linha de defesa do organismo, sendo ativadas em resposta ao stress oxidativo. Foram também identificadas algumas proteínas de membrana características dos eritrócitos, as anquirinas (Id 22-24), a banda 4.1 (Id 162), as actinas (Id 14,15) e as espectrininas (Id 200-203) que têm a função de manter a integridade membranar através da ligação das proteínas membranares com as proteínas do citoesqueleto [140, 141]. No entanto, tal como as hemoglobinas as suas

identificações foram realizadas a partir de um reduzido número de péptidos, o que poderá ser motivado pela ação do parasita.

A catalogação das proteínas identificadas revelou que a distribuição das funções moleculares e dos processos biológicos indicou que as amostras analisadas representam uma boa amostra do total das proteínas de ambas as espécies uma vez que estes processos e funções são predominantes nas proteínas expressas por ambos os genomas, segundo dados do *Panther*. A análise da divisão das proteínas identificadas por classes e relativamente à localização subcelular revelou um predomínio das proteínas do citoplasma e de membrana, o que deverá estar relacionado com a elevada acessibilidade a estas proteínas após rutura das membranas celulares, tendo resultado num enriquecimento da amostra no que diz respeito a estas proteínas.

De salientar ainda que algumas proteínas identificadas como humanas poderão ser do *P. Falciparum* e vice-versa. Assim, de modo a verificar possíveis homologias entre as proteínas identificadas de *P. falciparum* com diferenças de expressão, foi realizado um *blast*, que permitiu verificar que a histona H2A do parasita apresentava uma homologia de 100% (Fíg. 13) com a Histona H2AX humana (identificada, tabela 1), podendo desta maneira ser incluída nas proteínas de *Homo sapiens* que apresentavam uma variação estatística significativa. Mais ainda, os péptidos identificados pertencem ao domínio funcional da Histona H2A como se pode verificar na Fíg. 12 e Fíg. 13.



Fíg. 12 - Domínio funcional da "Histone H2A", dados *Pfam* [142]

```
H2A_PLAFA  MSAKGKTGRKKASKGTSNSAKAGLQFPVGRIGRYLKKGKYAKRVGAGAPVYLAADVLEYLC 60
H2AX_HUMAN MSGRGKTGGKARAKAKSRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGHYAERVGAGAPVYLAADVLEYLT 60
**.:**** * :*.*.*.:*****: * *:*:*:*:*:*****
```

Fíg. 13 - Alinhamento realizado na base de dados Uniprot [136] entre a "Histone H2A" de *P. falciparum* e a "Histone H2AX" de *Homo sapiens* de forma a verificar a homologia. A vermelho encontra-se, salientada a sequência identificada por MS/MS MALDI e que deu origem à identificação da "Histone H2A"

De facto, a sobre-expressão nas amostras de W2 S e W2 mef S, sugere uma resposta do parasita à acção da mefloquina uma vez que a "Histone H2A" aparece associada à reparação e replicação do ADN [143].

Neste estudo foram detectadas proteínas como "78 kDa glucose-regulated protein homolog (isolate NF54)" e "Heat shock 70 kDa protein" que apresentaram sobre-expressão nas amostras sujeitas à presença de mefloquina, o que se enquadra na

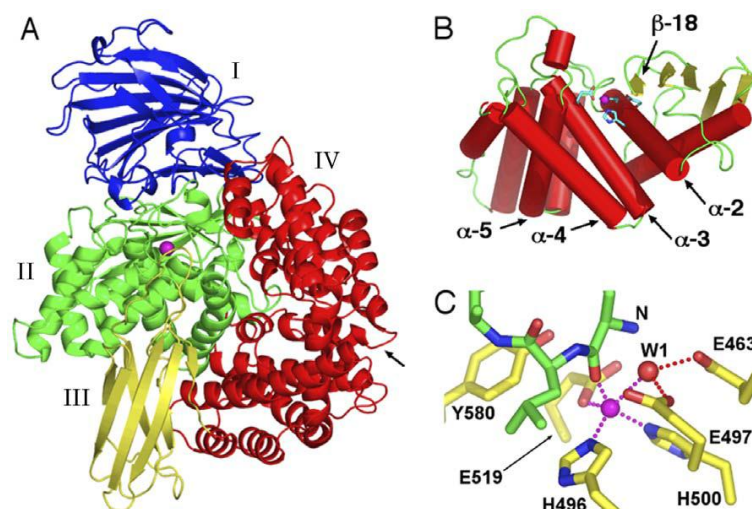
resposta do parasita ao stress oxidativo induzido pela acção do fármaco[144]; a “Actin-1 (isolate 3D7)” e a “Enolase (isolate FCR-3/Gambia)” que apresentam uma ligeira sub expressão nas amostras de W2 S e W2mef S (tratadas com mefloquina), relativamente a W2 K e W2 mef K (não tratadas), o que se poderá dever à ação da mefloquina que poderá induzir alguma quebra no processo de mobilidade intracelular, uma vez que uma das funções da actina é a mediação da interacção dos microfilamentos com outras estruturas celulares [145], e na glicólise, pois são as principais funções celulares das proteínas identificadas;

No que respeita às proteínas humanas, verificou-se que a sob-expressão das proteínas humanas nas amostras W2 K, W2mef K e W2 mef S, em relação à amostra W2S poderá sugerir a ação da mefloquina, que elimina o parasita, impedindo desta forma que o mesmo promova a destruição dos eritrócitos, o que leva a que se observe uma sobre-expressão proteica, relativamente às restantes amostras em que o parasita permanece ativo, promovendo a degradação dos eritrócitos e levando a uma detioração das proteínas eritrocitárias.

As proteases são um grupo de enzimas que desempenha um processo fundamental para o crescimento e invasão parasitário. As diferenças de atividade proteolítica observadas, demonstram uma clara sub-expressão da protease “M1 family aminopeptidase” ou PfA-M1. A PfA-M1 é um membro da família das metaloaminopeptidases semelhante às enzimas “M-1 family” procariotas, tem 1085.aa., uma massa molecular de 126kDa, e 4 domínios bem conservados em especial o domínio catalítico. O PfA-M1 possui ainda um domínio N-terminal, um C-terminal e um domínio central. No centro ativo possui um ião de zinco (II) e uma molécula de água que funciona como nucleófilo que no processo catalítico “ataca” o carbono carboxílico do substrato (Fíg. 14 - C). A estrutura da PfA-M1 possui duas entradas com acesso ao centro ativo, tendo sido sugerido que os péptidos resultantes do catabolismo da hemoglobina entram pelo canal situado no domínio C-terminal e que os a.a. resultantes saem pelo domínio N-terminal (seta da Fíg. 14 - A) [139].

Como referido no capítulo “Degradação da hemoglobina” (II.4.2.1) da “Revisão bibliográfica”, após a ação da Cathepsina C, são produzidos dipéptidos cujo destino permanece controverso (II.4.2.1). A libertação de aminoácidos a partir de péptidos resultantes da degradação das cadeias de globina precisa da ação de carboxipeptidases ou aminopeptidases. Uma vez que até ao momento não foi descoberta nenhuma carboxipeptidase aparentemente envolvida no catabolismo das cadeias de globina, pensa-se que este processo é da responsabilidade das aminopeptidases, em particular

de duas aminopeptidases, recentemente associadas ao catabolismo da hemoglobina, a “M17 family leucine aminopeptidase” [146-148] e a “M1 family aminopeptidase” (PfA-M1) [149-151].



Fíg. 14 – Estrutura da “M1-family aminopeptidase” com representação dos 4 domínios (A), do domínio catalítico (B) e da-estrutura do centro ativo (C) [139].

O local onde ocorre a ação destas aminopeptidases permanece por confirmar. No entanto, estudos recentes indicam que a PfA-M1 está localizada no núcleo e no lúmen do VD [152]. Estes estudos indicam que a localização citosólica sugerida por outros estudos [73],[153] está relacionada com o efeito que algumas técnicas de fixação têm na integridade de algumas estruturas sub-celulares, o que poderá resultar numa distribuição difusa da PfA-M1 que poderá ter sido interpretada como citosólica [151].

De modo a analisar as potenciais interações descritas pela literatura procedeu-se a análise através do *plug-in Apid* do *Cytoscape* e da base de dados STRING [154] (Fíg. 15). Como se pode verificar, a “M1 family aminopeptidase”, a “Cathepsin C” e a “Falcilysin” (●, Fíg. 15) interagem de uma forma indireta, com as proteínas “Ring-infected erythrocyte surface antigen (isolate FC27)” e “Actin-1” (● Fíg. 15) aparecem como intermediários. Apesar de não se verificarem variações significativas na “Ring-infected erythrocyte surface antigen (isolate FC27)”, as variações significativas encontradas na actina 1 poderão indicar que a mesma favorece o processo de degradação da hemoglobina, através da intervenção nos fenómenos de mobilidade intracelular.

Não foi possível validar as restantes interações descritas na literatura, relativamente ao processo de degradação da hemoglobina (II.4.2.1) devido à insuficiência de dados do *plug-in Apid* e do STRING.

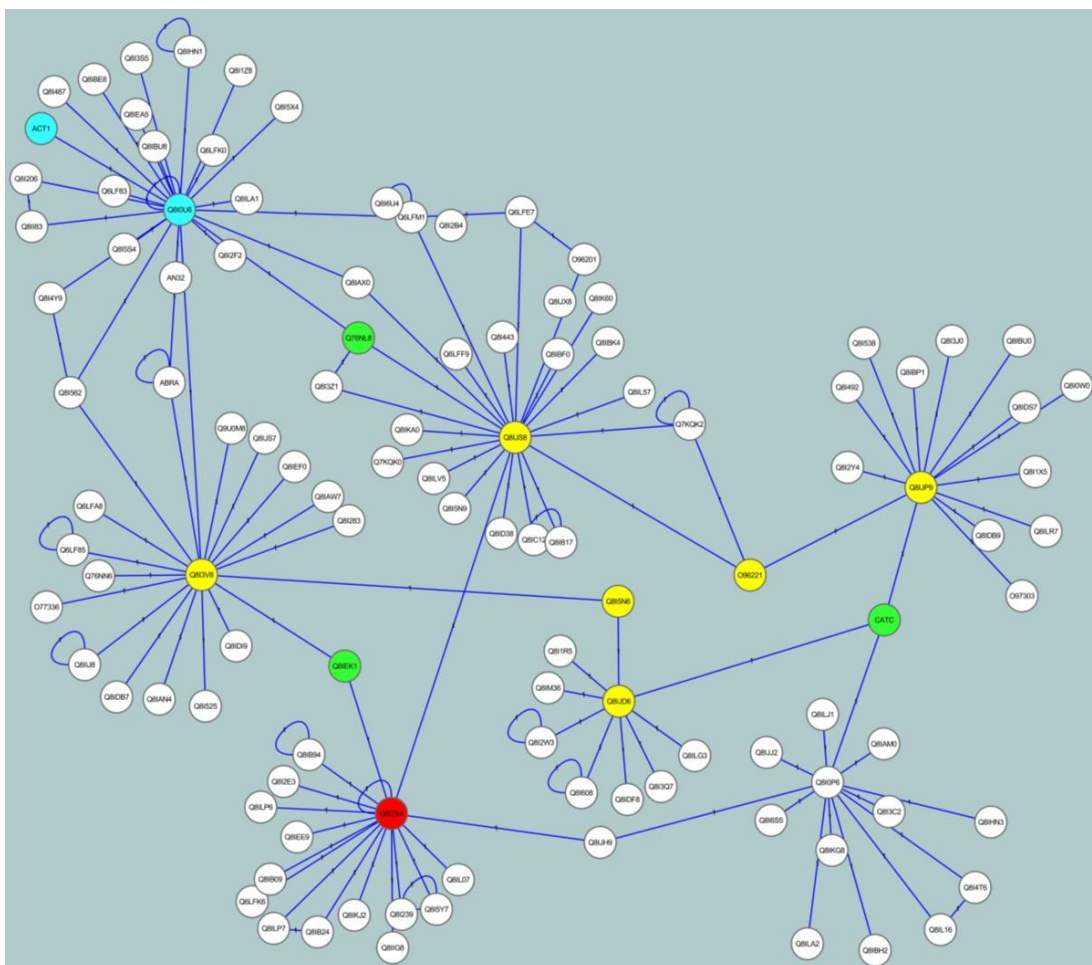


Fig. 15 - Esquema das interações proteína-proteína, obtido através do plug-in Apid do Cytoscape [154]. Legenda: ● – HeatShock Protein 70kDa; ● – Proteases associadas à via de degradação da hemoglobina (PfA-M1, Cathepsin C e Falcilysin); ● – intermediários na ligação das proteases (●); ● – proteínas presentes na rede e identificadas no corrente trabalho.

O papel fundamental no processo de aquisição de a.a. por parte do parasita e os resultados obtidos com a utilização de inibidores da PfA-M1 em modelos animais demonstraram a inibição do crescimento do parasita [73], o que realça a importância desta proteína num dos principais alvos para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas.

VII. Conclusão

VII. Conclusão

De acordo com os objetivos do trabalho, foram desenvolvidos procedimentos experimentais com vista à identificação e comparação do perfil proteico de resposta do parasita *P. falciparum* à mefloquina. Os resultados obtidos permitiram retirar as seguintes conclusões:

- i) Ocorre uma sobre-expressão das proteínas do eritrócito na amostra não resistente (W2) não tratada e em ambas as amostras resistentes, em comparação com a amostra W2 S, o que poderá indiciar a ação eficaz do fármaco que desta forma elimina o parasita impedindo que o mesmo destrua os eritrócitos humanos;
- ii) A atividade proteolítica da “M1 family aminopeptidase”, aumenta na estirpe resistente (W2mef), quando comparada com a estirpe sensível à mefloquina (W2);
- iii) A protease “M1 family aminopeptidase” interage indiretamente com a “Cathepsin C” e com a “Falcilysin”; como verificado pela análise bioinformática com o *plug-in Apid* do *Cytoscape*.

As diferenças significativas de densidade ótica das amostras com a estirpe resistente e o facto da “M1 family aminopeptidase” estar associada a um processo vital para o desenvolvimento do parasita, faz com que esta protease possa ser apontada como um novo determinante para o desenvolvimento de novos fármacos, nomeadamente baseados em inibidores da PfA-M1.

VIII. Referências Bibliográficas

VIII. Referências Bibliográficas

1. Kiszewski, A., Mellinger, A., Spielman, A., Malaney, P., Sachs, S. E. and Sachs, J., *A global index representing the stability of malaria transmission*. Am J Trop Med Hyg, 2004. **70**(5): p. 486-98.
2. Tucker, T. G., Milne, A. M., Fournel-Gigleux, S., Fenner, K. S. and Coughtrie, M. W., *Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum*. Biochem Pharmacol, 2011.
3. Lian, Z., Wu, P. and Zhou, J., *[Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in peripheral blood mononuclear cells from multidrug resistant tuberculosis patients]*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2011. **34**(7): p. 520-2.
4. Lacroix-Pepin, N., Danyod, G., Krishnaswamy, N., Mondal, S., Rong, P. M., Chapdelaine, P. and Fortier, M. A., *The Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4) Appears as a Functional Carrier of Prostaglandins Regulated by Oxytocin in the Bovine Endometrium*. Endocrinology, 2011.
5. Leimanis, M. L., Karwatsky, J. and Georges, E., *Photoaffinity labeling of the multidrug resistance protein 2 (ABCC2/cMOAT) with a photoreactive analog of LTC(4)*. Int J Biochem Mol Biol, 2011. **2**(1): p. 39-46.
6. Vlaming, M. L., van Esch, A., van de Steeg, E., Pala, Z., Wagenaar, E., van Tellingen, O. and Schinkel, A. H., *Impact of abcc2 [multidrug resistance-associated protein (MRP) 2], abcc3 (MRP3), and abcg2 (breast cancer resistance protein) on the oral pharmacokinetics of methotrexate and its main metabolite 7-hydroxymethotrexate*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(8): p. 1338-44.
7. Shibayama, Y., Nakano, K., Maeda, H., Taguchi, M., Ikeda, R., Sugawara, M., Iseki, K., Takeda, Y. and Yamada, K., *Multidrug resistance protein 2 implicates anticancer drug-resistance to sorafenib*. Biol Pharm Bull, 2011. **34**(3): p. 433-5.
8. Yang, R., Hou, Y. X., Campbell, C. A., Palaniyandi, K., Zhao, Q., Bordner, A. J. and Chang, X. B., *Glutamine residues in Q-loops of multidrug resistance protein MRP1 contribute to ATP binding via interaction with metal cofactor*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(7): p. 1790-6.
9. Renga, B., Migliorati, M., Mencarelli, A., Cipriani, S., D'Amore, C., Distrutti, E. and Fiorucci, S., *Farnesoid X receptor suppresses constitutive androstane receptor activity at the multidrug resistance protein-4 promoter*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1809**(3): p. 157-65.

10. Li, C. J., Zhou, H. L., Li, J., Yao, H. T., Su, R. and Li, W. P., *Roles of sulfonylurea receptor 1 and multidrug resistance protein 1 in modulating insulin secretion in human insulinoma*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011. **10**(1): p. 88-94.
11. Reichel, V., Klas, J., Fricker, G. and Masereeuw, R., *Fluo-cAMP is transported by multidrug resistance-associated protein isoform 4 in rat choroid plexus*. J Neurochem, 2010. **115**(1): p. 200-8.
12. Seydel, K. B. and Stanley, S. L., Jr., *SCID mice and the study of parasitic disease*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(2): p. 126-34.
13. Miranda, M. N., Masuda, C. A., Ferreira-Pereira, A., Carvajal, E., Ghislain, M. and Montero-Lomeli, M., *The serine/threonine protein phosphatase Sit4p activates multidrug resistance in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2010. **10**(6): p. 674-86.
14. Barat, L. M. and Bloland, P. B., *Drug resistance among malaria and other parasites*. Infect Dis Clin North Am, 1997. **11**(4): p. 969-87.
15. Zhang, Y., Zhao, T., Li, W. and Vore, M., *The 5'-untranslated region of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2; ABCG2) regulates downstream open reading frame expression through translational regulation*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(2): p. 237-46.
16. Klokouzas, A., Tiffert, T., van Schalkwyk, D., Wu, C. P., van Veen, H. W., Barrand, M. A. and Hladky, S. B., *Plasmodium falciparum expresses a multidrug resistance-associated protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(1): p. 197-201.
17. Raj, D. K., Mu, J., Jiang, H., Kabat, J., Singh, S., Sullivan, M., Fay, M. P., McCutchan, T. F. and Su, X. Z., *Disruption of a Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione*. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 7687-96.
18. White, N. J., *Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 172-3.
19. Kantele, A. and Jokiranta, T. S., *Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, Plasmodium knowlesi*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(11): p. 1356-62.
20. Ettari, R., Zappala, M., Micale, N., Schirmeister, T., Gelhaus, C., Leippe, M., Evers, A. and Grasso, S., *Synthesis of novel peptidomimetics as inhibitors of protozoan cysteine proteases falcipain-2 and rhodesain*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(7): p. 3228-33.
21. Zhu, J., Chen, T., Liu, J., Ma, R., Lu, W., Huang, J., Li, H., Li, J. and Jiang, H., *2-(3,4-dihydro-4-oxothieno[2,3-d]pyrimidin-2-ylthio) acetamides as a new class of falcipain-2*

- inhibitors. 3. design, synthesis and biological evaluation.* *Molecules*, 2009. **14**(2): p. 785-97.
22. Verissimo, E., Berry, N., Gibbons, P., Cristiano, M. L., Rosenthal, P. J., Gut, J., Ward, S. A. and O'Neill, P. M., *Design and synthesis of novel 2-pyridone peptidomimetic falcipain 2/3 inhibitors.* *Bioorg Med Chem Lett*, 2008. **18**(14): p. 4210-4.
23. Chakravarty, S., Cockburn, I. A., Kuk, S., Overstreet, M. G., Sacci, J. B. and Zavala, F., *CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes.* *Nat Med*, 2007. **13**(9): p. 1035-41.
24. Pierce, S. K. and Miller, L. H., *World Malaria Day 2009: What Malaria Knows about the Immune System That Immunologists Still Do Not.* *The Journal of Immunology*, 2009. **182**(9): p. 5171-5177.
25. Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., Alonso, P. L., Collins, F. H. and Duffy, P. E., *Malaria: progress, perils, and prospects for eradication.* *J Clin Invest*, 2008. **118**(4): p. 1266-76.
26. Kerr, I. D., Lee, J. H., Pandey, K. C., Harrison, A., Sajid, M., Rosenthal, P. J. and Brinen, L. S., *Structures of falcipain-2 and falcipain-3 bound to small molecule inhibitors: implications for substrate specificity.* *J Med Chem*, 2009. **52**(3): p. 852-7.
27. Ettari, R., Nizi, E., Di Francesco, M. E., Micale, N., Grasso, S., Zappala, M., Vicik, R. and Schirmeister, T., *Nonpeptidic vinyl and allyl phosphonates as falcipain-2 inhibitors.* *ChemMedChem*, 2008. **3**(7): p. 1030-3.
28. Wongsrichanalai, C., Pickard, A. L., Wernsdorfer, W. H. and Meshnick, S. R., *Epidemiology of drug-resistant malaria.* *Lancet Infect Dis*, 2002. **2**(4): p. 209-18.
29. Gregson, A. and Plowe, C. V., *Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates.* *Pharmacol Rev*, 2005. **57**(1): p. 117-45.
30. Price, R. N. and Nosten, F., *Drug resistant falciparum malaria: clinical consequences and strategies for prevention.* *Drug Resist Updat*, 2001. **4**(3): p. 187-96.
31. White, N. J., *Antimalarial drug resistance.* *J Clin Invest*, 2004. **113**(8): p. 1084-92.
32. Fidock, D. A., Eastman, R. T., Ward, S. A. and Meshnick, S. R., *Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research.* *Trends Parasitol*, 2008. **24**(12): p. 537-44.
33. Wellems, T. E. and Plowe, C. V., *Chloroquine-resistant malaria.* *J Infect Dis*, 2001. **184**(6): p. 770-6.
34. Feachem, R. and Sabot, O., *A new global malaria eradication strategy.* *Lancet*, 2008. **371**(9624): p. 1633-5.

35. Woodrow, C. J. and Bustamante, L. Y., *Mechanisms of artemisinin action and resistance: wider focus is needed*. Trends Parasitol, 2011. **27**(1): p. 2-3; author reply 3-4.
36. Nosten, F. and White, N. J., *Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(6 Suppl): p. 181-92.
37. Connell, S. R., Tracz, D. M., Nierhaus, K. H. and Taylor, D. E., *Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3675-81.
38. Cui, L. and Su, X. Z., *Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009. **7**(8): p. 999-1013.
39. Schlesinger, P. H., Krogstad, D. J. and Herwaldt, B. L., *Antimalarial agents: mechanisms of action*. Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(6): p. 793-8.
40. Sullivan, D. J., Jr., Matile, H., Ridley, R. G. and Goldberg, D. E., *A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31103-7.
41. Mungthin, M., Bray, P. G., Ridley, R. G. and Ward, S. A., *Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-aminoquinolines, quinoline methanols, and phenanthrene methanols*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(11): p. 2973-7.
42. Robert, A., Benoit-Vical, F., Claparols, C. and Meunier, B., *The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13676-80.
43. Kannan, R., Kumar, K., Sahal, D., Kukreti, S. and Chauhan, V. S., *Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 409-18.
44. Sullivan, D. J., Jr., Gluzman, I. Y., Russell, D. G. and Goldberg, D. E., *On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11865-70.
45. Wu, Y., *How might qinghaosu (artemisinin) and related compounds kill the intraerythrocytic malaria parasite? A chemist's view*. Acc Chem Res, 2002. **35**(5): p. 255-9.
46. Nagy, D. W., *Parelaphostrongylus tenuis and other parasitic diseases of the ruminant nervous system*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2004. **20**(2): p. 393-412, viii.
47. Wiwanitkit, V., *Quantum chemical analysis of alternative pathways for iron activation step for artemisinin, a new antimalarial drug*. J Infect, 2006. **53**(3): p. 148-51.
48. Hayes, J. D. and Wolf, C. R., *Molecular mechanisms of drug resistance*. Biochem J, 1990. **272**(2): p. 281-95.

49. Gutman, J., Kachur, S. P., Slutsker, L., Nzila, A. and Mutabingwa, T., *Combination of probenecid-sulphadoxine-pyrimethamine for intermittent preventive treatment in pregnancy*. Malar J, 2012. **11**: p. 39.
50. Malaguarnera, L., Simpoire, J., Prodi, D. A., Angius, A., Sassu, A., Persico, I., Barone, R. and Musumeci, S., *A 24-bp duplication in exon 10 of human chitotriosidase gene from the sub-Saharan to the Mediterranean area: role of parasitic diseases and environmental conditions*. Genes Immun, 2003. **4**(8): p. 570-4.
51. Weese, J. S., Peregrine, A. S. and Armstrong, J., *Occupational health and safety in small animal veterinary practice: Part II--Parasitic zoonotic diseases*. Can Vet J, 2002. **43**(10): p. 799-802.
52. Filippova, N. A., *[The sympatry of closely related species of ixodid ticks and its possible role in the parasitic systems of natural foci of transmissible diseases]*. Parazitologiya, 1999. **33**(3): p. 223-41.
53. Cordoliani, Y. S., Sarrazin, J. L., Leveque, C., Goasdoue, P. and Sabbah, P., *[Imaging of encephalic parasitic diseases]*. J Neuroradiol, 1998. **25**(4): p. 290-305.
54. Nawa, Y., *[Laboratory diagnosis of protozoan and parasitic diseases. 2. Helminthiasis. d. Trematode infections]*. Rinsho Byori, 1998. **Suppl 108**: p. 226-31.
55. Schubert, S., *[Intestinal parasitic diseases--diagnosis and therapy]*. Z Arztl Fortbild (Jena), 1991. **85**(9): p. 431-5.
56. Walden, J., *Parasitic diseases. Other roundworms. Trichuris, hookworm, and Strongyloides*. Prim Care, 1991. **18**(1): p. 53-74.
57. Pust, R. E., Campos-Outcalt, D. and Cordes, D. H., *Parasitic diseases. International travel. Preparing your patient*. Prim Care, 1991. **18**(1): p. 213-40.
58. Quinet, B., *[Tropical parasitic diseases in children]*. Rev Prat, 1990. **40**(28): p. 2595-9.
59. Bailey, R., *Parasitic diseases. Practitioner*, 1990. **234**(1494): p. 844-9.
60. Singh, A. and Rosenthal, P. J., *Selection of cysteine protease inhibitor-resistant malaria parasites is accompanied by amplification of falcipain genes and alteration in inhibitor transport*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35236-41.
61. Kumar, A., Kumar, K., Korde, R., Puri, S. K., Malhotra, P. and Singh Chauhan, V., *Falcipain-1, a Plasmodium falciparum cysteine protease with vaccine potential*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 2026-34.
62. Greenbaum, D. C., Baruch, A., Grainger, M., Bozdech, Z., Medzihradzsky, K. F., Engel, J., DeRisi, J., Holder, A. A. and Bogyo, M., *A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite*. Science, 2002. **298**(5600): p. 2002-6.

63. Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Kumar, A., Hossain, M. J., Bhatnagar, R. K., Chauhan, V. S. and Malhotra, P., *A role of falcipain-2, principal cysteine proteases of Plasmodium falciparum in merozoite egression*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(4): p. 1062-8.
64. Dua, M., Raphael, P., Sijwali, P. S., Rosenthal, P. J. and Hanspal, M., *Recombinant falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **116**(1): p. 95-9.
65. Subramanian, S., Hardt, M., Choe, Y., Niles, R. K., Johansen, E. B., Legac, J., Gut, J., Kerr, I. D., Craik, C. S. and Rosenthal, P. J., *Hemoglobin cleavage site-specificity of the Plasmodium falciparum cysteine proteases falcipain-2 and falcipain-3*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5156.
66. Cherkasskii, B. L., [Socio-ecologic concepts in the epidemiology of infectious and parasitic diseases]. Med Parazitol (Mosk), 1985(6): p. 3-8.
67. Banerjee, R., Liu, J., Beatty, W., Pelosof, L., Klemba, M. and Goldberg, D. E., *Four plasmepsins are active in the Plasmodium falciparum food vacuole, including a protease with an active-site histidine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 990-5.
68. Rosenthal, P. J., *Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malaria parasites*. Curr Opin Hematol, 2002. **9**(2): p. 140-5.
69. Eggleston, K. K., Duffin, K. L. and Goldberg, D. E., *Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite Plasmodium falciparum*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32411-7.
70. Rosenthal, P. J., *Plasmodium falciparum: effects of proteinase inhibitors on globin hydrolysis by cultured malaria parasites*. Exp Parasitol, 1995. **80**(2): p. 272-81.
71. Klemba, M., Gluzman, I. and Goldberg, D. E., *A Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 43000-7.
72. Wang, F., Krai, P., Deu, E., Bibb, B., Lauritzen, C., Pedersen, J., Bogyo, M. and Klemba, M., *Biochemical characterization of Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase 1*. Mol Biochem Parasitol, 2011. **175**(1): p. 10-20.
73. Gavigan, C. S., Dalton, J. P. and Bell, A., *The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **117**(1): p. 37-48.
74. Dalal, S. and Klemba, M., *Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in Plasmodium falciparum*. J Biol Chem, 2007. **282**(49): p. 35978-87.

75. Ettari, R., Bova, F., Zappala, M., Grasso, S. and Micale, N., *Falcipain-2 inhibitors*. Med Res Rev, 2010. **30**(1): p. 136-67.
76. Chintakrindi, A. S., Shaikh, M. S. and Coutinho, E. C., *De novo design of 7-aminocoumarin derivatives as novel falcipain-3 inhibitors*. J Mol Model, 2012. **18**(4): p. 1481-93.
77. Hybiske, K. and Stephens, R. S., *Exit strategies of intracellular pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(2): p. 99-110.
78. Salmon, B. L., Oksman, A. and Goldberg, D. E., *Malaria parasite exit from the host erythrocyte: a two-step process requiring extraerythrocytic proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 271-6.
79. Wickham, M. E., Culvenor, J. G. and Cowman, A. F., *Selective inhibition of a two-step egress of malaria parasites from the host erythrocyte*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37658-63.
80. Yeoh, S., O'Donnell, R. A., Koussis, K., Dluzewski, A. R., Ansell, K. H., Osborne, S. A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G. H., Bannister, L. H., Bryans, J. S., Kettleborough, C. A. and Blackman, M. J., *Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1072-83.
81. Lal, K., Prieto, J. H., Bromley, E., Sanderson, S. J., Yates, J. R., 3rd, Wastling, J. M., Tomley, F. M. and Sinden, R. E., *Characterisation of Plasmodium invasive organelles; an ookinete microneme proteome*. Proteomics, 2009. **9**(5): p. 1142-51.
82. Janse, C. J. and Waters, A. P., *The exoneme helps malaria parasites to break out of blood cells*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1036-8.
83. Aly, A. S. and Matuschewski, K., *A malarial cysteine protease is necessary for Plasmodium sporozoite egress from oocysts*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 225-30.
84. Arastu-Kapur, S., Ponder, E. L., Fonovic, U. P., Yeoh, S., Yuan, F., Fonovic, M., Grainger, M., Phillips, C. I., Powers, J. C. and Bogyo, M., *Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(3): p. 203-13.
85. Aoki, S., Li, J., Itagaki, S., Okech, B. A., Egwang, T. G., Matsuoka, H., Palacpac, N. M., Mitamura, T. and Horii, T., *Serine repeat antigen (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of Plasmodium falciparum, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47533-40.

86. Kooij, T. W., Carlton, J. M., Bidwell, S. L., Hall, N., Ramesar, J., Janse, C. J. and Waters, A. P., *A Plasmodium whole-genome synteny map: indels and synteny breakpoints as foci for species-specific genes*. PLoS Pathog, 2005. **1**(4): p. e44.
87. Arisue, N., Hirai, M., Arai, M., Matsuoka, H. and Horii, T., *Phylogeny and evolution of the SERA multigene family in the genus Plasmodium*. J Mol Evol, 2007. **65**(1): p. 82-91.
88. McCoubrie, J. E., Miller, S. K., Sargeant, T., Good, R. T., Hodder, A. N., Speed, T. P., de Koning-Ward, T. F. and Crabb, B. S., *Evidence for a common role for the serine-type Plasmodium falciparum serine repeat antigen proteases: implications for vaccine and drug design*. Infect Immun, 2007. **75**(12): p. 5565-74.
89. Hodder, A. N., Malby, R. L., Clarke, O. B., Fairlie, W. D., Colman, P. M., Crabb, B. S. and Smith, B. J., *Structural insights into the protease-like antigen Plasmodium falciparum SERA5 and its noncanonical active-site serine*. J Mol Biol, 2009. **392**(1): p. 154-65.
90. Miller, S. K., Good, R. T., Drew, D. R., Delorenzi, M., Sanders, P. R., Hodder, A. N., Speed, T. P., Cowman, A. F., de Koning-Ward, T. F. and Crabb, B. S., *A subset of Plasmodium falciparum SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47524-32.
91. Hodder, A. N., Drew, D. R., Epa, V. C., Delorenzi, M., Bourgon, R., Miller, S. K., Moritz, R. L., Frecklington, D. F., Simpson, R. J., Speed, T. P., Pike, R. N. and Crabb, B. S., *Enzymic, phylogenetic, and structural characterization of the unusual papain-like protease domain of Plasmodium falciparum SERA5*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48169-77.
92. Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J. S., Vermunt, A. M., Pain, A., Sauerwein, R. W., Eling, W. M., Hall, N., Waters, A. P., Stunnenberg, H. G. and Mann, M., *Analysis of the Plasmodium falciparum proteome by high-accuracy mass spectrometry*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 537-42.
93. Pang, X. L., Mitamura, T. and Horii, T., *Antibodies reactive with the N-terminal domain of Plasmodium falciparum serine repeat antigen inhibit cell proliferation by agglutinating merozoites and schizonts*. Infect Immun, 1999. **67**(4): p. 1821-7.
94. Okech, B., Mujuzi, G., Ogwal, A., Shirai, H., Horii, T. and Egwang, T. G., *High titers of IgG antibodies against Plasmodium falciparum serine repeat antigen 5 (SERA5) are associated with protection against severe malaria in Ugandan children*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **74**(2): p. 191-7.
95. Okech, B. A., Nalunkuma, A., Okello, D., Pang, X. L., Suzue, K., Li, J., Horii, T. and Egwang, T. G., *Natural human immunoglobulin G subclass responses to Plasmodium*

- falciparum* serine repeat antigen in Uganda. Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(6): p. 912-7.
96. Koussis, K., Withers-Martinez, C., Yeoh, S., Child, M., Hackett, F., Knuepfer, E., Juliano, L., Woehlbier, U., Bujard, H. and Blackman, M. J., *A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion*. EMBO J, 2009. **28**(6): p. 725-35.
97. Cowman, A. F. and Crabb, B. S., *Invasion of red blood cells by malaria parasites*. Cell, 2006. **124**(4): p. 755-66.
98. Kauth, C. W., Epp, C., Bujard, H. and Lutz, R., *The merozoite surface protein 1 complex of human malaria parasite Plasmodium falciparum: interactions and arrangements of subunits*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22257-64.
99. Blackman, M. J., *Proteases in host cell invasion by the malaria parasite*. Cell Microbiol, 2004. **6**(10): p. 893-903.
100. Vekemans, J. and Ballou, W. R., *Plasmodium falciparum malaria vaccines in development*. Expert Rev Vaccines, 2008. **7**(2): p. 223-40.
101. O'Donnell, R. A., Saul, A., Cowman, A. F. and Crabb, B. S., *Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related Plasmodium species*. Nat Med, 2000. **6**(1): p. 91-5.
102. Kauth, C. W., Woehlbier, U., Kern, M., Mekonnen, Z., Lutz, R., Mucke, N., Langowski, J. and Bujard, H., *Interactions between merozoite surface proteins 1, 6, and 7 of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 31517-27.
103. Li, X., Chen, H., Oo, T. H., Daly, T. M., Bergman, L. W., Liu, S. C., Chishti, A. H. and Oh, S. S., *A co-ligand complex anchors Plasmodium falciparum merozoites to the erythrocyte invasion receptor band 3*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5765-71.
104. Pachebat, J. A., Kadekoppala, M., Grainger, M., Dluzewski, A. R., Gunaratne, R. S., Scott-Finnigan, T. J., Ogun, S. A., Ling, I. T., Bannister, L. H., Taylor, H. M., Mitchell, G. H. and Holder, A. A., *Extensive proteolytic processing of the malaria parasite merozoite surface protein 7 during biosynthesis and parasite release from erythrocytes*. Mol Biochem Parasitol, 2007. **151**(1): p. 59-69.
105. Harris, P. K., Yeoh, S., Dluzewski, A. R., O'Donnell, R. A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L. H., Mitchell, G. H. and Blackman, M. J., *Molecular identification of a malaria merozoite surface sheddase*. PLoS Pathog, 2005. **1**(3): p. 241-51.
106. Gelhaus, C., Vicik, R., Schirmeister, T. and Leippe, M., *Blocking effect of a biotinylated protease inhibitor on the egress of Plasmodium falciparum merozoites from infected red blood cells*. Biol Chem, 2005. **386**(5): p. 499-502.

107. Koenderink, J. B., Kavishe, R. A., Rijpma, S. R. and Russel, F. G., *The ABCs of multidrug resistance in malaria*. Trends Parasitol, 2010. **26**(9): p. 440-6.
108. Valderramos, S. G. and Fidock, D. A., *Transporters involved in resistance to antimalarial drugs*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(11): p. 594-601.
109. Bray, P. G., Martin, R. E., Tilley, L., Ward, S. A., Kirk, K. and Fidock, D. A., *Defining the role of PfCRT in Plasmodium falciparum chloroquine resistance*. Mol Microbiol, 2005. **56**(2): p. 323-33.
110. Sanchez, C. P., Dave, A., Stein, W. D. and Lanzer, M., *Transporters as mediators of drug resistance in Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol, 2010. **40**(10): p. 1109-18.
111. Hyde, J. E., *Drug-resistant malaria*. Trends Parasitol, 2005. **21**(11): p. 494-8.
112. Rohrbach, P., Sanchez, C. P., Hayton, K., Friedrich, O., Patel, J., Sidhu, A. B., Ferdig, M. T., Fidock, D. A. and Lanzer, M., *Genetic linkage of pfmdr1 with food vacuolar solute import in Plasmodium falciparum*. EMBO J, 2006. **25**(13): p. 3000-11.
113. Reed, M. B., Saliba, K. J., Caruana, S. R., Kirk, K. and Cowman, A. F., *Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 906-9.
114. Sidhu, A. B., Valderramos, S. G. and Fidock, D. A., *pfmdr1 mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol, 2005. **57**(4): p. 913-26.
115. Sisowath, C., Stromberg, J., Martensson, A., Msellem, M., Obondo, C., Bjorkman, A. and Gil, J. P., *In vivo selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem)*. J Infect Dis, 2005. **191**(6): p. 1014-7.
116. Price, R. N., Uhlemann, A. C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N. J., Nosten, F. and Krishna, S., *Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number*. Lancet, 2004. **364**(9432): p. 438-47.
117. Sidhu, A. B., Uhlemann, A. C., Valderramos, S. G., Valderramos, J. C., Krishna, S. and Fidock, D. A., *Decreasing pfmdr1 copy number in plasmodium falciparum malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin*. J Infect Dis, 2006. **194**(4): p. 528-35.
118. Veiga, M. I., Ferreira, P. E., Jornhagen, L., Malmberg, M., Kone, A., Schmidt, B. A., Petzold, M., Bjorkman, A., Nosten, F. and Gil, J. P., *Novel polymorphisms in Plasmodium falciparum ABC transporter genes are associated with major ACT antimalarial drug resistance*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20212.
119. Mu, J., Ferdig, M. T., Feng, X., Joy, D. A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R. A., Wootton, J. C., Xiong, M. and Su, X. Z., *Multiple*

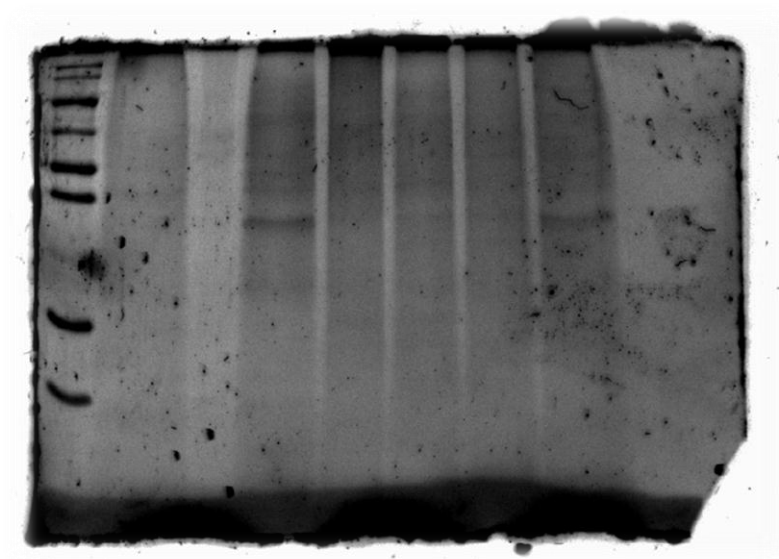
- transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine.* Mol Microbiol, 2003. **49**(4): p. 977-89.
120. Parquet, V., Henry, M., Wurtz, N., Dormoi, J., Briolant, S., Gil, M., Baret, E., Amalvict, R., Rogier, C. and Pradines, B., *Atorvastatin as a potential anti-malarial drug: in vitro synergy in combinational therapy with quinine against Plasmodium falciparum.* Malar J, 2010. **9**: p. 139.
121. Dahlstrom, S., Ferreira, P. E., Veiga, M. I., Sedighi, N., Wiklund, L., Martensson, A., Farnert, A., Sisowath, C., Osorio, L., Darban, H., Andersson, B., Kaneko, A., Conseil, G., Bjorkman, A. and Gil, J. P., *Plasmodium falciparum multidrug resistance protein 1 and artemisinin-based combination therapy in Africa.* J Infect Dis, 2009. **200**(9): p. 1456-64.
122. Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M. and Barrell, B., *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.* Nature, 2002. **419**(6906): p. 498-511.
123. Johnson, J. R., Florens, L., Carucci, D. J. and Yates, J. R., 3rd, *Proteomics in malaria.* J Proteome Res, 2004. **3**(2): p. 296-306.
124. Cooper, R. A. and Carucci, D. J., *Proteomic approaches to studying drug targets and resistance in Plasmodium.* Curr Drug Targets Infect Disord, 2004. **4**(1): p. 41-51.
125. Besteiro, S., Vo Duy, S., Perigaud, C., Lefebvre-Tournier, I. and Vial, H. J., *Exploring metabolomic approaches to analyse phospholipid biosynthetic pathways in Plasmodium.* Parasitology, 2010. **137**(9): p. 1343-56.
126. Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Grainger, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacci, J. B., Tabb, D. L., Witney, A. A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M. J., Holder, A. A., Sinden, R. E., Yates, J. R. and Carucci, D. J., *A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle.* Nature, 2002. **419**(6906): p. 520-6.
127. Ranjan, R., Chugh, M., Kumar, S., Singh, S., Kanodia, S., Hossain, M. J., Korde, R., Grover, A., Dhawan, S., Chauhan, V. S., Reddy, V. S., Mohammed, A. and Malhotra, P., *Proteome analysis reveals a large merozoite surface protein-1 associated*

- complex on the Plasmodium falciparum merozoite surface*. J Proteome Res, 2011. **10**(2): p. 680-91.
128. Prieto, J. H., Koncarevic, S., Park, S. K., Yates, J., 3rd and Becker, K., *Large-scale differential proteome analysis in Plasmodium falciparum under drug treatment*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e4098.
129. Aly, N. S., Hiramoto, A., Sanai, H., Hiraoka, O., Hiramoto, K., Kataoka, H., Wu, J. M., Masuyama, A., Nojima, M., Kawai, S., Kim, H. S. and Wataya, Y., *Proteome analysis of new antimalarial endoperoxide against Plasmodium falciparum*. Parasitol Res, 2007. **100**(5): p. 1119-24.
130. Haaf, E. and Schlosser, A., *Peptide and Protein Quantitation by Acid-Catalyzed 18O-Labeling of Carboxyl Groups*. Analytical Chemistry, 2011. **84**(1): p. 304-311.
131. Wang, S., Bobst, C. E. and Kaltashov, I. A., *Pitfalls in Protein Quantitation Using Acid-Catalyzed O18 Labeling: Hydrolysis-Driven Deamidation*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(18): p. 7227-7232.
132. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 1951. **193**(1): p. 265-275.
133. Vitorino, R., Ferreira, R., Neuparth, M., Guedes, S., Williams, J., Tomer, K. B., Domingues, P. M., Appell, H. J., Duarte, J. A. and Amado, F. M. L., *Subcellular proteomics of mice gastrocnemius and soleus muscles*. Analytical Biochemistry, 2007. **366**(2): p. 156-169.
134. Detweiler, C. D., Deterding, L. J., Tomer, K. B., Chignell, C. F., Germolec, D. and Mason, R. P., *Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(3): p. 364-369.
135. Koenig, T., Menze, B. H., Kirchner, M., Monigatti, F., Parker, K. C., Patterson, T., Steen, J. J., Hamprecht, F. A. and Steen, H., *Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics*. J Proteome Res, 2008. **7**(9): p. 3708-17.
136. *Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt)*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D71-5.
137. Mi, H., Dong, Q., Muruganujan, A., Gaudet, P., Lewis, S. and Thomas, P. D., *PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D204-10.

138. Makanga, M., Bray, P. G., Horrocks, P. and Ward, S. A., *Towards a proteomic definition of CoArtem action in Plasmodium falciparum malaria*. Proteomics, 2005. **5**(7): p. 1849-58.
139. Jones, P. M., Robinson, M. W., Dalton, J. P. and George, A. M., *The Plasmodium falciparum malaria M1 alanyl aminopeptidase (PfA-M1): insights of catalytic mechanism and function from MD simulations*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28589.
140. Blanc, L., Salomao, M., Guo, X., An, X., Gratzer, W. and Mohandas, N., *Control of erythrocyte membrane-skeletal cohesion by the spectrin-membrane linkage*. Biochemistry, 2010. **49**(21): p. 4516-23.
141. Anong, W. A., Franco, T., Chu, H., Weis, T. L., Devlin, E. E., Bodine, D. M., An, X., Mohandas, N. and Low, P. S., *Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1904-12.
142. Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R. and Bateman, A., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D211-22.
143. Dixit, K., Khan, M. A., Sharma, Y. D., Moinuddin and Alam, K., *Peroxynitrite-induced modification of H2A histone presents epitopes which are strongly bound by human anti-DNA autoantibodies: role of peroxynitrite-modified-H2A in SLE induction and progression*. Hum Immunol, 2011. **72**(3): p. 219-25.
144. Matambo, T. S., Odunuga, O. O., Boshoff, A. and Blatch, G. L., *Overproduction, purification, and characterization of the Plasmodium falciparum heat shock protein 70*. Protein Expr Purif, 2004. **33**(2): p. 214-22.
145. Ruzanov, P. V., Evdokimova, V. M., Korneeva, N. L., Hershey, J. W. and Ovchinnikov, L. P., *Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 20)**: p. 3487-96.
146. Cunningham, E., Drag, M., Kafarski, P. and Bell, A., *Chemical target validation studies of aminopeptidase in malaria parasites using alpha-aminoalkylphosphonate and phosphonopeptide inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(9): p. 3221-8.
147. Gardiner, D. L., Trenholme, K. R., Skinner-Adams, T. S., Stack, C. M. and Dalton, J. P., *Overexpression of leucyl aminopeptidase in Plasmodium falciparum parasites. Target for the antimalarial activity of bestatin*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1741-5.

148. Teuscher, F., Lowther, J., Skinner-Adams, T. S., Spielmann, T., Dixon, M. W., Stack, C. M., Donnelly, S., Mucha, A., Kafarski, P., Vassiliou, S., Gardiner, D. L., Dalton, J. P. and Trenholme, K. R., *The M18 aspartyl aminopeptidase of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30817-26.
149. Azimzadeh, O., Sow, C., Geze, M., Nyalwidhe, J. and Florent, I., *Plasmodium falciparum PfA-M1 aminopeptidase is trafficked via the parasitophorous vacuole and marginally delivered to the food vacuole*. Malar J, 2010. **9**: p. 189.
150. McGowan, S., Porter, C. J., Lowther, J., Stack, C. M., Golding, S. J., Skinner-Adams, T. S., Trenholme, K. R., Teuscher, F., Donnelly, S. M., Grembecka, J., Mucha, A., Kafarski, P., Degori, R., Buckle, A. M., Gardiner, D. L., Whisstock, J. C. and Dalton, J. P., *Structural basis for the inhibition of the essential Plasmodium falciparum M1 neutral aminopeptidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2537-42.
151. Ragheb, D., Dalal, S., Bompiani, K. M., Ray, W. K. and Klemba, M., *Distribution and biochemical properties of an M1-family aminopeptidase in Plasmodium falciparum indicate a role in vacuolar hemoglobin catabolism*. J Biol Chem, 2011. **286**(31): p. 27255-65.
152. Canolty, R. T., Soltani, M., Dalal, S. S., Edwards, E., Dronkers, N. F., Nagarajan, S. S., Kirsch, H. E., Barbaro, N. M. and Knight, R. T., *Spatiotemporal dynamics of word processing in the human brain*. Front Neurosci, 2007. **1**(1): p. 185-96.
153. Stack, C. M., Lowther, J., Cunningham, E., Donnelly, S., Gardiner, D. L., Trenholme, K. R., Skinner-Adams, T. S., Teuscher, F., Grembecka, J., Mucha, A., Kafarski, P., Lua, L., Bell, A. and Dalton, J. P., *Characterization of the Plasmodium falciparum M17 leucyl aminopeptidase. A protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development*. J Biol Chem, 2007. **282**(3): p. 2069-80.
154. Cline, M. S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., Hanspers, K., Isserlin, R., Kelley, R., Killcoyne, S., Lotia, S., Maere, S., Morris, J., Ono, K., Pavlovic, V., Pico, A. R., Vailaya, A., Wang, P. L., Adler, A., Conklin, B. R., Hood, L., Kuiper, M., Sander, C., Schmulevich, I., Schwikowski, B., Warner, G. J., Ideker, T. and Bader, G. D., *Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape*. Nat Protoc, 2007. **2**(10): p. 2366-82.

IX. Anexos

IX. Anexos**IX.1. IX.A. SDS – PAGE com coloração de prata**

Fíg. A1 - Gel de SDS - PAGE com coloração de prata

A Fíg. A1 é o resultado de uma electroforese monodimensional em gel de acrilamida após coloração com nitrato de prata. Os géis de SDS-PAGE foram realizados numa fase inicial do processo laboratorial da dissertação com o intuito de otimizar os protocolos de extracção das proteínas parasitárias.

IX.2. IX.B. Zimografia com inibição com E-64

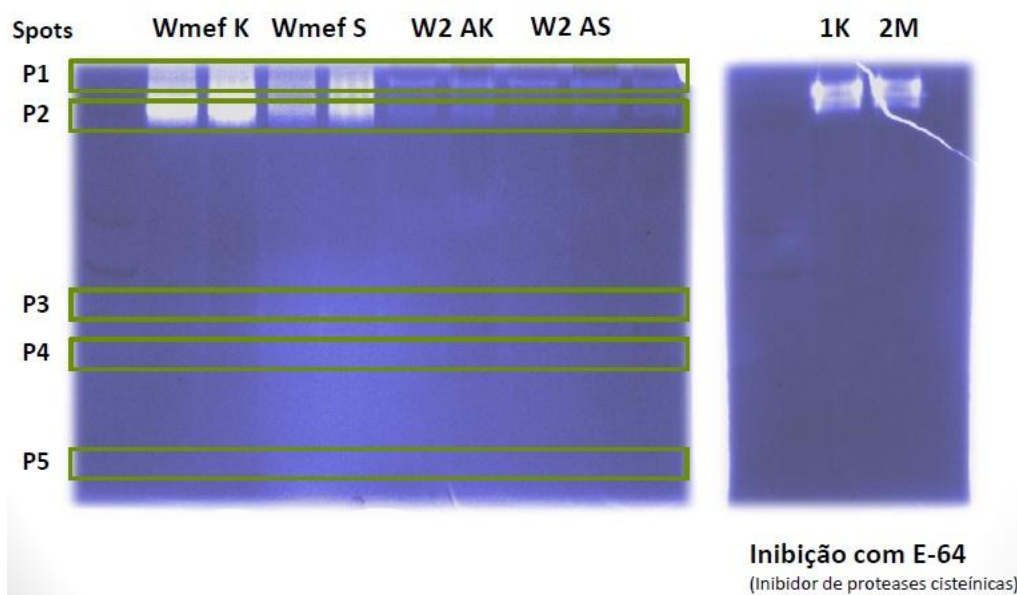


Fig. B1 - Zimografia e zimografia com inibidor de proteases cisteínicas (E-64)

Foi realizada uma zimografia com inibidor de proteases cisteínicas, de forma a verificar se a actividade proteolítica verificada no zimograma poderia ser devida a alguma falcipaina. Os resultados foram concludentes e demonstraram que a actividade verificada não é devida à presença de proteases cisteínicas.

IX.3. IX.C. Caracterização das proteínas identificadas

Tabela C1 – Classificação por função molecular, processo biológico, classe e localização subcelular das proteínas de *P. falciparum* identificadas

Nome	Função Molecular	Processo Biológico	Classe (Panther)	O ¹⁸	iTRAQs
40S ribosomal protein SA (isolate 3D7)				√	
60S acidic ribosomal protein P0 (isolate 7G8)	Molécula de suporte e Ligação	Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos	√	√
60S acidic ribosomal protein P2				√	
78 kDa glucose-regulated protein homolog (Fragment)				√	
78 kDa glucose-regulated protein homolog (isolate NF54)	Não caracterizada	Processo metabólico, Resposta a estímulo e Sistema imune	Chaperona	√	√
Actin-1 (isolate NF54)				√	√
Actin-2 (isolate NF54)	Molécula de suporte	Transporte, Ciclo celular, Processo celular, Organização celular e Desenvolvimento	Proteína do citoesqueleto	√	
Adenosylhomocysteinase (isolate 3D7)		Processo metabólico	Hidrolase	√	
ADP-ribosylation factor 1 GN=ARF1	Atividade catalítica	Transporte	Modelador enzimático	√	
Aspartic acid-rich protein (isolate fcm17 / Senegal)			Hidrolase e Protease	√	
Chaperonin CPN60, mitochondrial (isolate FCR-3 / Gambia)	Não caracterizada	Processo metabólico	Chaperona	√	
Cofilin/actin-depolymerizing factor homolog 1 (isolate HB3)	Molécula de suporte	Processo metabólico e celular, Desenvolvimento e Organização celular	Não caracterizada	√	
Dynein heavy chain-like protein MAL7P1.162 (isolate 3D7)	Atividade catalítica, Movimento e Molécula de suporte	Transporte, Ciclo celular, Processo celular, Reprodução e Desenvolvimento	Hidrolase e Proteína do citoesqueleto	√	
Elongation factor 1-alpha (isolate K1 / Thailand)	Regulador de translação		Ligação a ácidos nucleicos	√	√
Enolase		Processo metabólico			√
Enolase (isolate FCR-3 / Gambia)	Atividade catalítica		Liase	√	
Enolase				√	
Fructose-bisphosphate aldolase				√	√
Glycophorin-binding protein (isolate 3D7)	Atividade catalítica e Ligação			√	
GTP-binding nuclear protein Ran	Regulador enzimático e Ligação	Transporte	Modelador enzimático	√	√
Heat shock 70 kDa protein	Não caracterizada	Processo metabólico, Sistema imune e Resposta a estímulos	Chaperona	√	√
Hexokinase	Atividade catalítica	Processo metabólico	Transferase e Cinase	√	
Histone H2A	Ligação	Processo, Processo metabólico e celular e Organização celular	Ligação a ácidos nucleicos	√	√
Hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase	Atividade catalítica	Processo e Processo metabólico	Transferase	√	
L-lactate dehydrogenase (isolate CDC / Honduras)			Oxidoreductase	√	√
M1 family aminopeptidase (isolate FcB1 / Columbia)	Atividade catalítica	Processo metabólico	Hidrolase Protease	√	
Malaria protein EXP-1		Não caracterizada		√	
MATH and LRR domain-containing protein PFE0570w	Atividade catalítica e Ligação	Processo metabólico e celular	Ligação a ácidos	√	

Identificação de determinantes de resistência em *P. falciparum*

				nucleicos	
Merozoite surface protein 1 (isolate Camp / Malaysia)				√	
Merozoite surface protein 1 (isolate FC27 / Papua New Guinea)				√	
Merozoite surface protein 1 (isolate K1 / Thailand)				√	
Merozoite surface protein 1 (isolate mad20 / Papua New Guinea)	Não caracterizada	"Multi-organism process"	Não caracterizada	√	√
Merozoite surface protein 1 (isolate Palo Alto / Uganda)				√	
Merozoite surface protein 1 (isolate ro-33 / Ghana)				√	√
Merozoite surface protein 1 (isolate Wellcome)				√	
Multidrug resistance protein (isolate FC27 / Papua New Guinea)	Atividade catalítica e de transporte e Substâncias	Sistema imune e Transporte	Transporte	√	
Ornithine aminotransferase (isolate CDC / Honduras)	Atividade catalítica	Processo metabólico e de sistemas	Transferase	√	√
Phosphoglycerate kinase (isolate 3D7)	Atividade catalítica	Processo metabólico	Transferase e Cinase	√	√
Probable cathepsin C (isolate 3D7)			Hidrolase e Protease	√	
Profilin (isolate HB3)	Molécula de suporte	Desenvolvimento, Organização celular e Processo celular	Proteína do citoesqueleto	√	
Proliferating cell nuclear antigen (isolate K1 / Thailand)	Regulador enzimático	Ciclo celular, Processo e Processo celular	Ligação a ácidos nucleicos	√	
Putative cell division cycle ATPase (isolate 3D7)	Ligação proteica	Mitose	Não caracterizada	√	
Putative histone-lysine N-methyltransferase PFF1440w	Atividade catalítica	Processo, Processo metabólico e celular e Organização celular	Transferase e Ligação a ácidos nucleicos	√	
Reticulocyte binding protein 2 homolog b (isolate 3D7)		Processo metabólico, Transporte, Processo Celular, Comunicação celular e Desenvolvimento	Proteína de transferência/transporte	√	
Reticulocyte-binding protein 2 homolog a (isolate 3D7)	Ligação			√	
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit (isolate Dd2)	Atividade catalítica	Processo e Processo metabólico	Oxidoreductase	√	
Ring-infected erythrocyte surface antigen	Atividade catalítica	Processo metabólico e Sistema imune	Oxidoreductase	√	
STI1-like protein (isolate 3D7)	Não caracterizada	Processo metabólico	Chaperona	√	
Translation factor GUF1 homolog, mitochondrial (isolate 3D7)		Não caracterizada		√	
Translationaly-controlled tumor protein homolog (isolate 3D7)					
Translationaly-controlled tumor protein homolog (isolate 3D7)	Molécula de suporte	Sistema imune	Proteína do citoesqueleto	√	
Triosephosphate isomerase	Atividade catalítica	Processo metabólico	Isomerase	√	
Tubulin alpha chain (isolate K1 / Thailand)				√	
Tubulin beta chain (isolate K1 / Thailand)	Molécula de suporte	Transporte, Ciclo celular, Processo celular, Organização celular e Desenvolvimento	Proteína do citoesqueleto	√	√
Tubulin beta chain				√	
Uncharacterized protein PF11_0207 (isolate 3D7)		Não caracterizada		√	
V-type proton ATPase catalytic subunit A	Atividade catalítica, de transporte, de canal iónico e Mecanismo	Não caracterizada	Não caracterizada	√	

Tabela C2 - Classificação por função molecular, processo biológico, classe e localização subcelular das proteínas de *Homo sapiens* identificadas

Protein Name	Função Molecular	Processo Biológico	Panther protein class	O ¹⁸	iTRAQs
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Regulador enzimático e Ligação	Processo metabólico, Ciclo e Processo celular	Modelador enzimático	√	
40S ribosomal protein S18 GN=RPS18	Molécula de suporte e Ligação	Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos	√	
40S ribosomal protein S8 GN=RPS8				√	
55 kDa erythrocyte membrane protein GN=MPP1	Atividade catalítica	Processo de sistemas, metabólico e celular e Comunicação Celular	Transferase, Cinase e Proteína de junção celular	√	
60S ribosomal protein L19 GN=RPL19	Molécula de suporte e Ligação	Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos	√	
78 kDa glucose-regulated protein GN=HSPA5	Não caracterizada	Processo metabólico, Sistema imune e Resposta a estímulos	Chaperona	√	
Actin, alpha skeletal muscle GN=ACTA1	Molécula de suporte	Transporte, Ciclo celular, Processo celular, Organização celular e Desenvolvimento	Proteína do citoesqueleto	√	
Actin, cytoplasmic 2 GN=ACTG1				√	√
Adenylate kinase isoenzyme 1 GN=AK1	Atividade catalítica	Processo metabólico e Process	Transferase e Cinase	√	√
Alpha-enolase GN=ENO1				Processo metabólico	Liase
Ankyrin repeat domain-containing protein 11 GN=ANKRD11		Não caracterizada		√	
Ankyrin-1 GN=ANK1	Molécula de suporte	Comunicação celular, Processo celular, Organização celular e Desenvolvimento	Proteína do citoesqueleto	√	√
Ankyrin-3 GN=ANK3				√	
Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 3 GN=ACAP3	Ligação e Regulador enzimático	Comunicação, Adesão e Processo celular	Ligação a ácidos nucleicos	√	
Band 3 anion transport protein GN=SLC4A1	Atividade de transporte	Transporte, Processo celular, Organização celular e Desenvolvimento	Transporte	√	√
Beta-enolase GN=ENO3	Atividade catalítica	Processo metabólico	Liase	√	
Blood group Rh(D) polypeptide GN=RHD	Atividade de transporte	Transporte	Transporte	√	
Cadherin-23 GN=CDH23	Ligação	Processo de sistemas, Comunicação celular, Adesão celular, Processo celular e Desenvolvimento	Molécula de adesão celular		√
Carbonic anhydrase 1 GN=CA1	Atividade catalítica	Processo metabólico	Liase	√	√
Carbonic anhydrase 2 GN=CA2				√	
Catalase GN=CAT	Atividade catalítica e antioxidante	Sistema imune e Processo metabólico	Oxidoreductase	√	
Centrosomal protein of 170 kDa GN=CEP170		Não caracterizada		√	
Centrosome and spindle pole-associated protein 1 GN=CSPP1	Ligação	Ciclo e Processo celular	Ligação a ácidos nucleicos	√	
Coiled-coil domain-containing protein 39 GN=CCDC39		Não caracterizada		√	
Collagen alpha-1(XII) chain GN=COL12A1	Molécula de suporte	Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína da matrix extracelular	√	
Cullin-7 GN=CUL7	Não caracterizada	Apoptose, Ciclo celular e Processo metabólico e celular	Não caracterizada	√	
Death-inducer obliterator 1 GN=DIDO1		Não caracterizada		√	

Identificação de determinantes de resistência em *P. falciparum*

Dematin GN=EPB49	Molécula de suporte e Ligação	Não caracterizada	Proteína do citoesqueleto	√	
Dynein heavy chain 1, axonemal GN=DNAH1	Movimento ("motor activity"), Atividade catalítica e Molécula de suporte	Reprodução, Transporte, Processo, Organização, Ciclo e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto e Hidrolase	√	
Dynein heavy chain 17, axonemal GN=DNAH17	Molécula de suporte e Ligação	Ciclo, Processo, Adesão, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√	
Dystonin GN=DST	Atividade catalítica	Processo metabólico	Ligase	√	
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 GN=HUWE1	Ligação e Regulador de translação	Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos	√	
Elongation factor 1-alpha 2 GN=EEF1A2	Atividade catalítica	Comunicação e Processo celular e Processo Metabólico	Transferase e Cinase	√	
Elongation factor 2 GN=EEF2	Molécula de suporte	Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína estrutural e do citoesqueleto	√	
Epiplakin GN=EPPK1	Molécula de suporte	Não caracterizada	Proteína do citoesqueleto	√	√
Erythrocyte band 7 integral membrane protein GN=STOM		Não caracterizada		√	√
Erythrocyte membrane protein band 4.2 GN=EPB42				√	√
Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 GN=EIF5A2	Ligação e Regulador de translação	Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos	√	
FERM domain-containing protein 5 GN=FRMD5	Molécula de suporte	Não caracterizada	Proteína do citoesqueleto e de junção celular	√	
Fibrous sheath-interacting protein 2 GN=FSIP2	Não caracterizada	Processo celular	Não caracterizada	√	
Flavin reductase GN=BLVRB	Atividade catalítica	Não caracterizada	Oxidoreductase	√	
Flotillin-1 GN=FLOT1	Não caracterizada	Transporte	Proteína de tráfego membranar	√	
G-protein coupled receptor 98 GN=GPR98	Atividade de transporte	Transporte, Comunicação e Processo celular	Transporte	√	
Gamma-enolase GN=ENO2			Liase	√	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=GAPDH	Atividade catalítica	Processo metabólico		√	√
Glycophorin-A GN=GYP A		Processo metabólico e Produção de metabólitos precursores e de energia	Oxidoreductase	√	
Glycophorin-C GN=GYP C				√	
Golgin subfamily A member 3 GN=GOLGA3		Não caracterizada	Proteína de transferência/transporte e de tráfego membranar	√	
Golgin subfamily A member 4 GN=GOLGA4				√	
GTP-binding nuclear protein Ran GN=RAN	Atividade catalítica e Ligação	Transporte, Ciclo, Comunicação e Processo celular, Processo e Processo metabólico e Localização	Modelador enzimático		√
Heat shock cognate 71 kDa protein GN=HSPA8				√	
Heat shock protein 70 kDa 1A/1B GN=HSPA1A					√
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial GN=TRAP1	Não caracterizada	Sistema imune, Resposta a estímulos e Processo metabólico	Chaperona	√	
Heat shock protein HSP 90-alpha GN=HSP90AA1				√	
Heat shock protein HSP 90-beta GN=HSP90AB1				√	
Heat shock-related 70 kDa protein 2 GN=HSPA2				√	
Helicase SRCAP GN=SRCAP	Atividade catalítica e Ligação	Processo e Processo metabólico e celular, Promotor e Organização celular	Ligação a ácidos nucleicos	√	
Hemoglobin subunit alpha GN=HBA1				√	√
Hemoglobin subunit beta GN=HBB	Não caracterizada	Processo de sistemas e Transporte	Proteína de transferência/transporte	√	√

Hemoglobin subunit delta GN=HBD				√
Histone H2A.V GN=H2AFV				√
Histone H2A.Z GN=H2AFZ				√
Histone H2A type 1-B/E GN=HIST1H2AB				√
Histone H3.1 GN=HIST1H3A	Ligação	Processo, Processo metabólico e celular e Organização celular	Ligação a ácidos nucleicos	√
Histone H3.1t GN=HIST3H3				√
Histone H3.3C GN=H3F3C				√
Histone H4 GN=HIST1H4A				√
Hornerin GN=HRNR			Não caracterizada	√
Integrin alpha-IIb GN=ITGA2B	Não caraterizada	Adesão e Processo celular	Molécula de adesão celular	√
Kell blood group glycoprotein GN=KEL	Atividade catalítica	Processo de sistemas, Comunicação e Processo celular, Processo metabólico e Regulação do processo biológico	Protease e hidrolase	√
Keratin, type I cytoskeletal 10 GN=KRT10				√
Keratin, type I cytoskeletal 9 GN=KRT9				√
Keratin, type II cytoskeletal 1 GN=KRT1				√
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal GN=KRT2	Molécula de suporte	Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto e estrutural	√
Keratin, type II cytoskeletal 3 GN=KRT3				√
Keratin, type II cytoskeletal 6A GN=KRT6A				√
Keratin, type II cytoskeletal 73 GN=KRT73				√
Kinase suppressor of Ras 1 GN=KSR1	Atividade catalítica	Comunicação e Processo celular e Processo Metabólico	Transferase	√
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 GN=MED14	Regulador de transcrição, Ligação e Atividade de receptor	Processo e Processo metabólico e Promotor	Factor de transcrição e Receptor	√
Misshapen-like kinase 1 GN=MINK1	Atividade catalítica	Processo metabólico	Transferase Cinase	√
Myosin-10 GN=MYH10	Movimento ("motor activity") e Molécula de suporte	Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√
Myosin-14 GN=MYH14				√
Myotubularin-related protein 9 GN=MTMR9	Não caraterizada	Reprodução, Processo metabólico e Transporte	Fosfatase	√
Nebulin GN=NEB	Molécula de suporte e Ligação	Processo de sistemas	Proteína do citoesqueleto	√
Nesprin-2 GN=SYNE2	Molécula de suporte e Ligação	Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√
Ninein GN=NIN	Molécula de suporte e Ligação	Não caraterizada	Ligação a ácidos nucleicos e Proteína do citoesqueleto	√
Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2 GN=TYK2	Atividade catalítica	Apoptose, Ciclo, Comunicação e Processo celular, Processo metabólico, Desenvolvimento e Processo de sinalização	Transferase e Cinase	√
Nuclear mitotic apparatus protein 1 GN=NUMA1				√
Nuclear pore complex protein Nup205 GN=NUP205			Não caracterizada	√
Obscurin GN=OBSCN	Molécula de suporte	Processo de sistemas, Adesão, Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Molécula de adesão celular, Proteína do citoesqueleto e de matrix extracelular	√
Periplakin GN=PPL	Molécula de suporte e Ligação	Adesão, Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√

Identificação de determinantes de resistência em *P. falciparum*

Peroxiredoxin-2 GN=PRDX2	Atividade catalítica e antioxidante	Sistema imune e Processo metabólico	Oxidoreductase	√
Plectin GN=PLEC	Molécula de suporte e Ligação	Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√
POTE ankyrin domain family member F GN=POTEF				√
POTE ankyrin domain family member I GN=POTEI			Não caracterizada	√
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60 GN=DDX60	Atividade catalítica e Ligação	Ciclo e Processo celular, Processo e Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos e Hidrolase	√
Probable helicase senataxin GN=SETX	Atividade catalítica e Ligação	Processo de sistemas, Ciclo e Processo celular, Processo e Processo metabólico e Promotor	Ligação a ácidos nucleicos e Hidrolase	√
Protein 4.1 GN=EPB41			Não caracterizada	√
Protein BAT2-like 1 GN=BAT2L1	Atividade catalítica, Ligação e Regulador de transcrição	Processo e Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos e Factor de transcrição	√
Protein GREB1 GN=GREB1			Não caracterizada	√
Protein Shroom3 GN=SHROOM3	Atividade de receptor e de canal iónico, Molécula de suporte e de Ligação	Transporte, Comunicação e Processo celular	Transporte, Receptor e Proteína do citoesqueleto	√
Putative beta-actin-like protein 3 GN=POTEKP	Molécula de suporte	Transporte, Ciclo, Organização, Desenvolvimento e Processo celular	Proteína do citoesqueleto	√
Putative elongation factor 1-alpha-like 3 GN=EEF1AL3	Regulador de translação e Ligação	Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos	√
Putative RAS-related protein Rab-1c GN=RAB1C	Atividade catalítica e Ligação	Comunicação e Processo celular e Transporte	Modelador enzimático	√
Putative RNA-binding protein 15 GN=RBM15	Ligação	Não caracterizada	Ligação a ácidos nucleicos	√
Putative tropomyosin alpha-3 chain-like protein	Movimento ("motor activity") e Molécula de suporte	Processo de sistemas, Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√
Rab11 family-interacting protein 1 GN=RAB11FIP1			Não caracterizada	√
RAD51-associated protein 1 GN=RAD51AP1	Não caracterizada	Processo e Processo metabólico	Não caracterizada	√
Ras-related protein Rab-11B GN=RAB11B	Atividade catalítica e Ligação	Transporte, Comunicação e Processo celular	Modelador enzimático	√
Ras-related protein Rab-33B GN=RAB33B				√
Ras-related protein Rap-1b GN=RAP1B	Ligação e Regulador de transcrição	Processo e Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos e Factor de transcrição	√
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	Atividade catalítica e de receptor	Comunicação, Processo, Adesão e Desenvolvimento celular e Processo metabólico	Receptor, Fosfatase e Hidrolase	√
Rho guanine nucleotide exchange factor 11	Ligação e Regulador enzimático	Comunicação, Adesão, Ciclo e Processo celular, Transporte, Processo metabólico e Apoptose	Modelador enzimático	√
RIMS-binding protein 3B GN=RIMBP3B	Não caracterizada	Processo de sistemas e Comunicação e Processo celular	Não caracterizada	√
Ryanodine receptor 2 GN=RZR2	Atividade de canal iónico e de receptor	Processo de sistemas, Processo e Comunicação celular e Transporte	Transporte e Receptor	√
Sentrin-specific protease 7 GN=SEN7	Atividade catalítica	Processo metabólico	Ligase	√
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Ligação	Processo e Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos	√
Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1				√
Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2	Atividade catalítica	Ciclo, Comunicação e Processo celular, Processo e Processo metabólico	Transferase e Cinase	√

X

Serum albumin GN=ALB PE=1 SV=2	Não caracterizada	Transporte	Proteína de transferência/transporte	√
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 GN=SLC2A1 SV	Atividade de transporte	Transporte e Processo metabólico	Transporte	√ √
Sorting nexin-5 GN=SNX5	Não caracterizada	Transporte	Proteína de tráfego membranar	√
Spectrin alpha chain, erythrocyte GN=SPTA1				√ √
Spectrin beta chain, brain 1 GN=SPTBN1	Molécula de suporte e Ligação	Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√
Spectrin beta chain, brain 2 GN=SPTBN2				√
Spectrin beta chain, erythrocyte GN=SPTB				√ √
StAR-related lipid transfer protein 9 GN=STARD9	Não caracterizada	Reprodução e Processo metabólico	Proteína de transferência/transporte e de tráfego membranar	√
Stomatin-like protein 3 GN=STOML3	Molécula de suporte	Não caracterizada	Proteína do citoesqueleto	√
Stress-70 protein, mitochondrial GN=HIST1H2AB	Não caracterizada	Sistema imune, Processo metabólico e Resposta a estímulos	Chaperona	√
Striated muscle preferentially expressed protein kinase GN=SPEG	Molécula de suporte	Processo de sistemas e Adesão e Processo celular	Proteína do citoesqueleto, da matrix extracelular e Molécula de adesão celular	√
T-complex protein 1 subunit alpha GN=TCP1	Não caracterizada	Processo metabólico	Chaperona	√
Tau-tubulin kinase 2 GN=TTBK2	Atividade catalítica	Ciclo e Processo celular e Processo metabólico	Transferase e Cinase	√
Titin GN=TTN	Molécula de suporte	Processo de sistemas	Proteína do citoesqueleto	√
TPR and ankyrin repeat-containing protein 1 GN=TRANK1		Não caracterizada		√
Trichohyalin GN=TCHH	Ligação	Não caracterizada	Proteína de ligação ao cálcio	√
Triple functional domain protein GN=TRIO	Ligação e Regulador enzimático	Processo de sistemas e Comunicação e Processo celular	Modelador enzimático	√
Tropomodulin-1 GN=TMOD1	Molécula de suporte e Ligação	Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√
Tropomodulin-4 GN=TMOD4				√
Tropomyosin alpha-1 chain GN=TPM1	Molécula de suporte e de Movimento	Processo de sistemas, Processo, Organização e Desenvolvimento celular	Proteína do citoesqueleto	√
Tropomyosin alpha-4 chain GN=TPM4				√
Tubulin alpha chain-like 3 GN=TUBAL3	Molécula de suporte	Ciclo, Processo, Organização e Desenvolvimento celular e Transporte	Proteína do citoesqueleto	√
Tyrosine-protein kinase SYK GN=SYK	Atividade catalítica	Sistema imune, Comunicação, Processo e Desenvolvimento celular e Resposta a estímulos	Transferase e Cinase	√
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23 GN=PTPN23	Atividade catalítica	Ciclo, Processo e Comunicação celular e Processo metabólico	Fosfatase e Hidrolase	√
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a GN=RPS27A	Molécula de suporte e Ligação	Processo metabólico	Ligação a ácidos nucleicos	√
Ubiquitin conjugation factor E4 B GN=UBE4B	Ligação e Regulador enzimático	Apoptose e Processo metabólico	Modelador enzimático	√
Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats GN=UACA		Não caracterizada		√
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H GN=CACNA1H	Atividade de transporte e de canal iónico	Processo de sistemas, transporte, Comunicação e Processo celular	Transporte	√
von Willebrand factor GN=VWF	Não caracterizada	Sistema imune, Adesão e Processo celular e Resposta a estímulos	Proteína da matrix extracelular	√
WD repeat-containing protein 26 GN=WDR26		Não caracterizada		√

Identificação de determinantes de resistência em *P. falciparum*

Zinc finger protein 106 homolog GN=ZFP106	Atividade catalítica e Ligação	Ciclo e Processo celular, Processo metabólico e Produção de metabolitos percursos e de energia	Ligação a ácidos nucleicos e Ligase	√
--	-----------------------------------	--	-------------------------------------	---

IX.4. IX.D. Identificações zimografia

Tabela D1 - Listagem das proteínas identificadas, a partir dos spots excisados do zimograma. Identificação realizada por MS/MS MALDI

Spot	Protein Name	Accession Number	Protein MW	Protein PI	Peptide Count	Best Ion Score C.I. %
P1	L-lactate dehydrogenase OS=Pf (isolate CDC / Honduras) PE=1 SV=1	LDH_PLAFD	34085,99	7,12	2	100,00
	Hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase OS=Pf (isolate K1 / Thai	HGXR_PLAFK	26375,57	7,59	2	100,00
	Ornithine aminotransferase OS=Pf (isolate CDC / Honduras) GN=OAT PE=1 SV=1	OAT_PLAFD	46025,45	6,47	2	99,99
	Tubulin beta chain OS=Pf PE=3 SV=1	TBB_PLAFA	49781,87	4,69	1	99,99
	78 kDa glucose-regulated protein homolog OS=Pf (isolate NF54) PE=3 SV=1	GRP78_PLAFO	72731,25	5,18	1	100,00
	Enolase OS=Pf GN=ENO PE=3 SV=1	ENO_PLAFA	48673,28	6,21	1	100,00
P2	L-lactate dehydrogenase OS=Pf (isolate CDC / Honduras) PE=1 SV=1	LDH_PLAFD	34085,99	7,12	2	100,00
	M1 family aminopeptidase OS=Plasmodium falciparum (isolate FcB1 / Columbia)	AMP1_PLAFQ	125982,69	7,30	8	100,00
	Tubulin beta chain OS=Pf PE=3 SV=1	TBB_PLAFA	49781,87	4,69	1	99,99
P3	L-lactate dehydrogenase OS=Pf (isolate CDC / Honduras) PE=1 SV=1	LDH_PLAFD	34085,99	7,12	3	100,00
	78 kDa glucose-regulated protein homolog OS=Pf (isolate NF54) PE=3 SV=1	GRP78_PLAFO	72731,25	5,18	1	100,00
	Hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase OS=Pf (isolate K1 / Thai	HGXR_PLAFK	26375,57	7,59	1	99,98
P4	L-lactate dehydrogenase OS=Pf (isolate CDC / Honduras) PE=1 SV=1	LDH_PLAFD	34085,99	7,12	3	100,00
	78 kDa glucose-regulated protein homolog OS=Pf (isolate NF54) PE=3 SV=1	GRP78_PLAFO	72731,25	5,18	1	100,00
P5	L-lactate dehydrogenase OS=Pf (isolate CDC / Honduras) PE=1 SV=1	LDH_PLAFD	34085,99	7,12	1	100,00
	78 kDa glucose-regulated protein homolog OS=Pf (isolate NF54) PE=3 SV=1	GRP78_PLAFO	72731,25	5,18	1	100,00