



**Universidade de Brasília**

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**TESE DE DOUTORADO:**

**Estudo dos efeitos moleculares e celulares  
da rottlerina durante a esquizogonia  
eritrocítica de *Plasmodium falciparum***

THUANY DE MOURA CORDEIRO

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília – DF

THUANY DE MOURA CORDEIRO

**Estudo dos efeitos moleculares e celulares da rottlerina  
durante a esquizogonia eritrocítica de *Plasmodium  
falciparum***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília  
2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Moura Cordeiro, Thuany  
dT532e      Estudo dos efeitos moleculares e celulares da rottlerina  
durante a esquizogonia eritrocítica de Plasmodium falciparum  
/ Thuany de Moura Cordeiro; orientador Sébastien Charneau.  
-- Brasília, 2018.  
123 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) --  
Universidade de Brasília, 2018.

1. Plasmodium falciparum. 2. malária. 3. rottlerina. 4.  
proteômica. I. Charneau, Sébastien, orient. II. Título.

Trabalho desenvolvido em cooperação entre o Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e Interação Patógeno- Hospedeiro pertencentes ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília; e da equipe *Biodiversité et Adaptation des Microorganismes Eucaryotes à leur Environnement* (BAMEE) du UMR 7245 CNRS Département Régulations Développement Diversité Moléculaire, Muséum National D'Histoire Naturelle.

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que por sua imensa bondade e misericórdia, por ter me permitido alcançar meus sonhos.

Dedico, ainda, a todas as pessoas que sofrem ou já sofreram pelos danos causados pela malária. Espero que um dia tenhamos as armas eficazes para combater esta doença.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador **Prof. Sébastien Charneau**, pela orientação deste trabalho de tese, pela confiança no meu trabalho e pela amizade. Aprendi muito ao trabalhar ao seu lado durante mais de 6 anos. Obrigada por tudo!

Je remercie très sincèrement le **Professeur Philippe Grellier** pour m'avoir accueilli généreusement dans son laboratoire et pour avoir dirigé mon travail de thèse pendant mon stage de doctorat sandwich. Mais surtout, je te remercie pour ta formidable collaboration pour ma formation scientifique.

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo consentimento da bolsa de doutorado e, através do programa PDSE, pelo consentimento da bolsa de doutorado sanduíche.

À **Fundação Hemocentro de Brasília** pelo provisionamento de hemocomponentes, parceria indispensável para a realização da minha pesquisa e do laboratório como um todo.

Agradeço ao grupo de pesquisa **Malária Molecular** pelas discussões e aprendizado. Em especial a **Renata Garcia** por sua imensa ajuda e por sua amizade.

Agradeço aos Professores e colegas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, em particular ao **Prof. Carlos André Ricart** por sua ajuda na implementação da linha de pesquisa de malária na UnB e ao **Prof. Wagner Fontes** pelo auxílio no espectrômetro de massas.

Agradeço ao **Dr. Jaques Souza** pela ajuda nas análises no espectrômetro de massas, pelas discussões científicas indispensáveis e, claro, pela amizade e apoio.

Agradeço ao **Reynaldo** pela ajuda com o R (linguagem de programação).

Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório Interação Parasito-Hospedeiro. Em especial ao **Prof. Jaime Santana e Profa. Izabela Dourado Bastos** pela colaboração indispensável para esta pesquisa.

Agradeço a **Dra. Camila Lasse, Dra. Milene Andrade, Msc. Clênia Azevedo e Msc. Yanna Reis** pelo apoio e companheirismo.

Je remercie tous les membres du laboratoire Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes (MCAM) et particulièrement tous ceux de l'équipe Biodiversité et Adaptation des Microorganismes Eucaryotes à leur Environnement (BAMEE) pour votre aide e pour tous les moments partagés.

Merci à mes collègues Amandine LABAT, Brice MOLLINELI, Lisy RAVEENDRAN, Caroline THALER, Christiane DEREGNAUCOURT, Elisabeth MOURAY et Delphine DEPOIX.

Merci à **Soraya CHAOUCH** pour m'avoir aidée pour la RT-qPCR et la cytométrie de flux. Mais surtout Soraya, je te remercie pour ton amitié, ta gentillesse, ta douceur. Tu es une personne merveilleuse !! Je suis immensément reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi ! Je serai ton amie pour toujours.

Merci à **Cissé SOW et Mélanie DACHEUX** pour votre amitié, votre aide, pour votre gentillesse, pour partager le bureau avec moi. Merci pour votre bonne humeur, pour m'aider avec le français et pour chaque moment que nous avons passé ensemble (principalement le musicale *Body Guard*).

Agradeço ao Prof. Paulo Carvalho e Marlon dos Santos pela ajuda com as análises do PatternLab, pelas discussões científicas que me permitiram compreender melhor meus resultados.

Agradeço a **Msc. Hialy Poli** pela amizade e apoio para a preparação das amostras para proteômica.

Agradeço ao **Dr. Rayner Queiroz** pelas discussões sobre os protocolos de espectrometria de massas e análise bioinformática. E sobretudo pela amizade! Eu sei que te devo muitas libras (pode colocar tudo na conta de Sébastien).

Agradeço ao meu esposo **Caio Nery, amor da minha vida**, por todo o apoio, compreensão, paciência e carinho. Obrigada por passar madrugadas e finais de semana comigo no laboratório, por me aturar nos momentos de estresse. Mas acima de tudo, obrigada por seu amor, por ser meu porto-seguro nos momentos difíceis. Você sabe da sua importância para que esta tese.

Agradeço à minha mãe **Edinalda** por ser meu exemplo de caráter. Por me amar de forma incondicional, por sempre estar disposta a me acolher em qualquer circunstância. Te amo mãe, obrigada por tudo!!

Agradeço às minhas irmãs, **Nathany e Gabriela** pelo apoio de sempre! Aos meus sobrinhos **Miguel, Théo e Pietra** por trazerem alegria a minha vida. Agradeço ao meu pai, **Joaquim** pelo carinho, apoio, torcida. Amo vocês demais!!

Agradeço ao meu cunhado **Alexandre** pelo apoio e amizade de sempre!

Agradeço à minha sogra **Emilcy Nery** pelo apoio, carinho, pelas palavras de motivação. Obrigada por tudo que fez e faz por mim!

Agradeço aos meus amigos da ‘**Maison du Brésil**’ por terem me acolhido, por fazerem parte deste momento especial que estive em Paris. Por serem a minha família neste período. Gostaria de desatacar àqueles que estavam presentes diariamente: **Anita Fattori, Rita Kramer, Luiza Riccio, Fábio Antoniali, Gerson Duarte, Fabriccio Novelli, Filippo Gati, Murilo Garcia, Rodrigo Santos.** Em especial agradeço ao **Lúcio Abreu e Bruna Cavazza.** **Lúcio**, meu amigo-irmão, obrigada por todas as nossas conversas sobre ciência e sobre a vida, pelas comidas maravilhosas que você sempre preparou com carinho. Você é um amigo muito especial!! Serei eternamente grata por tudo que você fez por mim! **Bruna**, minha querida amiga, obrigada por todos os momentos que passamos juntas, por me acolher nos momentos difíceis, por estar presente nos momentos importantes, amo você!

Agradeço aos membros da banca, Prof. Carlos André Ricart, Prof. Fábio Costa, Prof. Philippe Grellier e Dr. Samuel Mandacaru, por terem avaliado meu trabalho de tese.

Enfim, agradeço a **todas as pessoas** que, direta ou indiretamente, me apoiaram ao longo destes anos de doutorado.

Agradeço a **Deus**, que me permitiu chegar até aqui, por ter me presenteado com SEU favor e amor, trazendo sobre mim oportunidades benditas e promessas maravilhosas. Por ser este Deus amoroso, bondoso, misericordioso, sempre disposto a perdoar às minhas falhas e me ensinar o caminho correto. "*Mais importante que o lugar que ocupas em mim, é a intensidade de tua presença em tudo que faço.*"



## **APOIO FINANCEIRO**

Este projeto foi desenvolvido graças ao apoio financeiro da Universidade de Brasília (UnB) e das agências de fomento à pesquisa brasileira, a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [bolsa de doutorado e bolsa PDSE], o CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [430610/2016-5], FAPDF- Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal [193.000.987-2015; 193.001.723/2017], FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos [CT-Infra 2011] e especificamente os programas: Cooperação franco-brasileira CAPES-COFECUB [723/11 e 923/18], Rede Pró-Centro-Oeste (INCT-CNPq-FAPEG [465771/2014-9]), e Incentivo a Pesquisa em Parasitologia Básica (CAPES 23038.005298/2011-83).

*“La vie n’est facile pour aucun d’entre nous. Et alors ? Nous devons être persévérants et avant tout avoir confiance en nous. Nous devons croire que nous sommes doués pour quelque chose et que cette chose doit être atteinte.”*

Marie Curie

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, incluindo a espécie *P. falciparum*, que é a mais perigosa, pois é responsável pela maioria das mortes relacionadas a esta doença. O surgimento da resistência do *P. falciparum* à maioria dos fármacos antimaláricos tem destacado a urgência de identificar e esclarecer os mecanismos de novas drogas antimaláricas. A fisiopatologia da malária se deve, principalmente, ao desenvolvimento e multiplicação do parasito dentro dos eritrócitos, aos repetidos ciclos eritrocíticos, e as modificações da morfologia da célula hospedeira induzida pelo parasito. A sequência ordenada dos eventos celulares do ciclo eritrocítico já é razoavelmente bem definida no nível subcelular, mas as moléculas envolvidas em níveis estruturais e regulatórios e a interação entre elas ainda não são completamente conhecidas. Foi observado que o produto natural, rottlerina, inicialmente caracterizado como um inibidor de PKC $\delta$  e, recentemente, considerado como um antioxidante e também como um potencial efetor de autofagia, quando aplicado na cultura do parasita causa especificamente uma morte rápida de esquizontes de *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> < 1  $\mu$ M). De fato, a análise da população de esquizontes em cultura tratada com rottlerina em comparação com não tratada revelou que houve uma inibição da diferenciação de merozoítos, resultando na morte rápida do parasito, com a formação de estruturas autofágicas. Desta forma, a rottlerina têm se mostrado uma ferramenta interessante para abordar os mecanismos moleculares que controlam a morfogênese dos merozoítos. No intuito de melhorar o nosso conhecimento sobre os efeitos desta molécula na morfogênese dos merozoítos de *P. falciparum*, uma análise proteômica e fosfoproteômica quantitativa utilizando a abordagem por marcação isotópica iTRAQ® baseada em nano LC-MS/MS foi realizada. Após 90 min de tratamento com a rottlerina, observou-se que 79 proteínas e 53 fosfopeptídeos do *P. falciparum* foram significativamente modulados. Estas proteínas foram agrupadas em processos celulares, sendo que processo metabólico, resposta ao estresse, proteínas relacionadas ao DNA, adesão e invasão e a maquinaria de exportação (PTEX) foram os processos que tiveram uma modulação do proteoma e/ou fosfoproteoma mais proeminentes. Embora algumas dessas proteínas já tenham sido descritas como sendo desreguladas pela ação de outras drogas, uma resposta específica ao tratamento com a rottlerina foi distinguida e parece envolver proteínas mitocondriais, relacionadas ao DNA e o PTEX. No entanto, nenhum efeito proeminente ao nível transcricional foi observado. Estes dados fornecem então um ponto de partida para a elucidação do mecanismo de ação da rottlerina no *P. falciparum*.

**Palavras-chave:** *Plasmodium falciparum*, malária, rottlerina, morfogênese de merozoítos, proteômica quantitativa, autofagia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA INTRODUÇÃO

<b>Figura 1.</b> Distribuição epidemiológica da malária pelo mundo, destacando as regiões endêmicas .....	21
<b>Figura 2.</b> Taxa de incidência e mortalidade da malária entre 2010 – 2017 em regiões endêmicas.. .....	22
<b>Figura 3.</b> Distribuição epidemiológica da malária na América no Brasil .....	23
<b>Figura 4.</b> Principais estratégias para a prevenção e controle da malária.....	29
<b>Figura 5.</b> As principais classes de fármacos antimaláricos. ....	31
<b>Figura 6.</b> Distribuição epidemiológica da resistência de <i>Plasmodium falciparum</i> aos fármacos antimaláricos.....	32
<b>Figura 7.</b> Fluxograma geral das vacinas contra malária.....	35
<b>Figura 8.</b> Classificação filogenética dos agentes etiológicos da malária .....	37
<b>Figura 9.</b> Ciclo biológico dos protozoários causadores da malária .....	38
<b>Figura 10.</b> Alterações da morfologia dos eritrócitos induzidas pelo <i>P. falciparum</i> . ....	40
<b>Figura 11.</b> Morfologia do estágio esquizonte de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	43
<b>Figura 12.</b> Morfologia do estágio de merozoítos de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	45
<b>Figura 13.</b> A árvore <i>Mallotus philippinensis</i> (Kamala) e a estrutura química da rottlerina....	46
<b>Figura 14.</b> Efeitos conhecidos da rottlerina em células. ....	47

## LIST OF MANUSCRIPT FIGURES

<b>Figure 1.</b> Effect of rottlerin during <i>Plasmodium falciparum</i> parasite growth.....	64
<b>Figure 2.</b> Electron micrographs of <i>Plasmodium falciparum</i> parasites showing autophagic-like cell death morphology in the presence of rottlerin .....	66
<b>Figure 3.</b> Global analysis of phosphorylation patterns.....	67
<b>Figure 4.</b> Gene Ontology terms from all <i>Plasmodium falciparum</i> identified proteins .....	68
<b>Figure 5.</b> Comparison of the numbers of regulated proteins displayed during schizogony and due to the treatment, respectively. ....	69
<b>Figure 6.</b> Expression profiles of regulated proteins between T0, C1h30 and R1h30 .....	74
<b>Figure 7.</b> The protein-protein interaction network of rottlerin-modulated proteins groups using STRING database .....	78
<b>Figure 8.</b> Co-expression network of the rottlerin-modulated protein groups using STRING database .....	79
<b>Figure 9.</b> Relative mRNA expression levels of <i>Plasmodium falciparum</i> targets genes .....	87

<b>Figure 10.</b> Schematic representation of the proposed relation between the phenotypic effects of the rottlerin and the proteome and phosphoproteome alterations in the <i>Plasmodium falciparum</i> schizont.....	96
<b>Figure S1.</b> Schematic representation of treatment with rottlerin or DMSO from cultures of <i>Plasmodium falciparum</i> strain S20 synchronized. ....	103
<b>Figure S2.</b> Workflow of global proteomics analysis of Rottlerin effects on <i>Plasmodium falciparum</i> schizont.....	104
<b>Figure S3.</b> Electrophoretic profile of <i>Plasmodium falciparum</i> schizont proteins .....	105
<b>Figure S4.</b> Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from <i>Plasmodium falciparum</i> schizont .....	105
<b>Figure S5.</b> Evaluation of rottlerin effect on <i>Plasmodium falciparum</i> schizogony by flow cytometry using YOYO-1 staining. ....	106
<b>Figure S6.</b> Volcano plot of differentially regulated peptides between control and rottlerin-treated parasites .....	106
<b>Figure S7.</b> Immunofluorescence assay of <i>Plasmodium falciparum</i> using the anti-PfPDI-8 on rottlerin-treated and control parasites by confocal microscopy.....	107

## LISTA DE TABELAS DA INTRODUÇÃO

**Tabela 1.** Datas da introdução e do primeiro relato da resistência às drogas antimaláricas ... 32

## LIST OF MANUSCRIPT TABLES

<b>Table 1.</b> <i>Plasmodium falciparum</i> proteins with modulated abundance between control samples and rottlerin-treated parasites .....	70
<b>Table 2.</b> <i>Plasmodium falciparum</i> phosphoproteins with modulated abundance between untreated and rottlerin-treated parasites .....	81
<b>Supplementary Table S1.</b> Antiplasmodial activity of rottlerin. ....	99
<b>Supplementary Table S2.</b> Primer sequences for qRT-PCR analysis.....	100
<b>Supplementary Table S3.</b> <i>Plasmodium falciparum</i> and human erythrocyte proteins identified .....	101
<b>Supplementary Table S4.</b> <i>Plasmodium falciparum</i> phosphopeptides and phosphoproteins identified.....	101
<b>Supplementary Table S5.</b> Relative fold- change of mRNA of the genes with statistical difference obtained by qRT-PCR for each group .....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ACT – Terapia de Combinação baseada em Artemisinina (*Artemisinin-based Combination Therapy*)

ANOVA - Análise de variância (*Analysis of Variance*)

ART - Artemisinina

ATG – Proteínas codificadas pelos genes relacionados à autofagia

ATP - adenosina trifosfato

bp- pares de base

cDNA- DNA complementar

CQ – Cloroquina

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTT – Ditioneitol

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ER – Retículo Endoplasmático

FDR - Taxa de descoberta de falsos positivos (*False discovery rate*)

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)

GO – Ontologia de gene (*Gene ontology*)

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

hpi – hora pós-invasão (*h post- invasion*)

Hsp- proteínas de choque térmico (*Heat shock protein*)

IAA - iodoacetamida

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória necessária para inibir 50% da população

IC<sub>90</sub> - Concentração inibitória necessária para inibir 90% da população

iTRAQ - Marcação isobárica para quantificação absoluta e relativa (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*)

KDa- quilodalton

LC – MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa

MSP - Proteínas de superfície do merozoíto

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)

PBS - Salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PE – Fosfatidiletanolamina

Pf- *Plasmodium falciparum*

PKA – Proteína cinase A

PKC- Proteína cinase C

PKC $\delta$  – Proteína cinase C isotipo delta

PTEX- *Plasmodium* translocon para exportação de proteínas (*Plasmodium translocon of exported proteins*)

PTM- Modificação pós-traducional (*Posttranslational modification*)

ROS- Espécie reativa de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

SDS – dodecilsulfato de sódio

SNAP - S-nitroso-N-acetil-penicilamina

TEAB - Bicarbonato de trietilamônio (*Triethylammonium bicarbonate buffer*)

TFA – ácido trifluoroacético

TiO<sub>2</sub> - Dióxido de titânio

WHO - *World Health Organization* (OMS - Organização Mundial da Saúde)



## SUMÁRIO

<b>ESCOPO DA TESE .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 A Malária .....</b>	<b>20</b>
1.1.1 Epidemiologia da Malária no Mundo e no Brasil .....	21
1.1.2 Características clínicas da doença e patogênese .....	24
1.1.3 Diagnóstico .....	27
<b>1.2 A luta contra a malária .....</b>	<b>27</b>
1.2.1 Tratamento farmacológico da malária e a resistência aos antimaláricos .	29
1.2.2 Vacinas contra à malária .....	34
<b>1.3 A Biologia do <i>Plasmodium falciparum</i> .....</b>	<b>36</b>
1.3.1. Classificação filogenética dos agentes causadores da malária.....	36
1.3.2 Ciclo de vida do <i>P. falciparum</i> .....	38
1.3.3 Esquizogonia eritrocítica: a morfogênese dos merozoítos .....	41
<b>1.4 A rottlerina .....</b>	<b>45</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>49</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>53</b>
<b>4. MANUSCRITO.....</b>	<b>54</b>
<b>Rottlerin-mediated autophagy-like leads to cell death of <i>Plasmodium falciparum</i> precisely during merozoite morphogenesis .....</b>	<b>55</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS .....</b>	<b>108</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>

## ESCOPO DA TESE

Esta tese está apresentada da seguinte forma: **Introdução, Justificativa, Objetivos, Manuscrito, Considerações Finais e Perspectivas e Referências.**

A **Introdução geral da tese** apresenta uma revisão teórica sobre o objeto de estudo desta tese, a malária e o *Plasmodium falciparum*.

A **Justificativa** indica de forma direta os motivos científicos para a realização da pesquisa.

Os **Objetivos** são compreendidos entre o geral e as etapas metodológicas.

A **Metodologia, Resultados e Discussão** estão apresentados na forma de um manuscrito intitulado “**Rottlerin-mediated autophagy-like leads to cell death of *Plasmodium falciparum* precisely during merozoite morphogenesis**”, que será posteriormente submetido para publicação.

E por fim, as **Considerações Finais e Perspectivas** e as **Referências**.

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 A Malária

A malária ou paludismo é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que infecta dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. O termo malária deriva da palavra italiana “*mal’aria*, que significa "ar ruim", devido a associação precoce desta doença com áreas pantanosas. Somente no final do século XIX, que o cirurgião do exército francês Charles Louis Alphonse Laveran observou a presença de parasitos no sangue de um paciente acometido pela malária, e o médico britânico Ronald Ross descobriu que mosquitos transmitiam malária (Tuteja, 2007).

Existem mais de 100 espécies de parasitos pertencentes ao gênero *Plasmodium* que são capazes de infectar inúmeras espécies de animais, como répteis, aves e vários mamíferos. Mas apenas 5 destas espécies são capazes de infectar os seres humanos: *P. falciparum* e *P. vivax* são os mais comuns e os seres humanos são os hospedeiros mamíferos exclusivos; *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri* e *P. malariae* com menor incidência. Recentemente, o *P. knowlesi* surgiu como agente etiológico da malária em humanos principalmente no sudeste asiático. Estas espécies diferem entre si nos aspetos: morfológicos, imunológicos, distribuição geográfica, padrões de ocorrência de infecção e transmissão e, também na resposta aos antimaláricos (Tuteja, 2007; White *et al.*, 2014; Cowman *et al.*, 2016)

Entretanto, já existem indícios de que outras espécies podem infectar os humanos, como é o caso do *P. simium*, um parasito até então conhecido por sua capacidade de infectar macacos e que recentemente foi relato como causador de malária em humanos (Brasil *et al.*, 2017). Neste caso, denomina-se malária zoonótica, e o *P. knowlesi* é um exemplo deste tipo de malária. O surgimento recente de uma forma de malária como zoonose apresenta complicações óbvias para a eliminação desta doença (Phillips *et al.*, 2017).

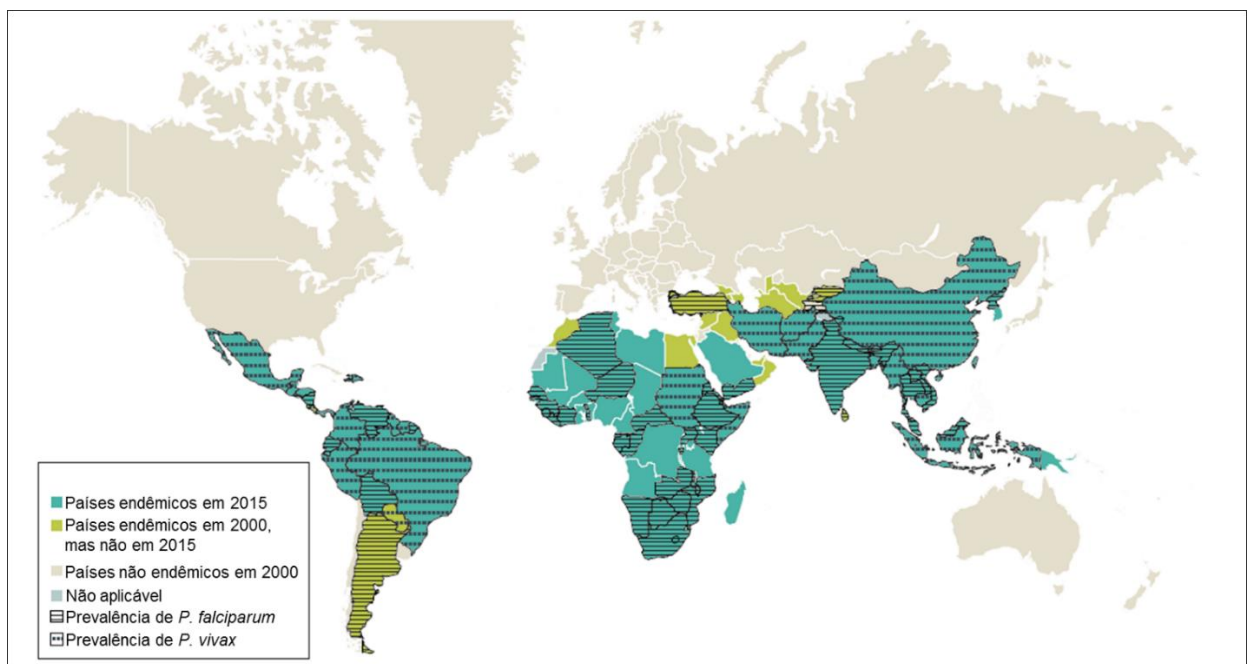
O *P. falciparum* é considerado a espécie mais perigosa, pois é o principal agente etiológico envolvido nos casos de malária grave (malária cerebral) e complicações da gravidez; consequentemente, é o principal responsável pelo número de mortes relacionadas doença, matando aproximadamente 1.200 crianças com menos de 5 anos na África por dia (Phillips *et al.*, 2017).

A malária é transmitida ao ser humano através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Existem mais de 400 espécies das quais cerca de 60 são vetores de malária, mas somente 25 destas são vetores importantes da doença (White *et al.*, 2014).

### 1.1.1 Epidemiologia da Malária no Mundo e no Brasil

A malária é considerada um grande problema de saúde global há anos e continua a ser uma das doenças infecciosas mais graves e potencialmente fatais. É, também, uma das principais causas da mortalidade infantil em todo o mundo, matando uma criança a cada 2 minutos (OMS, 2018). Estima-se que mais de 40% da população mundial (cerca de 3.2 bilhões de pessoas) está sob risco de contrair esta doença (OMS 2015).

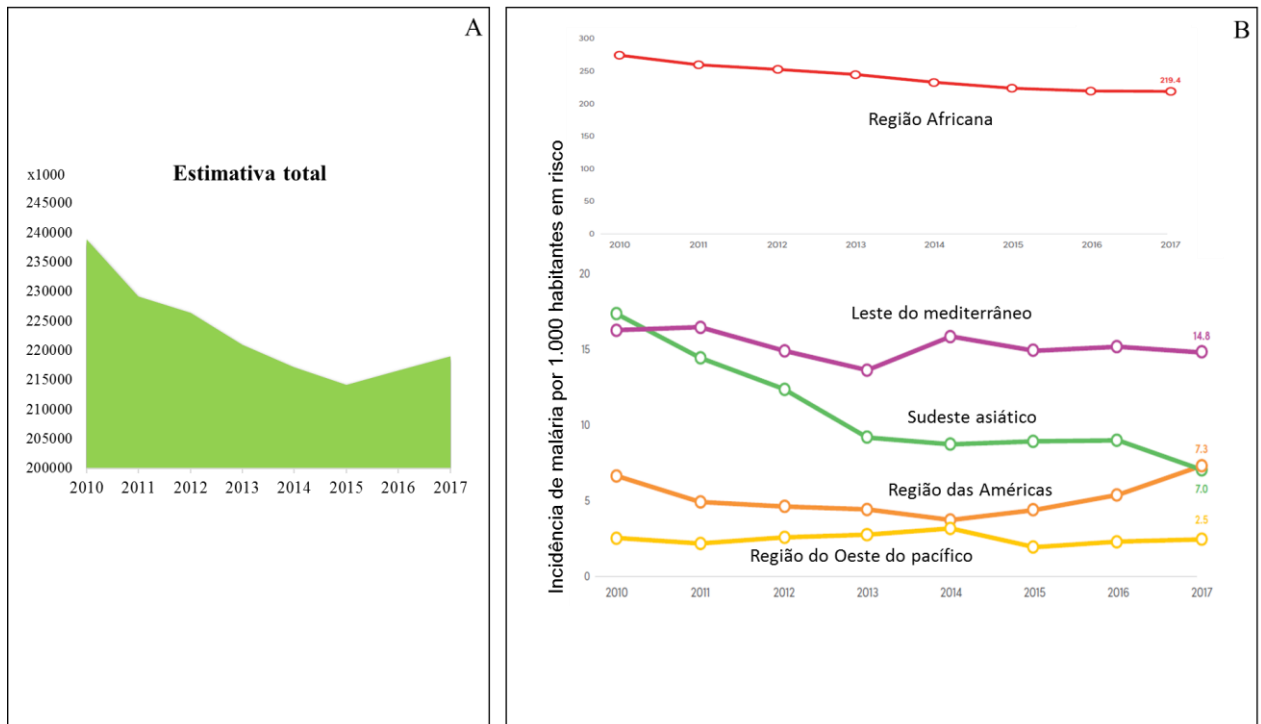
A distribuição epidemiológica da malária é mais relevante nas áreas tropicais e subtropicais (Fig. 1), devido às chuvas, altas temperaturas e alta umidade, assim como a existência de água parada, o que proporciona um ambiente favorável para a proliferação do mosquito- vetor (Phillips *et al.*, 2017). As infecções por *P. falciparum* ocorrem principalmente nas áreas tropicais, pois os gametócitos desta espécie necessitam entre 10 e 18 dias em temperaturas  $> 21^{\circ}\text{C}$  para amadurecer e se diferenciar em esporozoítos dentro do inseto.



**Figura 1.** Distribuição epidemiológica da malária pelo mundo, destacando as regiões endêmicas (adaptado Phillips *et al.*, 2017).

O *World Malaria Report* (2018) estimou em aproximadamente 219 milhões os casos de malária no mundo em 2017. A maioria destes casos ocorreram na África (92%), seguido pelo sudeste asiático (5%) e a Região do Mediterrâneo Oriental (2%). Embora tenha havido cerca de 20 milhões de casos a menos de malária em 2017 comparado ao ano 2010, os dados para o período 2015-2017 mostram que houve um aumento no número de casos de malária desde 2015. Principalmente na região das Américas, que apresentou um aumento na taxa de incidência e

mortalidade entre 2014- 2017 (Fig. 2), em grande parte devido ao aumento no número de casos no Brasil, Nicarágua e Venezuela.



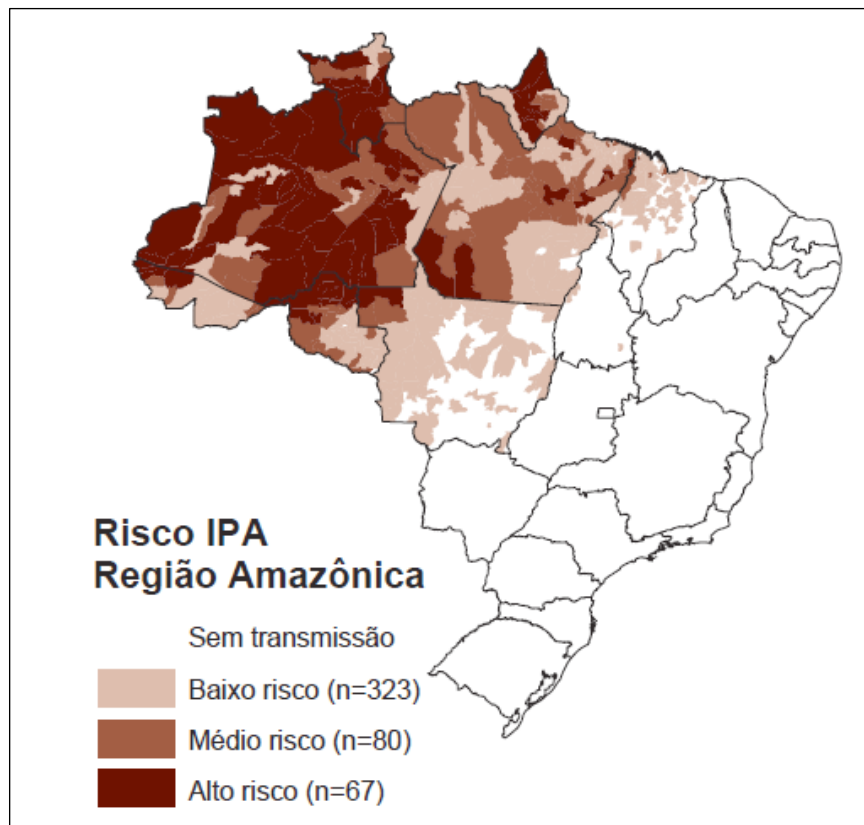
**Figura 2.** Taxa de incidência da malária entre 2010–2017 em regiões endêmicas. (A) Número de casos estimados no mundo entre 2010 – 2017. (B) Tendências na taxa de incidência por malária (casos por 1.000 habitantes em risco) (adaptado OMS, 2018).

O número de mortes devido a malária apresentou um decréscimo em 2017 comparado aos anos anteriores, com uma estimativa de 435.000 mortes no mundo neste ano. A África foi responsável por 93% de todas as mortes em 2017 e quase todos os casos de malária nesta região é devido a infecção por *P. falciparum*. As crianças abaixo de 5 anos continuam sendo o grupo de maior vulnerabilidade, e em 2017 representaram 61% das mortes (OMS, 2018).

A malária é endêmica em 17 países do Continente Americano, incluindo o Brasil, em que se estimou que ocorreram 976.000 casos de malária e 630 mortes em 2017 nesta região. Sendo que o *P. vivax* é a principal espécie envolvida nos casos de malária (responsável por 74% dos casos de malária) neste continente. Embora todas as regiões endêmicas de malária tenham registado um declínio (mesmo que sutil) na taxa de incidência e mortalidade, as Américas foram exceção, tornando o quadro epidemiológico desta doença ainda mais preocupante nesta região. (OMS, 2018).

O Brasil integra os trinta países em que há maior número de casos de malária no mundo, e a região da Amazônia Legal Brasileira (divisão política do território nacional que engloba nove estados: Amazônia, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e

Tocantins) apresenta o maior número de casos da doença no país (Fig. 3). Segundo o Ministério da Saúde, entre 2000 e 2011, aproximadamente 99,7% dos casos de malária no Brasil foram notificados nesta região (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; Brasil, 2013).



**Figura 3.** Distribuição epidemiológica da malária na América no Brasil (Brasil, 2010).

Estimou-se em 196.000 – 236.000 casos de malária no Brasil somente em 2017. No período entre 2010 e 2014 houve uma redução da incidência de malária no Brasil. Porém, no período de 2015 a 2017 observou-se um aumento do número de casos da doença (OMS, 2018). Este aumento pode ser explicado pela ocupação desordenada das periferias das grandes cidades, principalmente da Região Amazônica; desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura e assentamentos; atividades não autorizadas pelos órgãos competentes; e, ainda, aumento dos criadouros do mosquito, vetor da malária, em função da atividade de piscicultura desordenada, com a construção de tanques artificiais (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; Brasil, 2013).

No Brasil, as principais espécies causadoras da malária são *P. vivax* e *P. falciparum*. No entanto, as infecções por *P. vivax* predominam, sendo a espécie responsável por 169.834 dos casos registrados em 2017, e 18.610 casos foram ocasionados pelo *P. falciparum* (OMS, 2018).

Com relação aos agentes transmissores, as principais espécies de *Anopheles* são: *An. darlingi*, principal espécie, ocorrendo em todo o interior do país; seguido por *An. albicans* e

*An. aquasalis*, que ocorre de São Paulo até o Pará, na região costeira. O *Anopheles darlingi* é a espécie transmissora de malária mais importante no Brasil, sendo o mais frequente no domicílio devido a sua acentuada antropofilia, domesticidade e suscetibilidade ao plasmódio. Tem como criadouro grandes coleções de águas límpidas e ensolaradas ou parcialmente sombreadas. O *An. darlingi* é favorecido pelo desmatamento e formação de garimpo (OMS, 2017).

Desde 1993, por recomendação da Conferência Ministerial de Amsterdã (outubro, 1992), o Brasil utiliza a Estratégia Global de Controle Integrado da Malária – “*uma ação conjunta e permanente do governo e da sociedade, dirigida para a eliminação ou redução do risco de adoecer ou morrer de malária*”. Essa estratégia objetiva diminuir a morbimortalidade e reduzir as perdas sociais e econômicas provocadas pela malária, mediante o fortalecimento dos níveis regionais e locais de atenção à saúde. Esses objetivos deverão ser alcançados pelo diagnóstico precoce e preciso e tratamento imediato e eficaz dos casos (Brasil, 2005).

#### 1.1.2 Características clínicas da doença e patogênese

Uma fase assintomática ocorre relativa ao período de incubação do parasito, sendo variável entre as espécies. Para as infecções por *P. falciparum* esta fase dura em torno de 8-25 dias, para *P. vivax* de 8-27 dias, para *P. ovale* 9-17 dias e para *P. malariae* de 15-30 dias (Tuteja, 2007). Logo após esta fase, um período sintomático inicial que precede a febre clássica se apresenta com cefaleia, mal-estar, fadiga, mialgia e desconforto abdominal. Náuseas, vômito e hipotensão ortostática também podem ocorrer com frequência (White *et al.*, 2014).

Se tratados com medicamentos adequados, nesta fase, os sintomas podem desaparecer em alguns dias. No caso de infecções pelo *P. falciparum*, o tratamento completo é suficiente para erradicar a infecção, sendo assim, o reaparecimento de qualquer sintoma reflete a resistência aos medicamentos utilizados ou nova infecção. Nos casos que envolve infecção por *P. vivax* ou *P. ovale*, a reincidência dos sintomas podem ocorrer como resultado da reativação das formas latentes (hipnozoítos), a menos que o tratamento seja prolongado utilizando um medicamento da classe 8-aminoquinolona (Primaquina, por exemplo) (Cowman *et al.*, 2016).

A fase aguda caracteriza-se pelas febres intermitentes, que podem ocorrer a cada dois (malária terçã) ou três dias (malária quartã), dependendo da espécie, também chamado de paroxismo. O ataque paroxístico agudo (acesso malárico), coincidente com a ruptura das hemácias após a esquizogonia, é caracterizado por uma fase fria (sensação de frio, tremores),



uma fase quente (febre, dores de cabeça, vômitos, convulsões em crianças pequenas) e finalmente uma fase de transpiração (suor, normalização da temperatura e cansaço). O acesso malárico pode variar de 6 a 12 horas (Brasil, 2008). Entretanto, em virtude da quimioprofilaxia da malária realizada ainda na fase de assincronismo das esquizogonias sanguíneas, pode haver apenas o aparecimento de febres irregulares (Neves *et al.*, 2011; Rey, 2011).

De forma geral, o quadro clínico da malária pode ser classificado em: malária não complicada, malária grave e complicada e malária de recaídas (Gomes *et al.*, 2011; Osorio-De-Castro *et al.*, 2011). Indivíduos que apresentam imunodeficiência, crianças, gestantes e os primoinfectados estão sujeitos a apresentar manifestações mais graves da doença, principalmente em infecções pelo *P. falciparum*, podendo ser fatal.

A fase aguda da malária não complicada apresenta sinais e sintomas semelhantes nas infecções pelas 5 espécies, e a manifestação clínica mais comum são os acessos maláricos acompanhados de intensa debilidade física, náuseas e vômitos (Neves *et al.*, 2011; Rey, 2011).

Outros sinais e sintomas que podem aparecer são palidez, inchaço do baço, anemia, que pode se apresentar em graus variáveis, sendo mais intensa nas infecções por *P. falciparum*. A síndrome nefrótica, que pode ocorrer em infecções não tratadas pelo *P. malariae*, com a presença de proteinúria acentuada, hipoalbuminemia e edema (Neves *et al.*, 2011; Rey, 2011).

Em áreas endêmicas, devido à alta taxa de exposição à transmissão da doença, quadros prolongados de infecção podem produzir manifestações crônicas da malária, como a síndrome de esplenomegalia tropical, que é caracterizada por uma esplenomegalia intensa, hepatomegalia, anemia, leucopenia e plaquetopenia (Neves *et al.*, 2011; Rey, 2011).

As manifestações como hipoglicemia, convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia e distúrbio da consciência são indicadores de pior prognóstico e podem preceder as formas clínicas da malária grave e complicada (Gomes *et al.*, 2011).

A forma mais grave da malária ocorre quando há falência de órgãos ou anomalias graves no sangue ou no metabolismo do paciente. Este quadro clínico é causado principalmente devido ao extenso sequestro de eritrócitos parasitados e consequente disfunção de órgãos vitais. O *P. falciparum* é a principal espécie envolvida nestes casos, pois após a invasão das hemácias, ele é capaz de remodelar a superfície da célula hospedeira formando estruturas protuberantes denominadas de *Knobs*. Essas protuberâncias expulsam proteínas que medeiam a citoaderência, responsável pela sequestração dos eritrócitos (White *et al.*, 2014).

As formas clínicas da malária complicada são: malária cerebral, insuficiência renal aguda, edema pulmonar, hipoglicemia, icterícia e hemoglobinúria. O tipo de manifestação clínica apresentada está relacionado com a idade. A anemia e hipoglicemia graves são mais

comuns em crianças, enquanto o edema, lesão renal aguda e icterícia são mais comuns em adultos; coma (malária cerebral) e acidose ocorrem em todas as faixas etárias (White *et al.*, 2014).

Na Malária cerebral, os principais sinais e sintomas são: forte cefaleia, hipertermia, vômitos e sonolência e, em crianças, podem ocorrer convulsões. O paciente evolui para um quadro de coma, com pupilas contraídas e alteração dos reflexos profundos (Gomes *et al.*, 2011).

A Insuficiência renal aguda caracteriza-se pela redução do volume urinário e aumento da ureia e da creatinina plasmáticas, ocorrendo principalmente em adultos. Existem evidências que mostram que esta é a complicação mais comum em regiões onde a transmissão da doença é instável, como o Brasil (Gomes *et al.*, 2011; White *et al.*, 2014).

O Edema pulmonar agudo é particularmente comum em gestantes e inicia-se com hiperventilação e febre alta. As formas mais graves caracterizam-se por intensa transudação alveolar, com grave redução da pressão arterial de oxigênio (síndrome da angústia respiratória do adulto) (Gomes *et al.*, 2011; White *et al.*, 2014).

A Icterícia é resultante da hemólise excessiva ou de comprometimento da função hepática. É definida como coloração amarelada da pele e mucosa, causada pelo aumento da bilirrubina sérica (Gomes *et al.*, 2011; White *et al.*, 2014).

A Hemoglobinúria ocorre em virtude da hemólise intravascular aguda maciça, acompanhada por hiper-hemoglobinemia e hemoglobinúria, ocorre em alguns casos de malária aguda e também em indivíduos que tiveram repetidas formas de malária grave por *P. falciparum*. O paciente apresenta colúria acentuada, vômitos biliosos e icterícia intensa. Necrose tubular aguda com insuficiência renal é a complicação mais frequente e que pode levar a morte (Gomes *et al.*, 2011; White *et al.*, 2014).

Em infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, após o tratamento e recuperação do primeiro episódio da doença, podem ocorrer “ataques” adicionais (“recaídas”), mesmo depois de meses ou até anos sem sintomas. Este fenômeno ocorre apenas com estas espécies, pois apresentam as formas de vida latentes, os hipnozoítos, que se alojam no fígado e podem ficar inativos por longos períodos. No entanto, ao serem reativados produzem a sintomatologia da doença (Neves *et al.*, 2011; Rey, 2011).

### 1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da malária é realizado através da combinação de observações clínicas, histórico de casos e testes diagnósticos. Achados laboratoriais são comuns na doença, tais como anemia leve, diminuição sutil do número de plaquetas (trombocitopenia), elevação da bilirrubina, e aumento das transaminases. Vale ressaltar que estes achados não são suficientes para fechar o diagnóstico da doença, constituindo apenas indícios, tornando indispensável testes específicos (Tuteja, 2007; Rey, 2011).

O método de diagnóstico da malária considerado padrão-ouro ainda é o exame parasitológico de sangue, em que as formas eritrocíticas do parasito são visualizadas pela microscopia através de gota espessa ou esfregaços sanguíneos. No exame da gota espessa é possível identificar a espécie de *Plasmodium* e do estágio de evolução do parasito circulante. Pode-se ainda calcular a densidade da parasitemia (Brasil, 2010).

Entretanto, o diagnóstico rápido baseado na detecção de antígenos dos parasitos por anticorpos específicos é amplamente usado na atualidade por serem fáceis de realizar e não requerem pessoal treinado ou equipamento especial. Entretanto, as desvantagens destes testes são: (i) são relativamente caros; (ii) não distinguem infecções causadas por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*; (iii) não determinam a parasitemia; (iv) não detectam infecções mistas que incluem o *P. falciparum* (Tuteja, 2007; White *et al.*, 2014).

Os testes de diagnóstico rápido baseados em PfHRP2 são tão bons quanto a microscopia para diagnóstico da malária por *P. falciparum*. Os testes de nova geração baseados na detecção de lactato desidrogenase de *Plasmodium* são eficazes para o diagnóstico de infecções por *P. falciparum* e *P. vivax*, embora a sensibilidade seja baixa quando a parasitemia não é tão expressiva em infecções por *P. vivax*. Os testes baseados em aldolase são menos sensíveis, especialmente para outras espécies que não o *P. falciparum* (White *et al.*, 2014).

## **1.2 A luta contra a malária**

A primeira medida de intervenção para o controle da malária se baseou na erradicação dos mosquitos do gênero *Anopheles*, em uma ação voltada para a interrupção da transmissão da doença, principalmente focada no monitoramento ambiental de criadouros do inseto, na utilização de proteções em portas e janelas e na aplicação de inseticidas, como diclorodifeniltricloroetano (DDT). Estas intervenções foram responsáveis pela eliminação da transmissão da malária em mais de 10 países entre 1900 e 1946 (Hay *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2011).

Em 1955 a OMS criou um programa para a erradicação da malária no mundo, denominado “*Global Malaria Eradication Programme*” (Programa Global de Erradicação da Malária), que tinha duas vertentes: 1) utilização do DDT para interromper a transmissão da malária, chamada de “fase de ataque”; 2) quimioprofilaxia com o emprego da cloroquina para a prevenção de novos casos, denominada de “fase de consolidação” (Nájera et al., 2011).

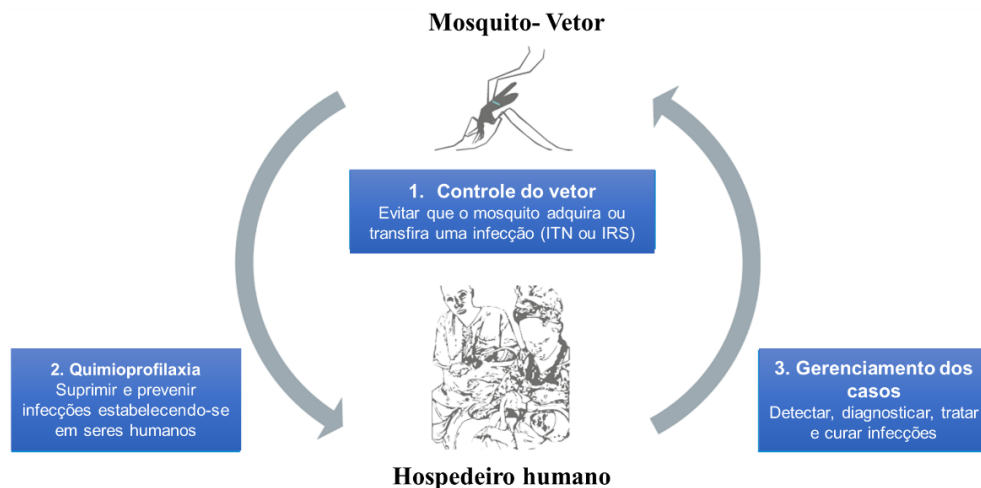
Esta estratégia fez com que mais 27 países (principalmente na Europa) declarassem a erradicação da malária. No entanto, apesar do sucesso em áreas de baixa transmissão, o grande problema deste programa foi adotar a mesma estratégia para todas as regiões onde haviam casos da doença, sem levar em consideração as peculiaridades geográficas, econômicas, políticas e até mesmo culturais (Hay et al., 2004; Guerra et al., 2006).

No entanto, a resistência generalizada aos inseticidas disponíveis, a existência de guerras e imigração da população, a dificuldade para manter o programa de erradicação em países emergentes devido ao baixo investimento financeiro, e por fim, a falta de participação da população limitaram a erradicação da malária e, em 1969, o programa de erradicação da malária foi oficialmente encerrado pela OMS (Nájera et al., 2011; Petersen et al., 2011).

O que se observou nos anos seguintes foi a retomada da doença a níveis alarmantes e favoreceu o surgimento de cepas resistentes a cloroquina e, que, pelos mesmos motivos da limitação da erradicação, estas cepas resistentes foram disseminadas entre os países que não conseguiram eliminar a doença (Nájera et al., 2011; Petersen et al., 2011).

Atualmente, existem várias iniciativas internacionais que têm como objetivo o combate à malária, das quais se destacam *Roll Back Malaria (RBM) Partnership*, *Multilateral Initiative in Malaria (MIM)*, a *Medicines for Malaria Venture (MVM)*, *PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI)*, que suportam a implementação de programas de prevenção e tratamento, para tentar erradicar esta doença.

As principais estratégias para a prevenção e controle da malária são (Fig. 4): (i) controle vetorial (o que reduz a transmissão de parasitos dos humanos aos mosquitos e depois de volta aos humanos), para isso as medidas comuns são o uso de mosquiteiros tratados com inseticida (ITNs) ou pulverização residual (IRS); (ii) profilaxia em subgrupos específicos (mulheres grávidas e crianças em áreas de alto-risco de contaminação), utilizando drogas que impedem o desenvolvimentos dos estágios sanguíneos; (iii) gerenciamento de casos, que inclui adoção de medidas eficazes para o diagnóstico e tratamento de infecções (OMS, 2015).



**Figura 4.** Principais estratégias para a prevenção e controle da malária (adaptado OMS, 2015).

Entre 2000 e 2015, as taxas de incidência e de mortalidade da malária diminuíram 37% e 60% no mundo, respectivamente. A OMS atribui grande parte desta redução da morbidade e mortalidade associadas à malária a três intervenções adotadas: mosquiteiros tratados com inseticida (69% da redução), terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs; 21%) e resíduos internos pulverização de inseticidas (10%) (OMS, 2018).

Em 2018 ocorreu a “71st World Health Assembly”, e uma nova abordagem para impulsionar o progresso da luta contra a malária foi anunciada. Esta iniciativa recebeu o nome de “*High burden to high impact*” (“Grande responsabilidade para um grande impacto”), será apoiada pela OMS e pela Parceria com *Roll Back Malaria*. Esta estratégia baseia-se em quatro pilares: dirigir a vontade política nacional e internacional para reduzir o número de mortes relacionada à malária; impulsionar o impacto através do uso estratégico da informação; implantar estratégias, políticas e diretrizes internacionais mais eficazes e apropriadas para os países com malária endêmica; e implementar uma resposta nacional coordenada (OMS, 2018).

### 1.2.1 Tratamento farmacológico da malária e a resistência aos antimaláricos

A farmacoterapia da malária é realizada com quimioterápicos e tem como objetivo principal interromper a esquizogonia sanguínea, responsável pelas manifestações clínicas da doença; eliminar as formas latentes do parasito (hipnozoítos), afim de evitar as recaídas tardias; e impedir o desenvolvimento dos gametócitos para prevenir a transmissão. Por isso, para atingir todos estes objetivos, o tratamento desta doença implica na utilização de mais de um medicamento na maioria das vezes (Bannister e Mitchell, 2003; França et al., 2008).

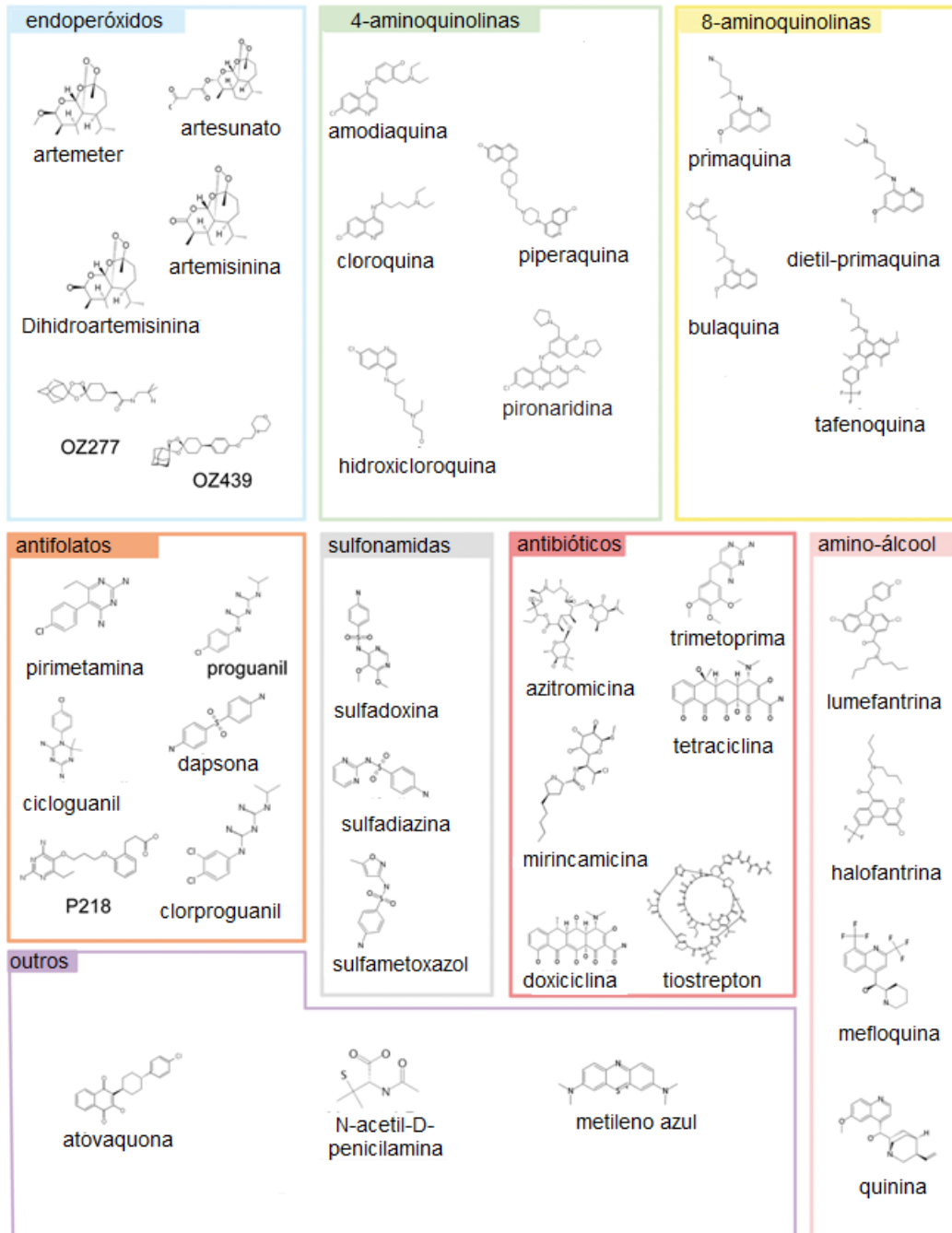
A terapêutica oral impede a progressão para um estado mais grave da doença e para as complicações resultantes. Quando os medicamentos são utilizados com eficiência, reduz-se a morbidade e mortalidade global relacionada à malária. Entretanto, a maioria das pessoas nas áreas com alta prevalência de malária tem dificuldades de acesso ao diagnóstico e ao tratamento (Guerin et al., 2002).

Os fármacos que estão atualmente aprovados para o tratamento da malária em seres humanos ou em desenvolvimento clínico podem ser classificados em 8 grandes grupos (Fig. 5), para a maioria dos quais, infelizmente, já existe o aparecimento progressivo de resistência (Delves et al., 2012).

Atualmente, o esquema terapêutico recomendado pela OMS para o tratamento da malária depende da espécie envolvida na infecção e o grau de severidade da doença. De forma geral, para infecções por *P. vivax* recomenda-se a utilização de cloroquina em regiões onde não há relatos de cepas resistentes ou Artemisinina em terapêutica de combinação (ACT) em regiões que apresentam parasitos resistentes; para evitar o quadro de malária de recaída, recomenda-se a adição da Primaquina ao esquema terapêutico. Para as infecções causada por *P. falciparum*, o tratamento deve ser feito com ACT. Por fim, para os casos de malária severa, recomenda-se o tratamento com artesunato injetável (intramuscular ou intravenoso) por pelo menos 24 h, seguido pela utilização de ACT quando a terapia oral é tolerada pelo paciente (OMS, 2018).

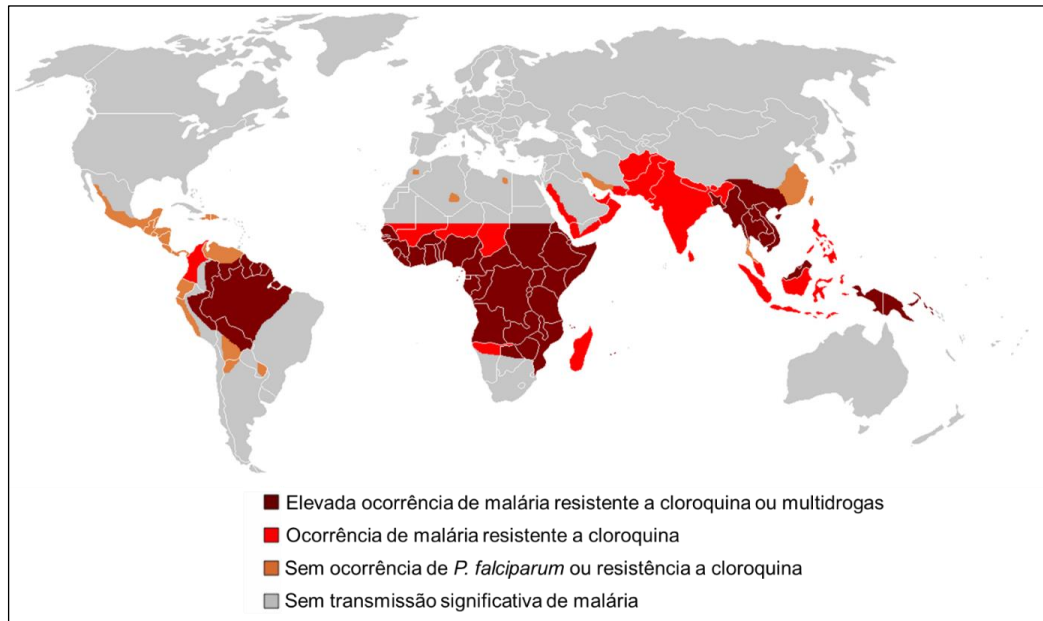
No Brasil, o Ministério da Saúde segue as recomendações da OMS, e o esquema terapêutico adotado para infecções pelo *P. vivax* ou *P. ovale* é a associação de Cloroquina e Primaquina, e a prevenção de recaídas utiliza-se a cloroquina. Para infecções não complicadas por *P. falciparum*, recomenda-se o uso de Artemeter e Lumefantrina (combinação fixa) ou mefloquina e artesunato (combinação fixa) associados a Primaquina. Para os quadros de malária grave e complicada por ambas espécies, recomenda-se a utilização de Artesunato ou Artemeter ou Quinina associados a Clindamicina (Brasil, 2010).

A utilização inapropriada das drogas por dose inadequada, propriedades farmacocinéticas ineficientes, medicamentos falsos, ou infecções adquiridas durante a fase de eliminação da droga resultam em uma exposição dos parasitos a concentrações subterapêuticas, o que aumenta a probabilidade do surgimento de cepas resistentes. Em áreas endêmicas, as infecções adquiridas após o tratamento de um episódio primário de malária são comuns e, acabam promovendo exposições repetidas do parasito aos quimioterápicos, favorecendo a seleção de cepas resistentes (Bloland et al., 2001; Müller, 2011).



**Figura 5.** As principais classes de fármacos antimaláricos. As estruturas químicas de todas as principais classes de antimaláricos estão divididas de acordo com as classes químicas ao qual pertencem (endoperóxidos, 4- e 8-AQs, amino-álcoois) ou de acordo com a função (antifolato, antibióticos), ou ainda ambos (por exemplo, sulfonamidas, uma classe química de antibiótico usada em terapias antimaláricas combinadas) (adaptado de Delves et al., 2012).

A resistência do *P. falciparum* à cloroquina, uma 4-aminoquinolina, foi reportada pela primeira no fim dos anos 50. Hoje, a resistência à cloroquina ocorre em quase toda parte onde há transmissão ativa da malária (Fig. 6), dificultando o controle da doença (Wongsrichanalai et al., 2002).



**Figura 6.** Distribuição epidemiológica da resistência de *Plasmodium falciparum* aos fármacos antimaláricos (Fonte: *Center for Disease Control and Prevention*, 2010).

Após o surgimento das cepas resistentes a cloroquina, a alternativa terapêutica adotada para o tratamento da malária foi a sulfadoxina-pirimetamina, no entanto, rapidamente surgiram parasitos resistentes a estes fármacos. Desde então, várias outras alternativas de drogas antimaláricas têm sido utilizadas no tratamento desta doença, incluindo mefloquina, amodiaquina, atovaquona, artemisinina e derivados. E para piorar a situação, a resistência geralmente se desenvolvia de 10 a 15 anos após a introdução de um antimalárico, atualmente ocorre em menos de 1 ano (tabela 1) (Fidock et al., 2000; Wongsrichanalai et al., 2002; Wongsrichanalai et al., 2004; Sibley e Price, 2012).

**Tabela 1.** Datas da introdução e do primeiro relato da resistência às drogas antimaláricas

Droga antimalárica	Introdução	Primeiro relato de resistência	Diferença (anos)
Quinina	1632	1910	278
Cloroquina	1945	1957	12
Proguanil	1948	1949	1
Sulfadoxina- pirimetamina	1967	1967	0
Mefloquina	1977	1982	5
Atovaquona	1996	1996	0
Artemisinina	2001 <sup>#</sup>	2008 <sup>*</sup>	7

Fonte: adaptado de Wongsrichanalai et al., 2002; <sup>#</sup> Aprovação dos primeiros compostos ACT (Wells et al., 2015); <sup>\*</sup>(Noedl et al., 2008).

Devido a todos estes fatores que dificultam o combate à malária, principalmente o crescente número de cepas resistentes à farmacoterapia disponível, existe uma necessidade



implacável de identificar novos antimaláricos, mas também de caracterizar o efeito de compostos conhecidos por terem um efeito no ciclo de vida do parasito. Algumas estratégias para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas estão sendo exploradas atualmente: (i) modificação de moléculas antimaláricas já conhecidas, afim de aumentar a atividade antimalárica, ou melhorar a biodisponibilidade (como é o caso dos derivados da artemisinina) ou, ainda, reduzir a toxicidade (derivados da amodiaquina); (ii) síntese de inibidores específicos de potenciais alvos terapêuticos identificados pelo progresso do conhecimento sobre a biologia do parasito; (iii) identificação de novas moléculas com atividade antimalárica através de *screening* de moléculas naturais ou por triagem orientada (por moléculas já conhecida por sua atividade em outros organismos) (Bannister e Mitchell, 2003; França et al., 2008; Biamonte et al., 2013).

As plantas continuam sendo fontes importantes no descobrimento de moléculas e composto para o desenvolvimento de fármacos. Inclusive, os principais medicamentos para o tratamento da malária são provenientes de plantas. Pode-se citar a quinina, uma aminoquinolina alcalóide isolada a partir da casca de espécies de *Cinchona*, que foi um dos primeiros compostos utilizado como tratamento farmacológico da malária, além de ter sido usada no desenvolvimento de drogas sintéticas como a cloroquina (1940) e a primaquina (1952) (Batista et al., 2009).

Após surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes a drogas, particularmente à cloroquina, ainda se tem investido em pesquisas de plantas medicinais com atividade antimalárica. Estes estudos levaram a descoberta da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica com um grupo peróxido, isolada da erva chinesa de uso tradicional *Artemisia annua*, e de seus derivados semi-sintéticos, artemeter e artesunato (Jambou et al., 2005).

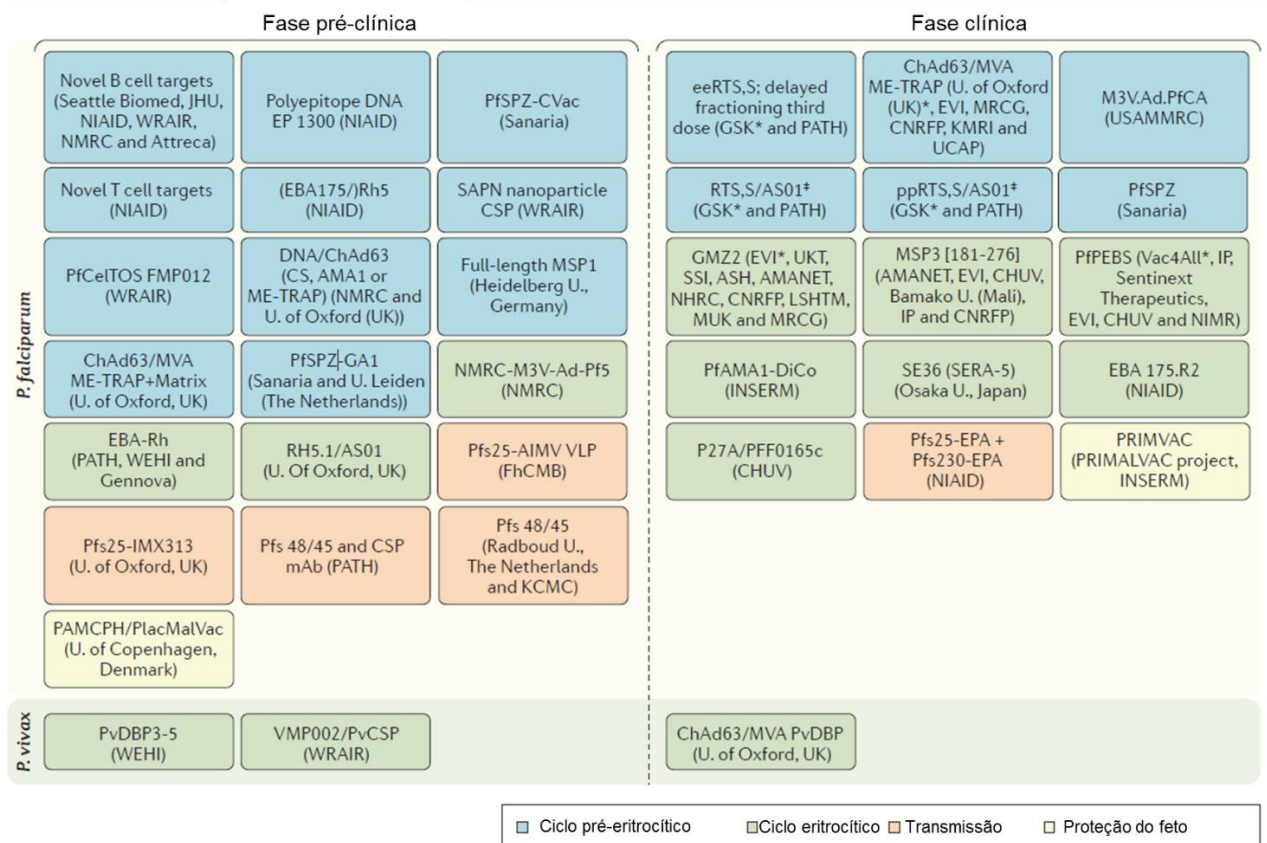
Este cenário estimula a busca por novas drogas antimaláricas. Há um consenso da comunidade científica de que os produtos naturais têm desempenhado um papel dominante na descoberta de moléculas com atividade quimioterapêutica para o tratamento de doenças humanas. Na verdade, como citado anteriormente, a grande maioria dos agentes quimioterápicos antimaláricos existentes é baseada em produtos naturais. Desta forma, a biodiversidade de moléculas vegetais continua sendo uma fonte importante de modelos moleculares na busca de fármacos para o tratamento da malária. Ademais, um melhor entendimento da biologia do *Plasmodium* em nível molecular é um pré-requisito ao desenvolvimento fortemente esperado de estratégias terapêuticas alternativas (Birkholtz et al., 2008).

### 1.2.2 Vacinas contra à malária

A vacina seria a solução ideal para combater a malária. No entanto, até o momento não há vacina eficaz contra o *Plasmodium*. A complexidade do *Plasmodium* é o maior desafio para o desenho de vacinas. De fato, durante quase todo o seu ciclo de vida, o parasito é intracelular, evitando assim a exposição ao sistema imunológico. E as formas livres, esporozoítos e merozoítos, ficam na corrente sanguínea por apenas alguns minutos. Além disso, há um importante polimorfismo para antígenos e os que são conservados podem ser pouco imunogênicos (Cowman et al., 2016)

A existência de pessoas que adquirem naturalmente imunidade parcial contra a malária em áreas onde há alta incidência de malária, bem como teste em mamíferos de vacinas anti-esporozoídica mostraram sinais de proteção, mesmo que parcial revelam a possibilidade de obtenção de uma vacina contra a doença (Kester et al., 2001).

Os estudos atuais para o desenvolvimento dessas vacinas focam em três estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*: (i) vacinas com atuação nas formas pré-eritrocíticas ou vacinas bloqueadoras da infecção (esporozoítos e/ ou formas teciduais hepáticas são os alvos); (ii) para as formas assexuadas eritrocíticas ou modificadoras da doença (merozoítos são os principais alvos); e para as formas sexuadas ou bloqueadoras da transmissão (gametócitos são o alvo). Atualmente, algumas vacinas candidatas estão em fase de desenvolvimento (Fig. 7) (Cowman et al., 2016).

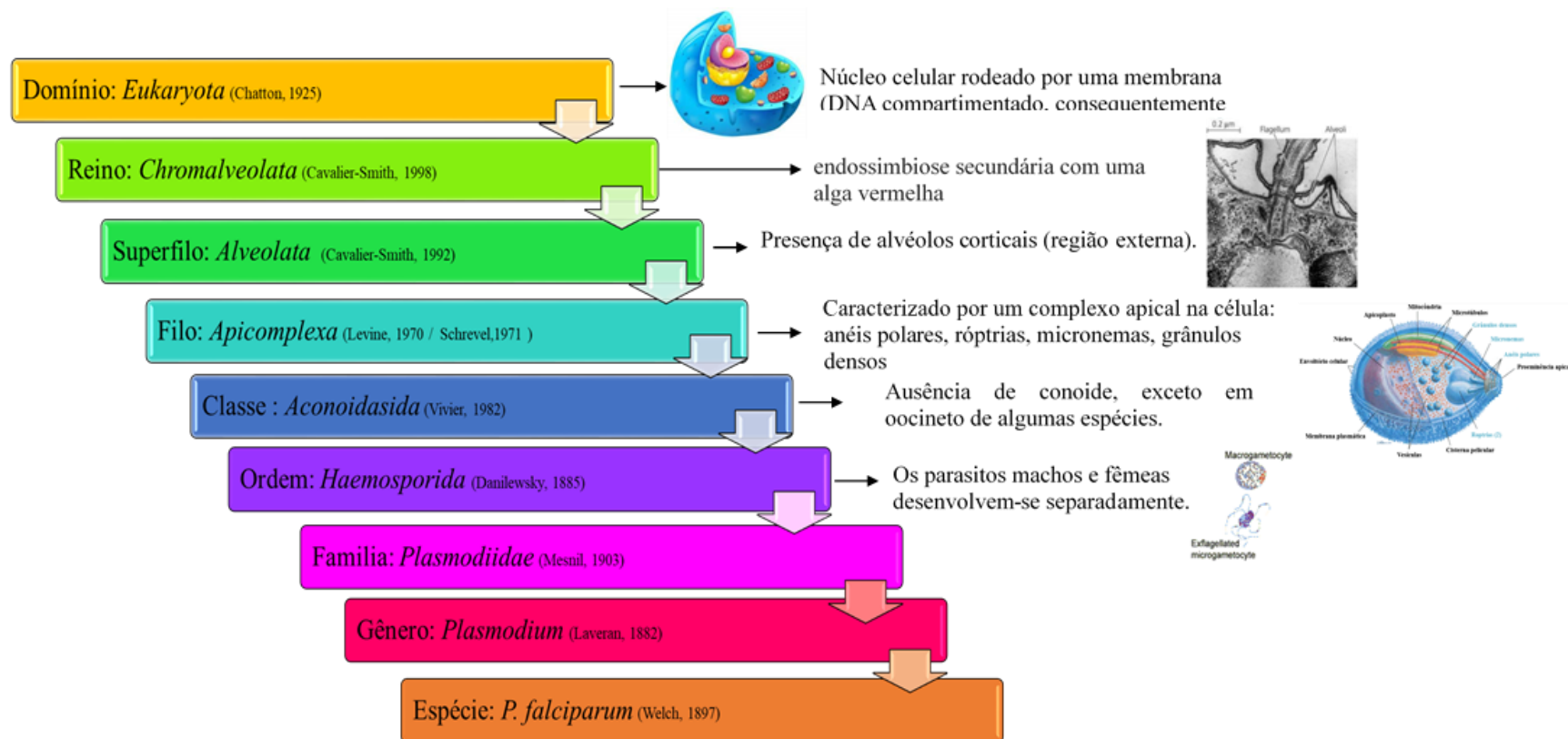


**Figura 7.** Fluxograma geral das vacinas contra malária. Estão listados os principais candidatos a vacina contra malária, mostrando a espécie e a fase do ciclo ao qual são direcionados bem como a fase de desenvolvimento (fase pré-clínica ou clínica) e a instituição responsável pela pesquisa. AMANET: African Malaria Network Trust; ASH: Albert Schweitzer Hospital (Gabão); CHUV: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (Suíça); CNRFP: Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (Burquina Faso); FhCMB: Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology (EUA); GSK: GlaxoSmithKline; IP: Institut Pasteur (França); INSERM: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (França); JHU: Johns Hopkins University (EUA); KCMC: Kilimanjaro Christian Medical College (Tanzânia); KMRI: Kenyan Medical Research Institute; LSHTM: London School of Hygiene and Tropical Medicine (Reino Unido); MRCG: Medical Research Council (Gambia); MUK: Makerere University Kampala (Uganda); NHRC: Navrongo Health Research Centre (Gana); NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (USA); NIMR: National Institute for Medical Research (Reino Unido); NMRC: Naval Medical Research Center (EUA); PAMCPH: pregnancy-associated malaria Copenhagen; PATH: Program for Appropriate Technology in Health; SSI: Statens Serum Institut (Dinamarca); UCAP: Université Cheikh Anta Diop (Senegal); UKT: Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen (Alemanha); USAMMRC: US Army Medical Research and Materiel Command; WEHI: Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research (Austrália); WRAIR: Walter Reed Army Institute of Research (EUA). \*Patrocinadores de ensaios clínicos de estágio final. ‡ Até revisão ou aprovação (Phillips et al., 2017).

### **1.3 A Biologia do *Plasmodium falciparum***

#### **1.3.1. Classificação filogenética dos agentes causadores da malária**

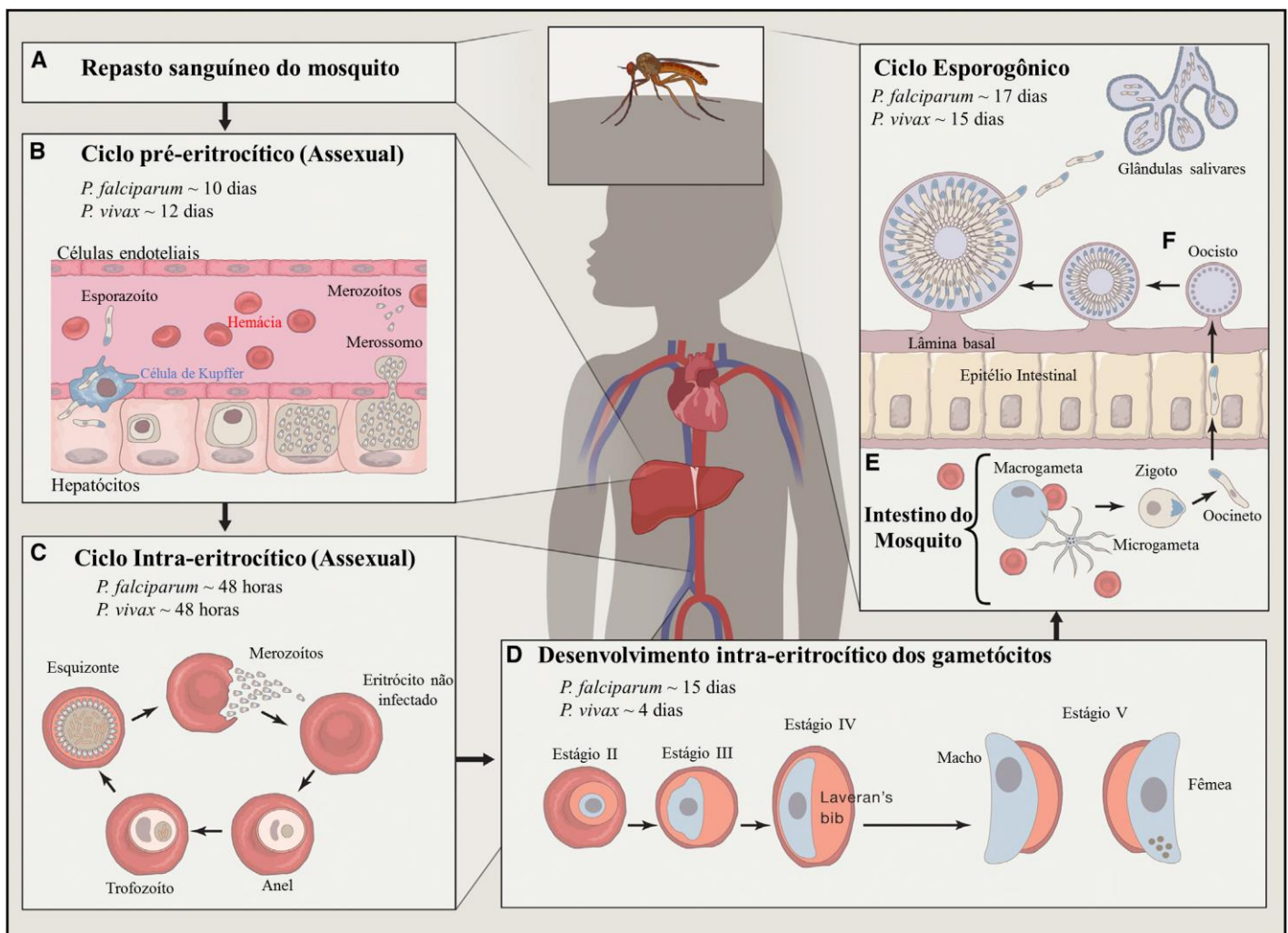
O *Plasmodium* é um protozoário unicelular, pertencente ao filo Apicomplexa (Fig.8), caracterizado por organismos que apresentam uma estrutura específica importante para a invasão, denominado complexo apical. Existem muitas espécies de *Plasmodium* identificadas que são capazes de infectar diferentes hospedeiros (seres humanos, roedores, macacos, pássaros). O *P. falciparum* foi identificado por Welch em 1897 (Mohan, 1955).



**Figura 8.** Classificação filogenética dos agentes etiológicos da malária.

### 1.3.2 Ciclo de vida do *P. falciparum*

O *P. falciparum* é um esporozoário e hematozoário, que possuem um ciclo de vida dixênico, ou seja, necessita de 2 hospedeiros para completar o ciclo: (i) os seres humanos (hospedeiro intermediário), onde ocorre a fase de reprodução assexuada (Fig. 9A-D); (ii) e as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* (hospedeiro definitivo), para a fase de reprodução sexuada (Fig. 9E-F). Durante o desenvolvimento no homem, estes protozoários possuem dois ciclos de reprodução assexuada: o ciclo hepático pré-eritrocítico (Fig. 9B) transitório e o ciclo intra-eritrocítico (Fig. 9C) (Bannister et al., 2000a; Bannister e Mitchell, 2003).



**Figura 9.** Ciclo biológico dos principais agentes causadores da malária: *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (adaptado Cowman et al., 2016).

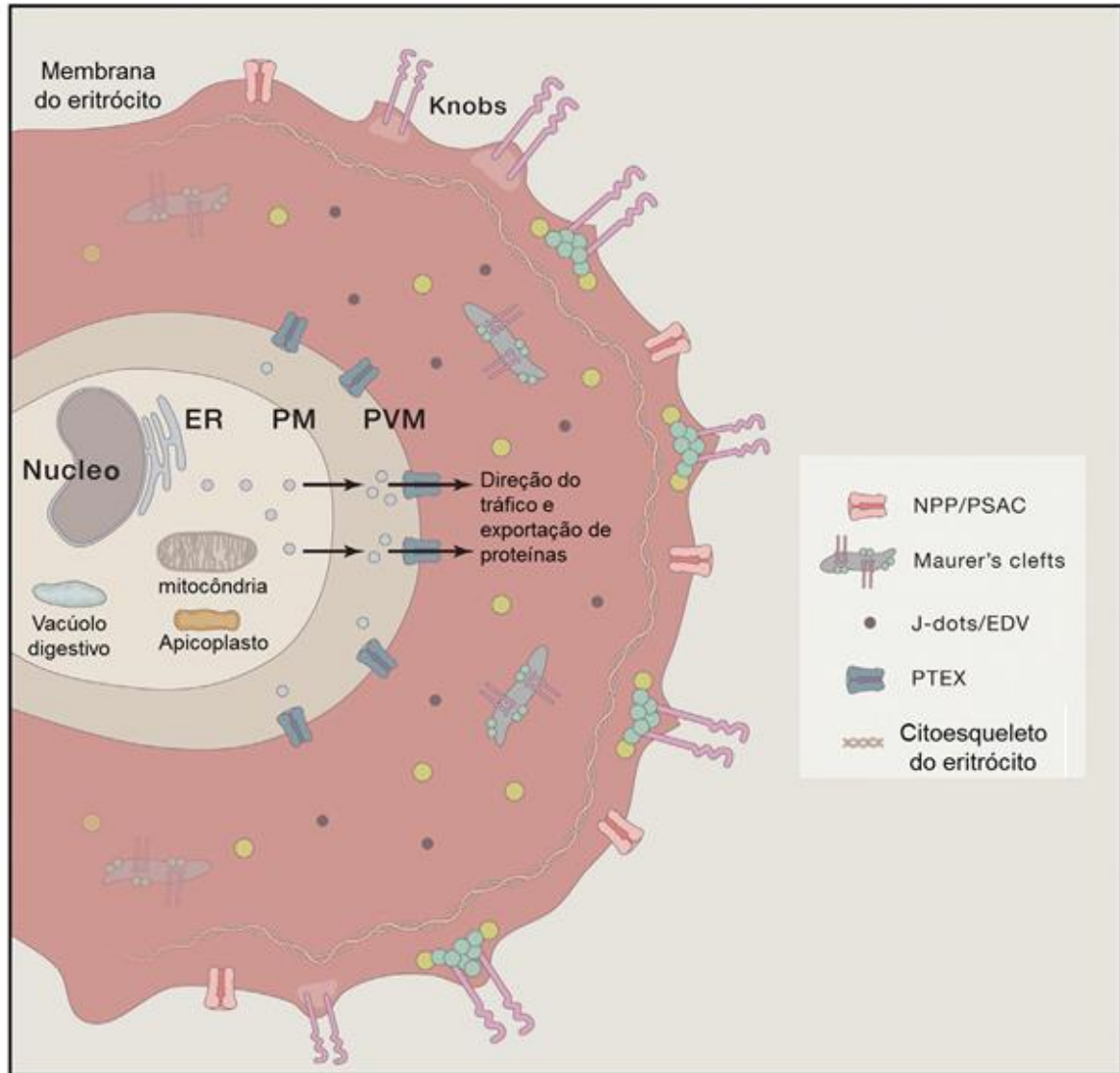
Nos seres humanos, a infecção se inicia através da inoculação de esporozoítos na derme pelo inseto vetor infectado durante o repasto sanguíneo (Fig.9A). O destino certo destes esporozoítos ainda não está bem estabelecido, mas eles podem levar 1 a 3 horas para sair deste

do local da picada. Através da motilidade deslizante, parte dos esporozoítos atingem a corrente sanguínea e são transportados ao fígado, onde saem dos sinusóides através das células de Kupffer ou endotelial e invadem os hepatócitos. A invasão ativa é precedida por travessia celular até que um hepatócito adequado seja encontrado. Uma vez estabelecida a infecção no hepatócito, o esporozoíto se transforma em esquizonte tecidual nos próximos 10 a 12 dias culminando na formação e liberação de até dezenas de milhares de merozoítos em pacotes de merossomos na corrente sanguínea (Fig. 9B) (Biamonte et al., 2013; Cowman et al., 2016).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos em um processo rápido e dinâmico que é concluído em aproximadamente 2 minutos. Após a invasão dos eritrócitos, os merozoítos infectantes se transformam para os estágios de anel (0-20 h) e trofozoíto (20-36 h), sem divisão celular. Em seguida realiza de três a quatro ciclos de mitose se transformando no estágio esquizonte multinuclear (36-48 h). O esquizonte se diferencia durante as últimas horas em 16-32 merozoítos que, após a ruptura do eritrócito, são liberados na circulação sanguínea, para iniciar um novo ciclo intraeritrocítico (Fig. 9C). Este ciclo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas, nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, a cada 72 horas nas infecções pelo *P. malariae* e a cada 24 horas para *P. knowlesi*. (Bannister e Mitchell, 2003; Cowman et al., 2016).

Após a invasão, várias estruturas e compartimentos são formados durante o desenvolvimento e diferenciação do parasito dentro das hemácias. Uma das primeiras estruturas formadas é o vacúolo parasitóforo que é formado no momento da entrada do merozoíto. Posteriormente, o parasito ativa um processo de remodelamento da célula hospedeira afim de escapar do sistema imunológico e se desenvolver (Maier et al., 2009).

Para modificar a morfologia da hemácia, o parasito exporta centenas de proteínas para o citoplasma ou a membrana do eritrócito infectado. Neste sentido, o parasito desenvolve estruturas responsáveis por mover proteínas exportadas para locais subcelulares nas células hospedeiras infectadas, que incluem estruturas como *Plasmodium translocon of exported proteins* (PTEX), *Maurer's clefts*, rede túbulovesicular, *J- dots* e *K- dots* (Fig. 10). Essas estruturas são formadas cerca de 20 horas após a invasão (Mundwiler-Pachlatko e Beck, 2013).



**Figura 10.** Alterações da morfologia dos eritrócitos induzidas pelo *Plasmodium falciparum*. Dentro do eritrócito, o parasito exporta centenas de proteínas para a célula hospedeira, por meio de uma via secretória mediada por vesículas a partir do retículo endoplasmático (ER), a partir da membrana do parasito (PM) para o vacúolo parasitóforo (PV). Na membrana do PV, um complexo de proteínas (PTEX) medeia a exportação para a célula hospedeira. Já o tráfego na célula hospedeira é mediado por estruturas vesiculares derivadas de parasitos, tais como *J-dots* e *Maurer's clefts*. Estas proteínas exportadas induzem alterações na rigidez e permeabilidade dos eritrócitos, e novas vias (NPP / PSAC) são estabelecidas na membrana eritrocítica, permitindo que o parasito capture nutrientes e expulse os resíduos, adaptado de (Cowman et al., 2016).

O ciclo eritrocítico é a etapa do desenvolvimento do parasito mais estudada, pois é o responsável pelas manifestações clínicas mais importantes da malária, bem como é possível reproduzir esta fase *in vitro*. Além disso, foi mostrado por diferentes abordagens que 20% dos transcritos preditos (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2003) e, mais recentemente, que 55% do proteoma predito (Pease et al., 2013) para o *P. falciparum* são específicos do ciclo intraeritrocítico, o que é um estímulo à compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesta fase.



Após várias gerações de merozoítos sanguíneos, uma fração destes merozoítos de reprodução assexuada é reprogramada para sofrer gametocitogênese, ou seja, se diferenciam em microgametócitos (masculino) e macrogametócitos (feminino). Dentro de um período de aproximadamente 15 dias, os gametócitos sequestram e se desenvolvem dentro da medula óssea e, uma vez maduros, entram na circulação periférica. Às vezes, em esfregaços de sangue fino, os remanescentes dos eritrócitos do hospedeiro podem ser visualizados, denominado de Laveran's bib. Os gametócitos vão se diferenciar apenas no mosquito, quando ingeridos durante o repasto sanguíneo (Preiser et al., 2000; Blackman e Bannister, 2001) (Fig 9D).

Estes gametócitos ao atingirem o estômago do mosquito se transformam em gametas extracelulares (macrogametas e microgametas), em um processo denominado de gametogênese, que é estimulado pela diferença de temperatura (inferior a 30°C) e aumento do pH por baixa pressão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O microgametócito (gametócito masculino) dá origem a 8 microgametas por um processo denominado exflagelação. Em 20-30 minutos, um microgameta fecundará um macrogameta, formando o ovo ou zigoto. Após a fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto. Este atravessa a matriz peritrófica e atinge a parede do intestino médio, onde se encista na camada epitelial do órgão, passando a ser chamado oocisto (Fig. 9E). Então, inicia-se a esporogonia (formação de esporozoítos) até que ocorre a ruptura da parede do oocisto, liberando os esporozoítos, que são disseminados pela hemolinfa até atingirem as células das glândulas salivares e serão inoculados juntamente com a saliva em um hospedeiro humano (Fig. 9F), durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo destes protozoários causadores da malária (Phillips et al., 2017).

### 1.3.3 Esquizogonia eritrocítica: a morfogênese dos merozoítos

A morfogênese dos merozoítos de *P. falciparum* é um processo de diferenciação celular complexo, que se inicia no estágio esquizonte, em um evento molecular denominado esquizogonia, com o brotamento polarizado, ao final do qual cada merozoíto herda um único núcleo, uma única mitocôndria, um único apicoplasto e as organelas do complexo apical – róprias, micronemas e grânulos densos – que têm papéis cruciais na invasão. No entanto, ainda no estágio trofozoíto, ocorre à síntese de moléculas importantes para a multiplicação do parasito, incluindo a síntese de DNA (White e Kilbey, 1996; Arnot e Gull, 1998).

O estágio de esquizonte (Fig. 11) é caracterizado por sucessivas divisões celulares. O núcleo divide-se cerca de quatro vezes, e, possivelmente, devem estar alternadas com episódios

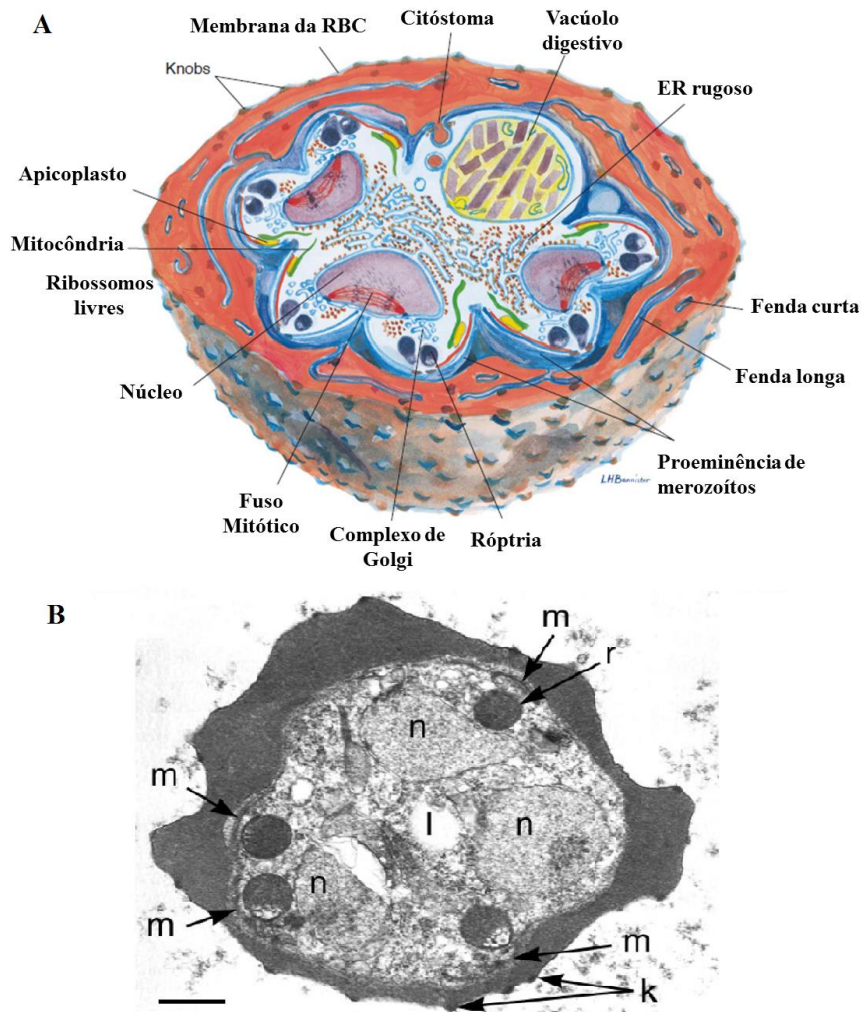
de síntese de DNA, com o objetivo de produzir entre 16 a 32 núcleos, que darão origem ao mesmo número de merozoítos. Esta divisão nuclear é do tipo endomitótica, ou seja, é um processo de duplicação cromossômica que ocorre sem a ruptura da membrana nuclear, tendo como resultado uma única célula com o dobro de cromossomos. Esta é uma característica comum em eucariotos unicelulares, onde há a segregação dos cromossomos e o fuso mitótico permanece dentro do envelope nuclear em todo o processo (Bannister et al., 2000a; b; Bannister e Mitchell, 2003).

A formação dos merozoítos se inicia com o aparecimento de um fuso mitótico em torno do núcleo, um conjunto de cromossomos se move em cada extremidade e os núcleos, em seguida, se comprimem em dois sem romper o envelope nuclear. Ao final deste processo, cada núcleo formado contém meio fuso mitótico com um único brotamento polarizado (um centro de microtúbulos densos) em uma extremidade, ainda, inserido no envelope nuclear. Um novo fuso mitótico é formado ao lado do antigo, e, posteriormente, cada um migra para uma extremidade do núcleo, dando início a formação de novos eixos de brotamentos polarizados, e, assim, outras divisões nucleares (Bannister et al., 2000a; b; Bannister e Mitchell, 2003).

A divisão nuclear é acompanhada por várias mudanças citoplasmáticas que envolvem a formação dos merozoítos, tais como: proliferação do retículo endoplasmático rugoso e dos ribossomos, multiplicação da mitocôndria e dos plastídios e a acumulação de um ou vários vacúolos lipídicos que mais tarde serão chamados de membrana ou proveniência lipídica (Hopkins et al., 1999; Bannister et al., 2000b). A partir desta fase, uma sequência ordenada de eventos ocorre para a formação dos merozoítos, começando pelas organelas apicais. Nos momentos finais da divisão celular, vários centros de formação de merozoítos se apresentam em intervalos regulares ao longo da circunferência do parasito, dando origem a aproximadamente 16 merozoítos, cada um com um conjunto de róprias. Próximo a cada fuso mitótico são formadas vesículas revestidas a partir do envelope nuclear e se fundem com o Complexo de Golgi, constituindo uma única cisterna discoidal. Então, um segundo conjunto de vesículas de revestimento se junta para formar duas róprias ou se transformar, individualmente, em micronemas ou grânulos densos (Phillips et al., 2017).

Os componentes do citoesqueleto são formados na superfície de cada merozoíto, inclusive os anéis polares e os microtúbulos, e um polo de clivagem aparece em volta de cada merozoíto, definindo a sua forma. Antes da individualização completa, um núcleo, uma mitocôndria e um plastídeo movem-se da área central do citoplasma do esquizonte para cada merozoíto. Um anel de constrição, em seguida, separa cada merozoíto do corpo residual do esquizonte que contém o pigmento do vacúolo digestivo. Por fim, os merozoítos são liberados

após o rompimento das membranas do vacúolo parasitóforo e do eritrócito, desencadeada pela liberação dos conteúdos das organelas apicais destas formas (Bannister e Mitchell, 2003).



**Figura 11.** Morfologia do estágio esquizonte de *Plasmodium falciparum*. **A.** Esquema mostrando a organização do estágio esquizonte de *P. falciparum* perto do fim desta fase, dentro de uma hemácia cortada transversalmente para mostrar o parasito e a estrutura do eritrócito, incluindo *Maurer's clefts* (aqui designado como fendas longas e curtas) e *knobs* de superfície. Os merozoítos estão brotando da superfície do esquizonte, e no ápice de cada merozoíto as organelas apicais estão se desenvolvendo, e as mitocôndrias (verde) e plastídios (amarelo) estão migrando para os seus brotos. **B.** Uma imagem de microscopia eletrônica da morfogênese dos merozoítos de *P. falciparum*, mostrando o estágio esquizonte com uma série de núcleos (n) e o desenvolvimento de merozoítos arredondados (m) contendo róptrias precoces (r) em torno de seu perímetro. Um vacúolo lipídico está centralmente presente (l). Observe a aparência irregular da superfície dos eritrócitos e a presença de *knobs* (k). Barras de escala = 0,5  $\mu\text{m}$ . ER, retículo endoplasmático (adaptado BANNISTER et al., 2000a).

O merozoíto é a forma invasiva e apresenta uma forma ovoide, com uma proeminência (proeminência apical) em uma das extremidades. Estas formas medem cerca de 1,6  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,0  $\mu\text{m}$  de largura no *P. falciparum*, aproximadamente o tamanho de uma bactéria. Neste estágio do parasito, sua superfície apresenta uma camada espessa eriçada, sendo cada cerca um amontoado de filamentos finos (2-3 nm) ancorado em suas bases na membrana

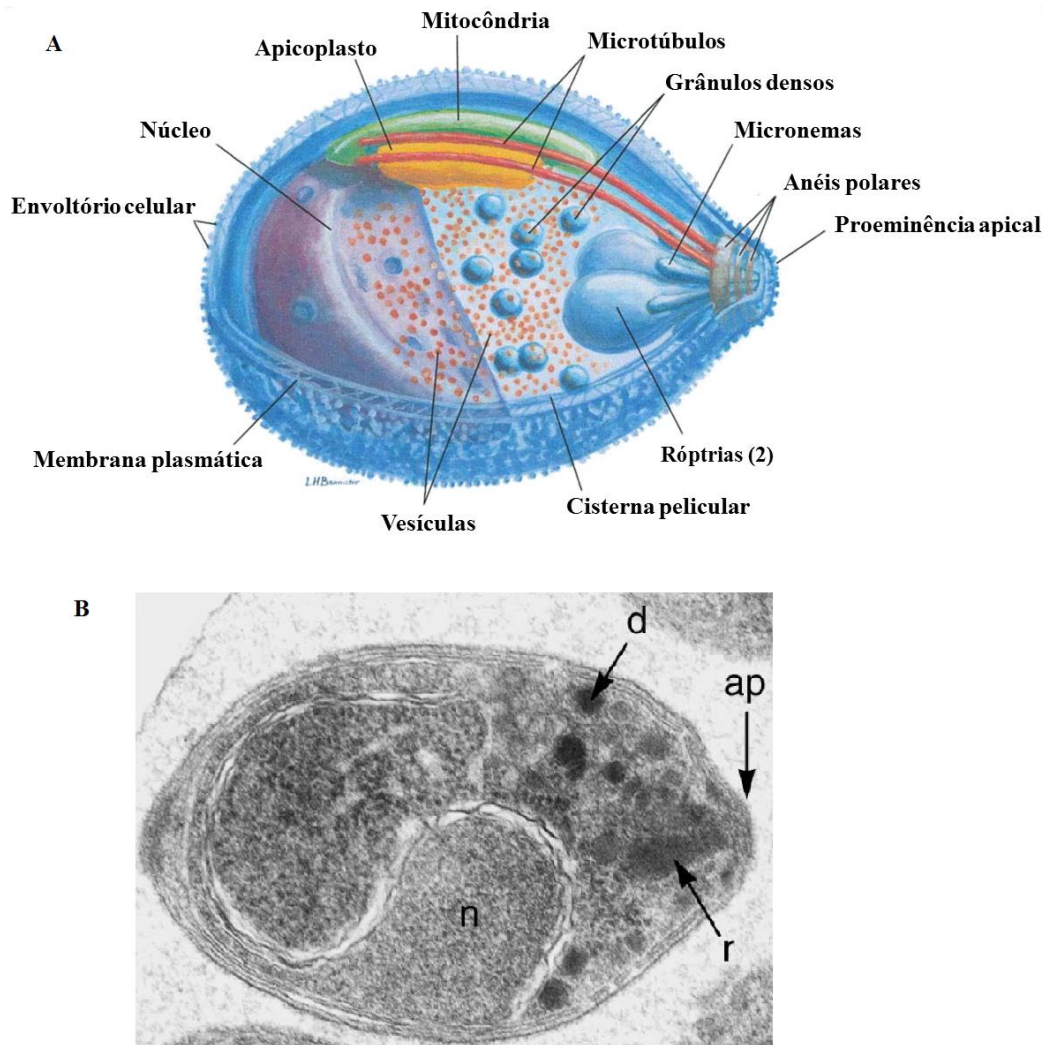
plasmática. Estes filamentos são usados pelo parasito para capturar os eritrócitos, no entanto, após a invasão são clivados da superfície. A estrutura química desses filamentos ainda não é totalmente conhecida, mas a hipótese é que sejam um complexo de proteínas de superfície do merozoíto (MSP), compreendendo as mais abundantes proteínas externas do merozoíto que são clivadas ou perdidas durante o processo de invasão (Hopkins et al., 1999; Neves et al., 2011; White et al., 2014).

No corpo celular encontram-se numerosos ribossomos, uma mitocôndria e um plastídeo, o núcleo localizado basalmente. O citoesqueleto é mínimo, onde algumas destas organelas estão ancoradas, o que ajuda a dar forma ao merozoíto (Preiser et al., 2000). Os merozoíto possuem estruturas e características específicas que são essenciais para a invasão dos eritrócitos, que são: camadas de filamentos que envolvem a superfície da membrana plasmática e organelas apicais em vesículas secretoras (Blackman e Bannister, 2001).

As róprias, micronemas e grânulos densos são vesículas membranosas que formam as organelas apicais, importantes por liberarem seus conteúdos durante a invasão, causando uma mudança no formato e na composição da membrana do eritrócito invadido (Preiser et al., 2000).

As róprias são duas estruturas idênticas em forma de pêra, que são densamente coradas e medem aproximadamente 650 nm de comprimento e 300 nm de largura em seu maior diâmetro e contêm várias proteínas. Os micronemas são organelas menores e alongadas (120 x 40 nm), estão localizadas próximas as róprias e, provavelmente, liberam seu conteúdo através destes dutos na fase inicial da invasão. Os conteúdos destas duas organelas são importantes tanto na adesão dos merozoíto na superfície do eritrócito, quando na formação do vacúolo parasitóforo (Hopkins et al., 1999; Bannister et al., 2000a; b). Os grânulos densos são corpos arredondados e se localizam separadamente dentro do citoplasma apical do merozoíto, possuem aproximadamente 80 nm de diâmetro e possuem conteúdo densamente granular semelhante às róprias. Após a invasão eritrocítica, estas organelas se movem para a superfície do parasito e liberam seu conteúdo no vacúolo parasitóforo, acarretando em aumento da área de sua membrana e, possivelmente, estão envolvidos no processo de diferenciação do parasito para o estágio de anel (Preiser et al., 2000; Blackman e Bannister, 2001).

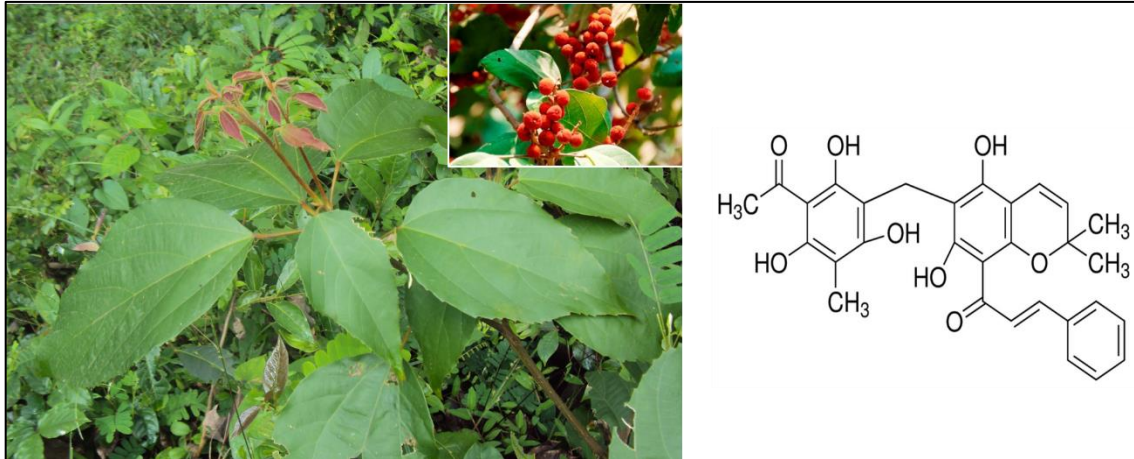
A figura 12 representa a morfologia dos merozoíto de *P. falciparum*, mostrando todas as estruturas acima descritas.



**Figura 12.** Morfologia do estágio de merozoítos de *Plasmodium falciparum*. **A.** Esquema mostrando a organização tridimensional de um merozoíto, com a película parcialmente cortada para mostrar as estruturas internas. **B.** Imagem de microscopia eletrônica de um merozoíto já formado mostrando a proeminência apical (ap) com uma róptria (r), grânulos densos (d), e um núcleo recortado (n). Barras de escala = 0,5  $\mu\text{m}$  (adaptado BANNISTER et al., 2000a).

#### 1.4 A rottlerina

A rottlerina, também conhecida como malotoxina, é o principal composto fenólico extraído da planta *Mallotus philippinensis* e a sua fórmula química é *1-[6-[(3-Acetyl-2,4,6-trihydroxy-5-methylphenyl)methyl]-5,7-dihydroxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-8-yl]-3-phenyl-2-propen-1-one* (Fig. 13) (Maioli et al., 2009). Esta planta é conhecida popularmente como Kamala, tem uma distribuição natural generalizada, mas é encontrada principalmente em regiões tropicais e, geralmente, em ecossistemas mistos com outras espécies (ORWA et al, 2009).



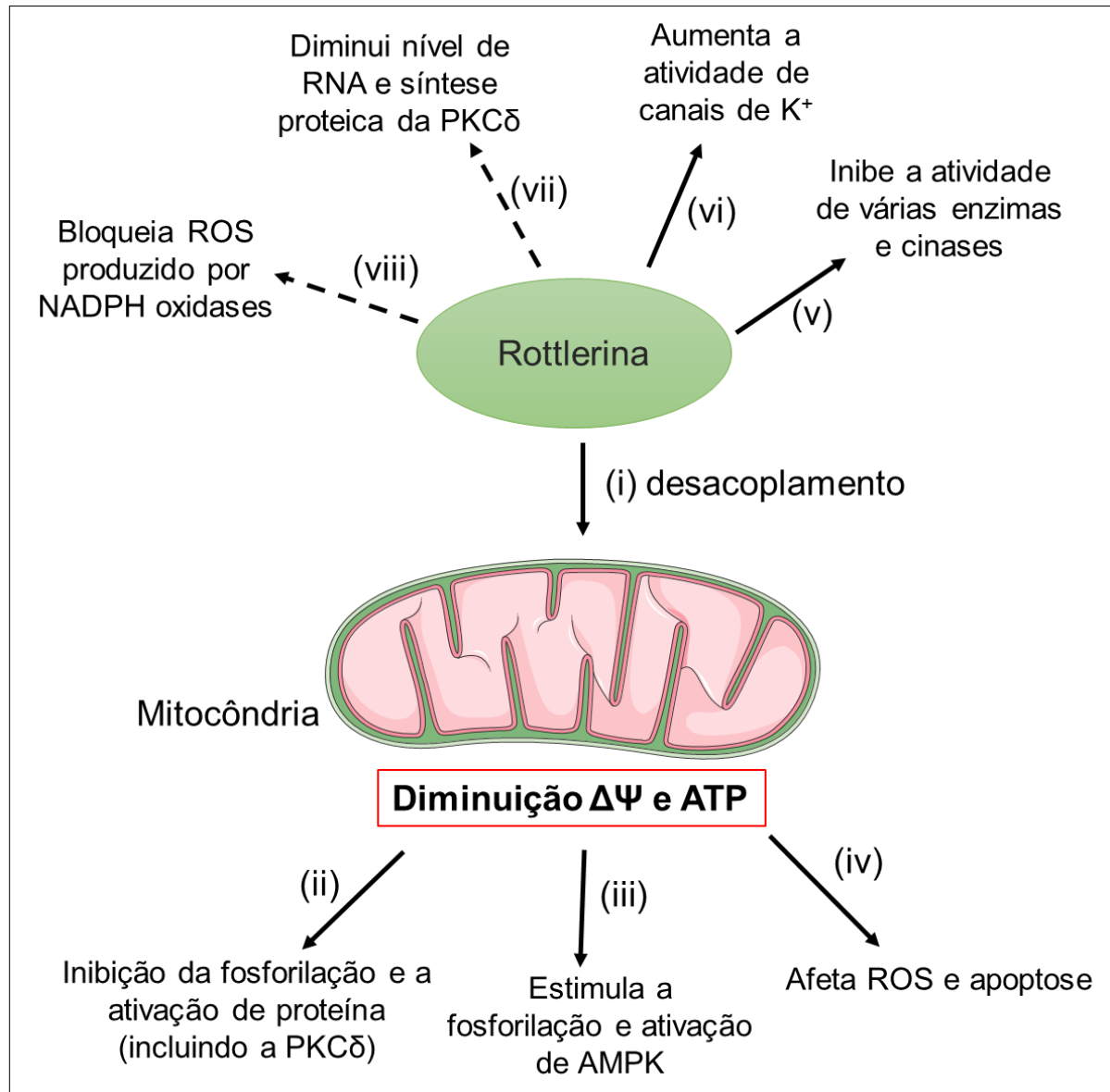
**Figura 13.** A árvore *Mallotus philippinensis* (Kamala) e a estrutura química da rottlerina.

A Kamala é utilizada popularmente para: (i) coloração têxtil; (ii) no tratamento de infecções de pele, particularmente sarna e micose herpética; (iii) como anti-helmíntico; (iv) no tratamento de vermes do fígado em bovinos; e (v) se tem relatos da utilização dos frutos e das cascas para o tratamento de teníase e úlceras de estômago (Sharma e Varma, 2011).

A rottlerina foi inicialmente descrita como um inibidor da proteína cinase C (PKC), em particular, de PKC $\delta$  (inibição de 5 a 10 vezes maior do que para outros isotipos de PKC). No entanto, foi demonstrado que ela é capaz de inibir outros tipos de cinases, por exemplo, proteína cinase A (PKA), caseína cinase II, cálcio-calmodulina cinase III e a enzima cinase do fator de alongação eucariótico 2 (eEF2K) (Gschwendt et al., 1994).

Entretanto, estudos posteriores mostraram que a rottlerina não tem efeito direto sobre a atividade da PKC $\delta$  *in vitro* (Soltoff, 2007). Também foi demonstrado que a rottlerina tem um efeito de desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial (Fig. 14), reduzindo assim os níveis de ATP e afetando várias funções celulares (Soltoff, 2001).

Ademais, atualmente a rottlerina tem sido amplamente descrita como indutora de autofagia em vários tipos de células de mamíferos e como potencial droga para o tratamento de câncer (Balgı et al., 2009; Torricelli et al., 2012; Torricelli et al., 2015; Ietta et al., 2017; Zhu et al., 2017; Maioli et al., 2018). Também possui potenciais aplicações em outras doenças, pois tem propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas (Ishii et al., 2002) e antibacterianas (Zaidi et al., 2009).



**Figura 14.** Efeitos conhecidos da rottlerina em células. A rottlerina tem um efeito desacoplador da mitocôndria provocando uma redução do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) e do nível de ATP (i). Este efeito pode produzir várias consequências (ii-iv) decorrente desta ação, incluindo inibição da fosforilação da tirosina da PKC $\delta$ , produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose. Esta molécula também afeta diretamente as atividades de várias proteínas cinases (detalhadas no texto acima) (v) e canais iônicos (vi). Regulação negativa da PKC $\delta$  (vii), mas é desconhecido se este efeito é independente da mitocôndria. Inibição da produção de ROS por membros da NADPH oxidase (NOX) (viii), entretanto membros limitados da família de NOX foram testadas para efeitos independentes da PKC $\delta$ , mas a ativação da proteína NOX1 foi ligada às mitocôndrias. Setas tracejadas indicam efeito independente da ação da rottlerina na mitocôndria ou como inibidor da PKC $\delta$  (Soltoff, 2007).

A rottlerina é disponível comercialmente por várias empresas (Sigma, Calbiochem, Biomol e etc.). Ela é fornecida como um pó alaranjado, solúvel em DMSO, clorofórmio ou etanol, mas insolúvel em água. Esta molécula não é um medicamento aprovado, embora apresente uma baixa perfil de toxicidade em células de mamíferos (Zhang et al., 2007).

A atividade antimalárica da rottlerina foi identificada, no passado, por uma abordagem abrangente através de um *screening* com diversas moléculas comerciais, conhecidas por suas propriedades especiais em outros sistemas (inibidores de Cinases). O objetivo desta triagem foi identificar ferramentas específicas para o estudo do desenvolvimento do parasito ao definir os efeitos biológicos destas moléculas em diferentes fases do ciclo eritrocítico (dados não publicados obtidos pelo Prof. Philippe Grellier, MNHN).

Embora reconhecendo as limitações da técnica de *microarray* de cDNA para *Plasmodium*, uma análise transcriptômica utilizando esta metodologia foi utilizada com o objetivo de identificar genes cuja expressão foi modulada por essa molécula nas últimas horas do ciclo intra-eritrocítico. Na expectativa de entender melhor o mecanismo de ação da rottlerina e os eventos moleculares associados com a fase de diferenciação dos merozoítos após 90 min e 180 min de tratamento. Alguns genes cuja a expressão foi modulada experimentalmente pela rottlerina, em nível transcricional, codificam proteínas que são relacionadas com os processos de transdução de sinal celular: proteína fosfatase, proteína cinase, ou proteína fosfolipase D com domínio de interação com cinases. Este conjunto de proteínas pode estar envolvidas em uma mesma via metabólica. Na época não se teve a oportunidade de realizar uma análise proteômica como hoje o avanço desta tecnologia poderia permitir (Charneau, 2005).



## **2. JUSTIFICATIVA**

Devido ao grande número de pessoas com risco de contrair a malária, às altas taxas de mortalidade da doença e ao rápido surgimento de cepas resistentes de *P. falciparum* aos medicamentos disponíveis no mercado, dá-se a importância da realização de estudos que identifiquem novas moléculas com atividade antimalárica com potencial para se tornar alternativas para o tratamento da malária. No entanto, dada a propensão deste parasito para desenvolver farmacorresistência (Wongsrichanalai *et al.*, 2002), também é necessário caracterizar os efeitos de novas drogas promissoras, afim de identificar o mecanismo de ação e prever a utilização destas como monoterapia ou em formulação combinatória e sinérgicas de drogas.

A esquizogonia eritrocítica, que culmina na formação de merozoítos, é crucial para a propagação do *Plasmodium*, além de estar relacionada com a patogênese da doença. Por isso, uma das principais estratégias para o tratamento da malária é a interrupção desta etapa. Desta forma, o entendimento da sequência ordenada dos eventos relacionados a esquizogonia eritrocítica é fundamental. Neste sentido, visando descobrir os processos moleculares responsáveis pela diferenciação do parasito, estudos utilizando abordagens transcriptômicas e proteômicas já identificaram alguns genes e proteínas expressos preferencialmente no estágio esquizonte (Florens *et al.*, 2002; Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003; Florent *et al.*, 2004; Llinás *et al.*, 2006). Este cenário estimula à compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos especificadamente neste estágio, podendo revelar alvos favoráveis ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas às existentes.

Os avanços na proteômica quantitativa tornou possível a rápida identificação de milhares de proteínas em misturas proteicas complexas com muito maior resolução do que era anteriormente possível. Além de permitir estudar as modificações pós-traducionais (PTMs). Notavelmente, esta ferramenta analítica tem sido usada para a comparação global da expressão de proteínas e das PTMs em diversas situações no *P. falciparum*: (i) ao longo do ciclo de vida do parasito (Florens *et al.*, 2002; Pease *et al.*, 2013); na identificação de alvos de drogas (Prieto *et al.*, 2008) e no desenvolvimento de resistência (Cooper e Carucci, 2004); (iii) na caracterização do efeitos de drogas já estabelecidas, como a cloroquina e artemisinina (Makanga *et al.*, 2005), bem como de novas moléculas com atividade antimalárica (Bullard *et al.*, 2015).

Foi demonstrado que o efeito da rottlerina, inibidor de proteína cinase, causa a morte rápida *in vitro* do *P. falciparum* ( $IC_{50} < 1\mu M$ ), ao ser aplicada nas horas finais do ciclo intra-eritrocítico, durante a diferenciação dos merozoítos (dados não publicados obtidos pelo Prof. Philippe Grellier, MNHN; França Cordeiro, 2014). Sendo esta fase crucial para a propagação

do *Plasmodium*, o entendimento da sequência ordenada dos eventos relacionado à morte celular induzida pela rottlerina, pode revelar alvos favoráveis ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas às existentes. Este inibidor é, assim, uma ferramenta de escolha para abordar os mecanismos em nível de proteínas que controlam a morfogênese dos merozoítos

O mecanismo de ação da rottlerina no *P. falciparum* ainda não é conhecido. No entanto, a hipótese existente acerca do mecanismo de ação desta molécula neste parasito é a inibição da diferenciação do merozoítos com indução da morte celular por autofagia.

Por fim, como a rottlerina é um inibidor de proteínas cinases, e que muitas vias de sinalização celular são reguladas por fosforilação/defosforilação de proteínas. Consequentemente, é tentador considerar uma desregulação do fenômeno de fosforilação/defosforilação. A fosforilação transiente de proteínas constitui o maior tipo de modificação pós-traducional que regula a expressão de um grande número de genes nos eucariotos. Esse tipo de modificação pós-traducional reversível é implicado em várias funções celulares cruciais como o ciclo celular e a transdução de sinal e participa muito na complexidade do proteoma. Uma grande proporção de proteínas intracelulares (30%) está sujeita aos processos de fosforilação/defosforilação (Cohen, 1992; Lechward et al., 2001).

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi entender os efeitos moleculares e celulares da rottlerina um inibidor da esquizogonia eritrocítica de *P. falciparum* que leva a morte celular do parasito, no intuito de compreender melhor os mecanismos da morfogênese dos merozoítos.

### 3.2 Etapas metodológicas

- Estabelecer a atividade antimalárica da rottlerina sobre diversas cepas de *P. falciparum* afim de estabelecer o IC<sub>50</sub> e a especificidade da droga;
- avaliar os efeitos celulares durante o ciclo eritrocitário da rottlerina;
- identificar proteínas do *P. falciparum* cuja a abundância relativa é modulada pela rottlerina;
- analisar a modulação da fosforilação transiente de proteínas do *P. falciparum* induzida pela rottlerina;
- interpretar os resultados com o intuito de entender melhor e inter-relacionar os eventos moleculares e celulares envolvidos na inibição da diferenciação dos merozoítos.

## **4. MANUSCRITO**

**Rottlerin-mediated autophagy-like leads to cell death of *Plasmodium falciparum*  
precisely during merozoite morphogenesis**

**Abstract**

Malaria is an infectious disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, including the *P. falciparum* which is considered the most dangerous species, since it is responsible for the majority of deaths related to this disease. The emergence of *P. falciparum* resistance to most antimalarial drugs has highlighted the urgency to identify and to clarify the mechanisms of new antimalarial compounds. The pathophysiology of malaria is mainly due to the development and multiplication of the parasite inside human red blood cell and the repeated erythrocyte cycles, where it alters its host cell. The orderly sequence of cellular events of the erythrocytic cycle is reasonably defined at the subcellular level, but the molecules involved in structural and regulatory levels and how they interact with each other are not well known. It was observed that the natural product, rottlerin, initially characterized as a PKC $\delta$  inhibitor and recently considered as an antioxidant and also as a potential autophagy effector, causes specifically a rapid death of *P. falciparum* schizonts ( $IC_{50} < 1 \mu M$ ) in cell culture. In fact, analysis of the schizont enriched population of *P. falciparum* in rottlerin-treated cultures compared to untreated ones revealed that there was an inhibition of the merozoite differentiation, resulting in the rapid death of the parasite with the presence of autophagic structures. In general, rottlerin has been shown to be an interesting tool to address the molecular mechanisms that control merozoite morphogenesis. In efforts to improve our knowledge about the effects of this drug in *P. falciparum* merozoites morphogenesis, a quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis using the iTRAQ<sup>®</sup> isotopic labelling approach based on a nano LC-MS/MS based was performed. After 90 min of rottlerin treatment, 79 proteins and 53 phosphopeptides were significantly modulated in *P. falciparum*. These proteins were grouped into cellular processes, and the metabolic process, stress response, DNA-related proteins, adhesion and invasion, and the export machinery (PTEX) were the processes that had a more prominent modulation of the proteome and/or phosphoproteome analysis. Although some of these proteins have been described as being deregulated by the action of other drugs, a specific response to treatment with rottlerin has been distinguished and appears to involve a down-regulation of mitochondrial proteins and export machinery (PTEX), and modulation of expression and phosphorylation deregulation of DNA-related protein. However, no prominent transcriptional effect was observed. These data then provide a starting point for the elucidation of the mechanism of action of rottlerin in *P. falciparum*.

## INTRODUCTION

Malaria remains a serious human health problem, about 40% of the world's population are at risk of malaria transmission, and it is estimated that the disease accounts for almost half a million deaths annually (WHO, 2017). The causative agent of the most serious form of human malaria is *Plasmodium falciparum*, a protozoan parasite transmitted by the bite of an *Anopheles* female mosquito. After entering the human host at the site of the bite, the parasites move through the bloodstream to the hepatocytes where they mature into the liver schizont form and multiply, releasing the merozoite forms into the bloodstream. After the invasion of red blood cells (RBCs), the merozoites transform into the ring stage (0- 20 h) and trophozoite stage (20-36h), and then perform three to four mitosis cycles to form the multinuclear schizont stage (36-48h). During the last few hours of schizogony, the parasite replicates within the parasitophorous vacuole to produce 16–32 daughter merozoites with specific apical organelles specialized for invasion. Following egress, each merozoite reinvades a new RBC to begin another round of infection (Bannister e Mitchell, 2003; Phillips *et al.*, 2017).

The erythrocytic cycle gives rise to the most important clinical symptoms of the disease and it is responsible for the morbidity and mortality of malaria. Furthermore, 20% of predicted transcripts (Bozdech *et al.*, 2003; Le Roch *et al.*, 2003) and, more recently, 55% of the proteome predicted (Pease *et al.*, 2013) for *P. falciparum* are specific to this part of the cycle. Which is a stimulus to understanding the molecular mechanisms of this cycle and being the main stage targeted by novel antimalarial drugs. Studies with microarray techniques revealed that at least 60% of the *P. falciparum* genome is transcriptionally active during intraerythrocytic development (Komaki-Yasuda *et al.*, 2013).

Given the number of malaria incidence (an estimated 219 million cases of malaria occurred worldwide in 2017) added to the non-availability of vaccine and the increase resistance of *P. falciparum* against the artemisinin-based combination therapy, the best available treatment (WHO, 2017), there is a pressing need to find new alternative drugs and elucidate the mechanisms of action of substances with antimalarial activity to discover new drug targets.

Recent advances in quantitative proteomics and their post-translational modifications (PTMs) with high resolution and accuracy have contributed for an understanding better of the parasite biology throughout parasite in different life cycle stage (Florens *et al.*, 2002; Le Roch *et al.*, 2004; List *et al.*, 2008; Pease *et al.*, 2013). Proteomics has also been useful to interpret the molecular mechanisms of therapeutic drug action or resistance, such as changes in the *P. falciparum* protein expression under treatment with chloroquine (Prieto *et al.*, 2008; Radfar



*et al.*, 2008), pyrimethamine (Nirmalan *et al.*, 2004), doxycycline (Briolant *et al.*, 2010), artemisinin (Prieto *et al.*, 2015) and CoArtem (artemether and lumefantrine) (Makanga *et al.*, 2005). In addition, a proteome analysis was used to investigate the action of Purvalanol B, a cyclin dependent kinase inhibitor with lethal antiplasmodial activity (Bullard *et al.*, 2015). In this way, here we describe the effects of another kinase inhibitor, the rottlerin, on *P. falciparum* performing the large-scale quantitative proteome and phosphoproteome analysis.

Rottlerin, also called mallotoxin, is a natural polyphenolic compound (5, 7-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-(2,4,6-trihydroxy-3-methyl-5-acetylbenzyl)-8-cinnamoyl-1,2-chromine) isolated from the tree *Mallotus philippinensis* (Sharma e Varma, 2011). Rottlerin was originally described as an inhibitor for protein kinase C (PKC), mainly PKC $\delta$  (5–17 times more potent than of other PKC family members), also able to inhibit other types of protein kinases such as casein kinase II, PKA, Ca<sup>2</sup>/calmodulin-dependent protein kinase III, and elongation factor-2 kinase (Gschwendt *et al.*, 1994). More recently, this molecule has been described as a potent activator of the large conductance voltage and Ca<sup>2</sup> activated K<sup>+</sup> channel (Zeng *et al.*, 2006), mitochondrial uncoupler (Soltoff, 2007), autophagy and apoptosis inductor (Song *et al.*, 2008; Balgi *et al.*, 2009; Torricelli *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2018) and anticancer compound (Maioli *et al.*, 2012; Torricelli *et al.*, 2012; Maioli *et al.*, 2018). Rottlerin is not an approved drug although it shows a low toxicity profile in the rodent model (Zhang *et al.*, 2007). To date, the mechanism of action of rottlerin on *P. falciparum* was not uncovered.

Herein, we established that the application of subtoxic doses of rottlerin (at a concentration of 0.5-1  $\mu$ M) on schizonts (in which merozoites were not yet individualized) aborted specifically the merozoite differentiation and then induce a drastic cell death by autophagy-like and consequently stop the erythrocyte propagation. Since the dynamic of the molecular events of the merozoite differentiation are not yet understood, and the rottlerin is a tool able to block specifically this sequential morphogenesis, decipher the protein actors associated with the biological effects of rottlerin should allow developing original chemotherapeutic strategies. Consequently, here we characterize the first effects of rottlerin on *P. falciparum* merozoite morphogenesis using quantitative and comparative iTRAQ™ labelling-based proteomic and phosphoproteomic approaches.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Maintaining P. falciparum cultures* - The chloroquine-resistant strain S20 of *P. falciparum* (kind gift from Professor F.T.M. Costa, University of Campinas, Brazil) was maintained in continuous culture on human erythrocytes in RPMI 1640 medium at 37 °C, under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> as described by (Trager e Jensen, 1976). Parasite synchronization

was performed by sorbitol treatment as described elsewhere (Lambros e Vanderberg, 1979). Parasitaemia and life cycle stages were confirmed with Giemsa-stained blood smears.

*Flow cytometry-based assay for measured parasite growth* - In order to evaluate the rottlerin effect on the intra-erythrocytic *P. falciparum* cycle, a flow cytometry -based assay was performed as previously described (Bei *et al.*, 2010) with minor alterations. Briefly, sorbitol-synchronized ring-stage parasites at 1% parasitemia were cultured with or without rottlerin. In strategic times to monitor the parasite biological cycle, 200  $\mu$ L samples were pelleted via centrifugation ( $600 \times g$ , 5 min) and washed twice in 100  $\mu$ L  $1 \times$  phosphate buffered saline (PBS). Cells were then incubated with 4  $\mu$ L of 1:10,000 SYBR Green I (Molecular Probes) for 30 minutes at 37°C. Cells were washed and resuspended in  $1 \times$  PBS.

Culture enriched in schizont stage with parasitemia of 1% and hematocrit of 2% were incubated with 0.1, 0.5, 1 or 2  $\mu$ M rottlerin between 0 and 24 h. Parasites then were fixed in Glutaraldehyde 0.04% in PBS between 4h and 2 weeks at 4°C and permeabilized with 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) incubated for 10 min at room temperature. After centrifugation ( $400 \times g$ , 5 min), the permeabilized cells were re-suspended in RNase at 0.5 mg/ml and incubated for at least 3h at 37 °C for a complete digestion of reticulocyte RNA. Finally, samples were stained with 5 nM YOYO-1 (Molecular Probes) in agreement with previous published methods (Li *et al.*, 2007). Flow cytometry data was collected using a FACSVerser™ (Becton, Dickinson and Company) with an acquisition of 300,000 events per sample.

*Transmission electron microscopy* - *Plasmodium*-infected RBC were centrifuged (1000g, 10 min) in Eppendorf-tubes between every change of fixation solution. Cells were washed in PBS and fixed in 2.8 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, at 4 °C for 4 h. After repeated washes in phosphate buffer and post-fixation in 2.0% (w/v) osmium tetroxide in phosphate buffer for 1 h, at 4 °C, cells were washed in buffer and dehydrated in an ascending series of ethanol up to 70%. The cells were infiltrated in agar-agar by centrifugation, cut into smaller pieces bathed in 70% ethanol and dehydrated in an ascending series of ethanol to propylene oxide and embedded in Araldite. Sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963).

*Culturing parasites with rottlerin for proteomics analysis*- Parasites were maintained and synchronized as described above. At 38–44 h post invasion (hpi) in which schizonts contained at least four nuclei verified by Giemsa-stained blood smears, the IC<sub>50</sub> concentration (determined by [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine incorporation and SYBR Green I-based fluorescence growth assays (Suppl. Table S1) to be 1  $\mu$ M) was applied and incubated for 1h30 at 37 °C. Controls

were treated with an equivalent volume of DMSO vehicle (less than 1% of total culture volume). Three treatment cultures and three control cultures were prepared (experimental workflow is shown in Fig. S1).

*Protein extraction and sample preparation for LC-MS/MS-* Infected Red Blood Cells were washed 3 times in PBS and lysed by 0.15% saponin (Sigma) for 5 min on ice. Free parasites were sedimented by centrifugation ( $3,200 \times g$  for 10 min at 4 °C) and washed 3 times with PBS and stored at -80 °C. Then, each sample was solubilized in 8 M urea containing a complete mixture of protease (cOmplete mini, Roche Diagnostics) and phosphatase (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II, Calbiochem®) inhibitors through three rapid freeze-thaw cycles. In order to check if for protein degradation, a 12% SDS-PAGE was carried out (Fig. S3). Then, proteins were recovered by ethanol/acetone precipitation at -20 °C. Subsequently, the precipitates were solubilized in 8 M urea in 20 mM triethylammonium bicarbonate, reduced with 20 mM DTT at room temperature for 1 h, alkylated with 40 mM iodoacetamide at room temperature in the dark for 1 h. The sample was then diluted to 2 M urea and digested overnight at room temperature by endoproteinase Lys-C (Sigma-Aldrich) with 0.01 AU per 100 µg of proteins. After the first digestion step, the solution was then diluted to 1 M urea and modified trypsin (Promega) was added (1 µg of trypsin per 100 µg of proteins) for 1 h, at 37 °C. Following digestion, all reactions were acidified with trifluoroacetic acid 0.1% (v/v) final concentration to stop proteolysis and desalted using homemade 1 cm long microcolumns of Poros 20 R2 and Oligo R3 resins (Applied Biosystems) packed in p200 tips. Dried up peptides were solubilized in 300 mM TEAB and the concentration of the peptide solution was determined by Qubit® quantification assay (Thermo Fischer).

*iTRAQ Labelling-* Three biological replicates of each sample were labelled with iTRAQ® 4plex kit according to manufacturer's specifications (Applied Biosystems). Briefly, for each iTRAQ® 4plex reagent vial, 70 µL of ethanol were added at room temperature. Then 115 µg of dried and desalted digest from each sample was individually resuspended in 30 µL of 300 mM triethylammonium bicarbonate buffer and added to an iTRAQ® label vial. Peptides labelled as follows: parasites at T0, 90 min untreated-parasites and 90 min rottlerin-treated parasites were labelled with the 114, 115 and 116 markers, respectively. Subsequently, the samples were incubated for 2 h at room temperature. The labelled peptides were combined into a single tube in equal proportion and concentrated by using a SpeedVac (Thermo Fischer Scientific). Afterward, peptides were desalted with a homemade C18 spin column.

*Phosphopeptide Enrichment* - Phosphopeptides were enriched using Pierce™ Magnetic Titanium Dioxide Phosphopeptide Enrichment Kit according to the manufacturer's specifications (Thermo Scientific™). Briefly, iTRAQ®-labelled multiplexed samples (around 300 µg per biological replicate) were resuspended in a solution of 80% acetonitrile/2% formic acid (v/v), and 1 µL of 20X TiO<sub>2</sub> Magnetic Beads to 10 µg of peptide mixture was added. Each tube was placed on a magnetic plate separator for 1 min and the supernatant was removed. Then, 600 µL of Binding Buffer (per tube) was added quickly to resuspend the beads and each tube was placed on a magnetic plate separator for 1 min (this procedure was repeated 3 times). After 600µL of Washing Buffer (per tube) was quickly added to resuspend the beads and each tube was placed on a magnetic plate separator for 1 min and the supernatant was removed. Subsequently, 90µL of Elution Buffer (per tube) was added and incubated at room temperature for 10 min. Each tube was placed on a magnetic plate separator for 2 min and the supernatant containing eluted phosphopeptides were collected and dried. For LC-MS/MS analysis, samples were suspended in formic acid in water.

*LC-MS/MS* - The enriched and non-enriched phosphopeptide fractions were analysed in biological triplicate with three technical replicates each, using a Dionex Ultimante™ 3000 RSLC nano system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) coupled online with an LTQ-Orbitrap Elite™ mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA). Samples were first loaded onto a 2 cm × 100 µm fused silica trap column packed in-house with Reprosil-Pur 120 Å C18-AQ 5 µm resin (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany). After trapping, samples were fractionated in a 35-cm × 75 µm reverse phase capillary column ending with a fused silica emitter packed in-house with Reprosil-Pur 120 Å C18-AQ 3 µm resin (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany). In brief, peptides in 0.1% (v/v) formic acid were injected into the trap column with 98% solvent A (0.1% formic acid in water) and 2% solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile) under flow rate of 3 µL/min. After washing, peptides were resolved over 210 min with 230 nL/min flow rate in the analytical column through use of organic gradients: 2–40% solvent B until 170 min; and then 40–85% until 185 min; 85% until 190 min; and reequilibrated at 2% until 210 min. Peptides were ionized by Nanospray Flex™ ion source (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 2.5 kV and a capillary temperature of 275 °C. Data were acquired in a positive mode by Data-Dependent Acquisition (DDA) operated by the software Xcalibur 2.2 SP 1.78 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). DDA survey scans were set to 120.000 FWHM, at m/z of 400, in the m/z range of 300 to 1800 and the top 15

multiply charged ions in each duty cycle selected for MS/MS fragmentation using higher-energy collisional dissociation (HCD) with a normalized collision energy of 35%.

*MS/MS data set analysis and statistics* - PatternLab v.4.0.0.84 was used for the bioinformatic analysis as following procedures described in the PatternLab for proteomics (PL40) protocol (Carvalho *et al.*, 2016) . MS/MS spectra were searched using the embedded Comet (version 2016.01.03). The database included 5548 protein sequences of *P. falciparum* 3D7 downloaded from PlasmoDB (release 2018-04-19) and 294 sequences of human erythrocytes downloaded from NCBI, and 127 common mass spectrometry contaminants included by PatternLab 4.0. The search was limited to fully and semi-tryptic peptide candidates, a tolerance of two missed cleavages, considered carbamidomethylation of cysteine and the iTRAQ-4 modification in the N-terminal and lysine (K) residues fixed modifications and iTRAQ-4plex in tyrosine as variable modification. The search engine accepted peptide candidates within a 40-ppm tolerance from the measured precursor m/z and ‘Fragment Bin Tolerance’, ‘Fragment Bin Offset’ and ‘Theoretical Fragment Ions’ were set to 0.02, 0 and ‘default peak shape’, respectively. Phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine amino acid residues as variable modifications were also considered in Peptide Spectrum Matches (PSMs) searches of phospho-enriched peptide datasets. The Search Engine Processor (SEPro) was used for converging to a list of identifications with a false discovery rate (FDR) lower than 1% at the protein level. The YADA software (Carvalho *et al.*, 2009) was used to Remove multiplexed tandem mass spectra from the data set. Pattern-Lab's Isobaric Analyzer module was employed for quantification analysis of multiplex experiments with isobaric tags. Reporter ions were also calibrated by PatternLab according to the software correction factors provided in the iTRAQ kit. The differential proteomic comparison only considered proteins identified with two or more unique peptides, a paired t-test  $\leq 0.05$ ; and a peptide fold change cut-off  $\geq 0.30$ . For phosphopeptide enrichment, one peptide was accepted. Finally, the network study has been realized with the STRING 10.5 database allowing the prediction of interaction protein (<http://string-db.org>). Modulated proteins were given as input to build the network. The prediction of protein-protein interactions was performed using a high confidence score of 0.70 (high probability that a predicted link exists between the proteins).

*Quantitative real-time RT-PCR* – RT-PCR was performed on total RNA extracted from cultures of *P. falciparum* with TRIZOL reagent (Invitrogen) (Kyes *et al.*, 2000). Samples were then treated with *rDNase Set* (Macherey-Nagel Germany) and NucleoSpin® RNA kits (Macherey-Nagel Germany) to remove contaminating genomic DNA, according to the

manufacturer's protocols. RNA extracted from each sample was quantified using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), the A260/A280 ratio of the RNA samples was 2.313  $\pm$  0.018 (mean  $\pm$  SD) indicating the absence of protein, and then was run out on a 1% agarose gel to assure that RNA was intact (Fig. S4-A). For each sample, 500 ng of RNA were converted to first-strand cDNA using RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific™) and Oligo(dT)18 Primer (Thermo Scientific™) according to the manufacturer's protocol, and a no-reverse transcription control was done in parallel for further assessment of gDNA contamination. Gene-specific primers were designed using Primer-BLAST software (Ye *et al.*, 2012) and synthesized by Eurofins Genomics, and the Genes ID, Primer sequences, amplicon length and qPCR efficiencies are listed in Supplementary table S2. Real time PCR was performed on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics France). Each reaction was performed in triplicate and contained 5  $\mu$ l of SensiFAST SYBR No-ROX Kit Master Mix (Bioline Meridian Bioscience), 500 nM of each primer; and 4  $\mu$ l of 1:20 diluted cDNA sample, in a final volume of 10  $\mu$ l. The cycling conditions were: 1 cycle at 95 °C for 2 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 5 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for 12 s. At the end of the amplification, the melting temperature of the product was also determined using a melting curve program. The C<sub>q</sub> was automatically calculated using the "Second Derivative Maximum Method". The reaction efficiency was determined for each pair of primers using a 50-fold serial dilution of cDNA as template. The standard curve was obtained by plotting C<sub>q</sub> values against logarithm of dilutions. The efficiency of the reaction (E) was calculated from the slope value of a standard curve, as follows:  $E = 10(-1/\text{slope})$ .

In order to determine the true gene-specific variation, stably-expressed reference genes (RGs) are required to normalize the expression level of the target genes. To identify suitable RGs for normalization, 7 candidates were selected among genes previously used as reference genes in *P. falciparum* (r60s, 18s, stRNA, Actin, and Myosin A) (Calvo *et al.*, 2002) or among genes whose proteins did not appear modulated between the three populations T0, C1h30 and R1h30, as shown by proteomic analysis (Transportin and Calmodulin). The expression levels of the 7 candidate RGs were determined by RT-qPCR under the same experimental conditions (T0 *versus* C1h30 *versus* C3h; C1h30 *versus* R1h30; C3h *versus* R3h) and they were analyzed using geNorm. The software classified CAM, r60s and st-RNA as the most stable genes for the time analysis (T0 x C1h30 x C3h). For C1h30 *versus* R1h30, CAM and r60s were used as RGs. Finally, for C3h *versus* R3h, transportin, CAM and r60s were the RG. The optimum number of RGs required for an accurate normalization was provided by the pairwise variation ( $V_n/n+1$ )

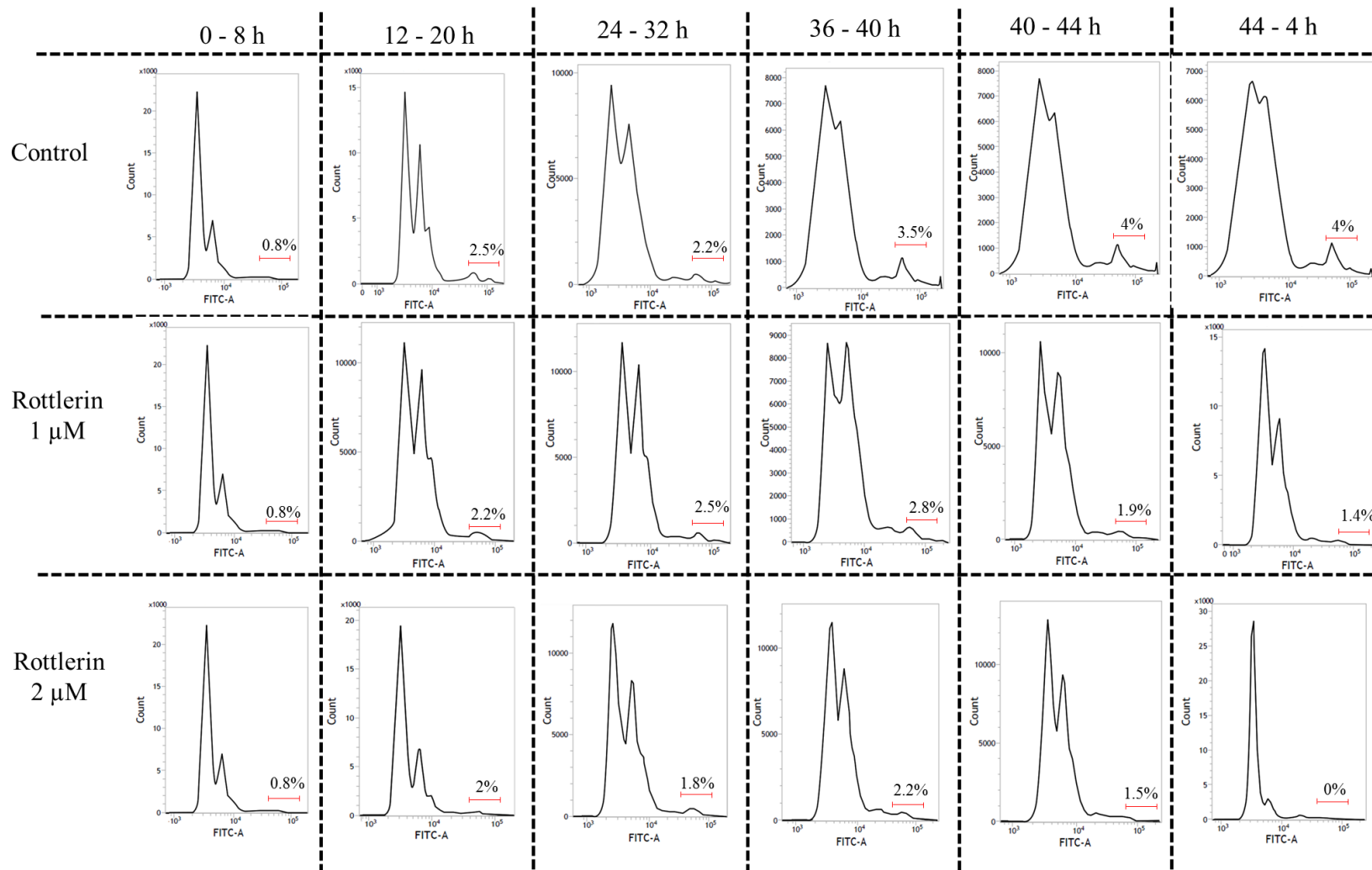
calculation using the GeNorm program (38). The Cq values obtained for these genes were analyzed using the mathematical algorithm geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Thus, expression levels of target genes were normalized using the geometric mean of the transcription levels of these RGs. Data of transcript expression levels were analyzed using t-test at a confidence level of  $p < 0.05$  oneway analysis of variance (ANOVA) at a confidence level of  $p < 0.05$ ; followed by Tukey's test on GraphPad Prism 6.0 software.

## RESULTS

### *Rottlerin as P. falciparum merozoite morphogenesis inhibitor*

Firstly, to evaluate the capacity of rottlerin to inhibit *P. falciparum* erythrocytic growth, we determined by SYBR Green I or [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine incorporation assay that the IC<sub>50</sub> of rottlerin in DMSO is around 0.5 - 1  $\mu$ M in function of the strain (supplementary table S1). From Giemsa-stained blood smears of unsynchronized parasite-infected RBCs treated by rottlerin, we observed viable ring, trophozoite, and young schizont forms but no correct individualized merozoites inside mature schizonts. Contrariwise, the staining was diffused in schizonts and the erythrocyte cycle did not complete properly (data not shown). This observation was confirmed four hours after to have applied rottlerin at 1  $\mu$ M directly on synchronized young schizont infected RBCs in which merozoites were not yet individualized. Moreover, rottlerin-treated mature schizonts staining by DAPI revealed elongated DNA and not dotted DNA suggesting an unusual DNA rearrangement (data not shown).

Next, a comparative time-course analysis of the parasitaemia between iRBCs control and treated with 1  $\mu$ M and 2  $\mu$ M of rottlerin was performed by flow cytometry using SYBR Green I for monitoring the parasitaemia. In previous studies of *P. falciparum* by flow cytometry, it was determined that late stage is from the beginning of nucleus division into two daughter nuclear bodies corresponding to the transition between trophozoite and schizonts, until old schizonts (Arnot *et al.*, 2011). The term used was the multinucleated forms (Schuck *et al.*, 2011). We observed that 8 h-synchronized iRBCs treated by rottlerin at ring stage displayed a continuous growth during ring and trophozoite form until the schizont stage (Fig. 1). Then, it was observed a decrease of old forms caused by the drug, following by a rapid death of *P. falciparum*. So, the drug blocks the erythrocyte cycle at the merozoite differentiation, (Fig. 1, middle and lower panel) and consequently, the re-invasion of new RBCs does not happen. The effect of the drug is dose-dependent (Fig. 1, lower panel). Moreover, when applied directly on young schizonts, the lethal effect was confirmed by flow cytometry analysis (Fig. S5).

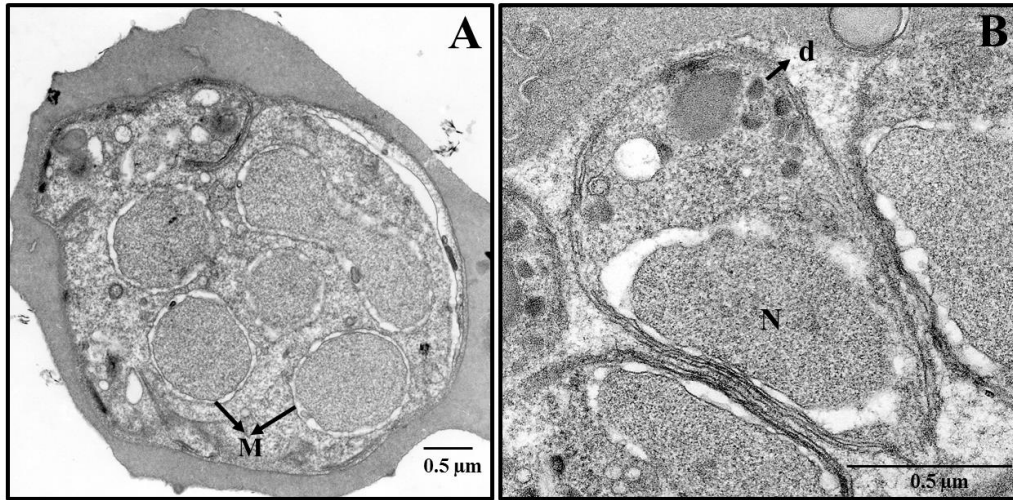


**Figure 1. Effect of rottlerin during *Plasmodium falciparum* parasite growth.** The percentage of multinucleated iRBCs (late stage) was measured by flow cytometry using SYBR Green I staining during all *P. falciparum* intra-erythrocytic cycle in the absence (control) or presence of the rottlerin (1 and 2  $\mu$ m). The drug was applied on the beginning of the cycle (young rings).

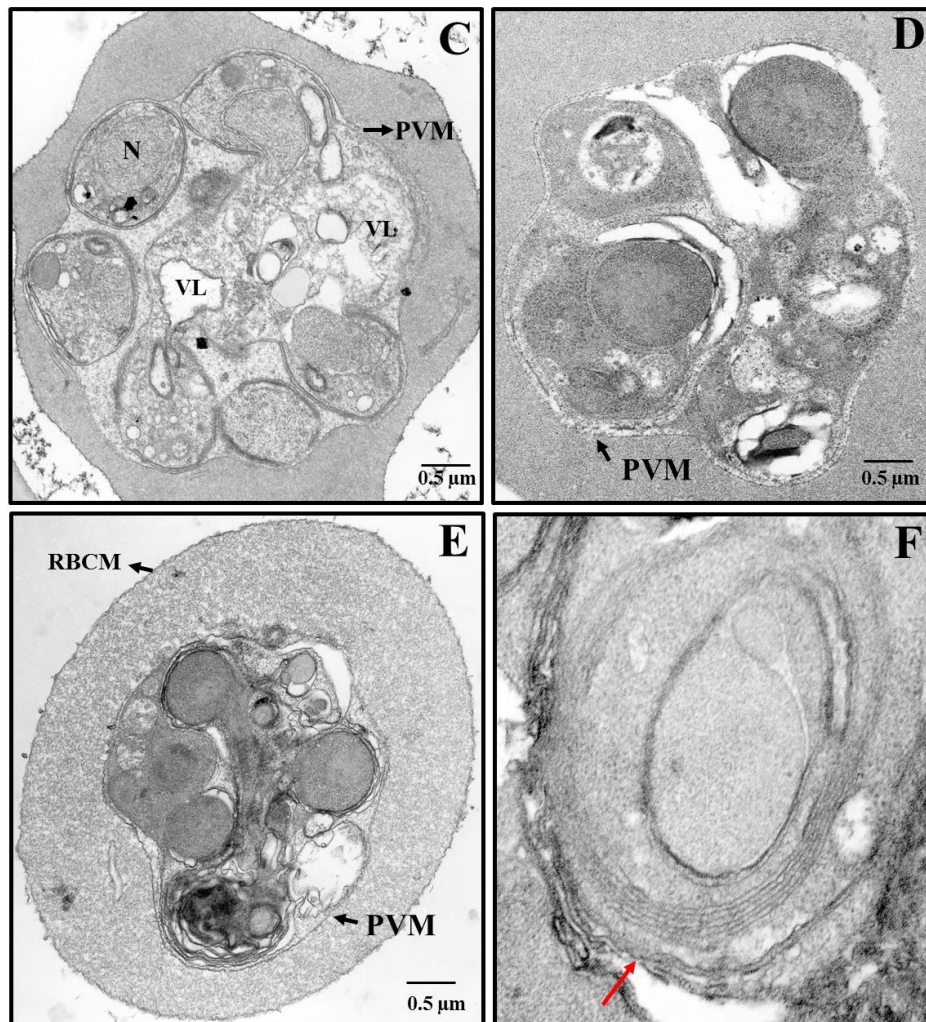


The morphology of the schizont after 4 h, 8 h and 12 h cultures under rottlerin pressure was investigated by transmission electron microscopy. Just prior to the drug application, *P. falciparum* synchronised culture was composed of young schizonts in mitosis (38-42 hpi), which produce a syncytial cell within the parasitophorous vacuole (Fig. 2A) that leads to the formation of merozoites (Fig. 2B). After 4 h rottlerin-treatment, the budding of merozoites has begun in apparently preserved parasitophorous vacuole membrane (PVM) and RBC membrane, but the cytoplasm of parasites presented vacuolization (Fig. 2C) containing cellular components and the vesicles were formed by several membranes, similar to autophagic vacuoles, accentuated after 8 h and 12 h treatment (Fig. 2D and 2E, respectively). This structural disorganisation by the rottlerin treatment after the onset of merozoite formation with no damage of the PVM and RBC membrane led to a remarkable selective lysis of the parasite in few hours appeared to be an autophagic-like cell death (Fig 2D and 2E). The electron microscopy supported the flow cytometry analysis result.

Untreated -  
parasites



Rottlerin- treated  
parasites



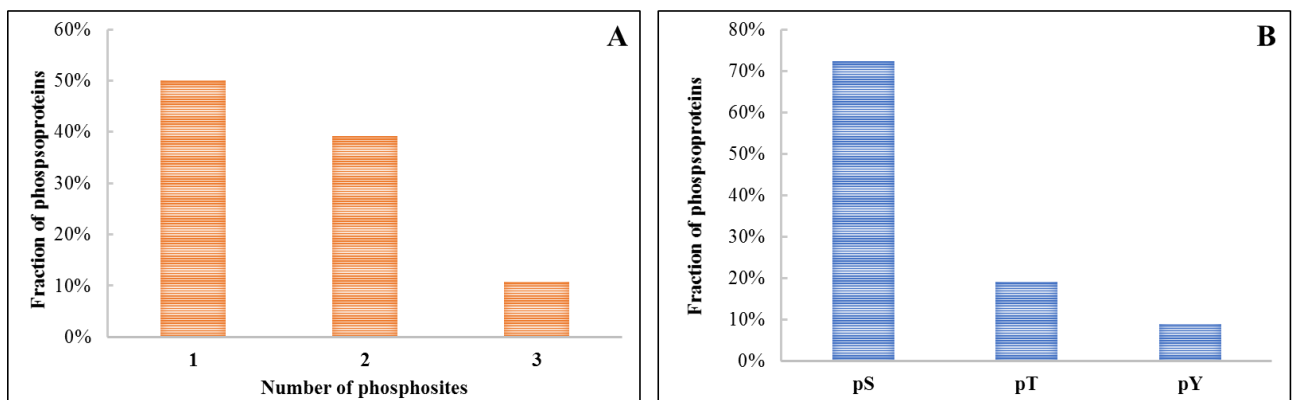
**Figure 2. Electron micrographs of *Plasmodium falciparum* parasites showing autophagic-like cell death morphology in the presence of rottlerin.** Parasite controls in non-treated culture (A, B). Young schizont, in which merozoites were not yet individualised just prior to rottlerin treatment (A) and individualised merozoite 6 h after (B). Schizonts maintained 4 h (C), 8 h (D) and 12h (E) in presence of the rottlerin. A selective lysis of the parasite with no apparent damage to the parasitophorous vacuole and RBC membrane, presence of vacuoles, within double-membrane highlighted by the red arrow (F), characteristic of autophagy. M, merozoite buds; N, nucleus; d, Dense granules; VL, vacuolisation; RBCM, RBC membrane; PVM, parasitophorous vacuole membrane. Scale bars = 0.5  $\mu\text{m}$ .

### ***Global proteomic and phosphoproteomic analysis***

For proteome and phosphoproteome analysis, *P. falciparum* parasite samples were collected in 3 different conditions: (i) schizonts in 40–44 hpi (just prior to rottlerin treatment), called Time 0 (T0); (ii) untreated schizont 90 min after T0 (C1h30); (iii) rottlerin-treated schizont during 90 min (R1h30). Relative quantitative comparison between conditions was performed by isobaric labelling of tryptic peptides. The combined proteomic and phosphoproteomic workflow is outlined in Supplementary Fig. S2.

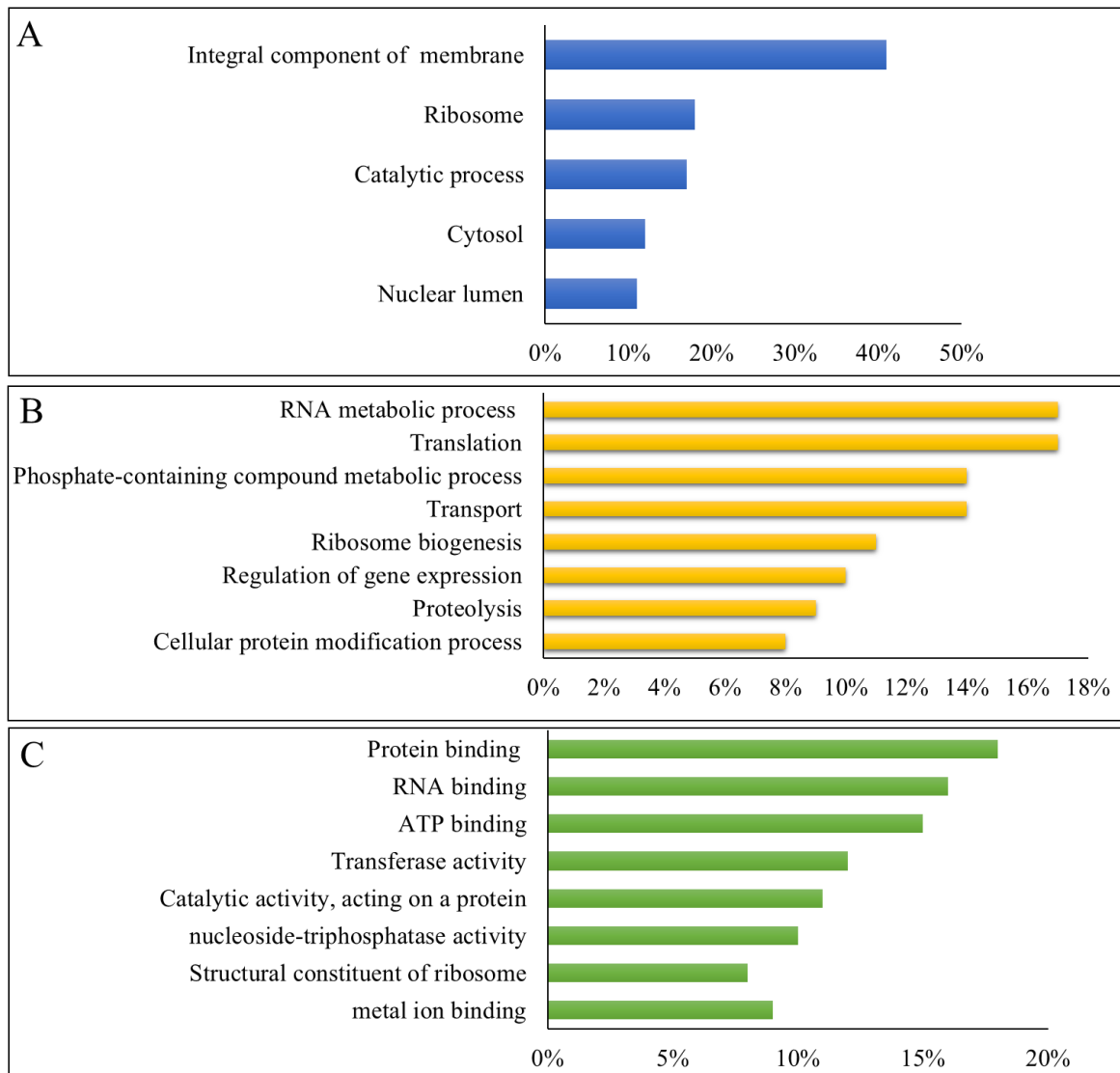
The total proteome analysis allowed the identification of 7720 iTRAQ-labelled peptides (FDR at peptide level = 0.01%) mapping to 1105 proteins (FDR at protein level = 0%) to *P. falciparum* and human erythrocyte according to the maximum parsimony criterion and at least one unique peptide, including 1067 plasmodial proteins (96.7%) and 38 human erythrocyte proteins (3.3%) in the three biological replicates (supplementary Table S3).

A total of 131 phosphopeptides (belonging to 77 phosphoproteins) were identified, comprising 120 phosphopeptides (90.9% of all phosphopeptides) were from *P. falciparum* (corresponding to 72 plasmodial phosphoproteins) and 11 phosphopeptides (9.1% of all phosphopeptides) were from human erythrocyte (belonging to 5 phosphoproteins) (supplementary Table S4). Among the plasmodial phosphoproteins, 50% contained only one phosphorylated residue and 50% had multiphosphorylated peptides (Fig. 3A). Phosphorylation was most abundant on Serine (72%), followed by Threonine (19%), and Tyrosine (9%) (Fig. 3B).



**Figure 3. Global analysis of phosphorylation patterns.** (A) Proportion of phosphoproteins containing one, two or three phosphorylation residues. (B) Proportion of serine (pS), threonine (pT), and tyrosine (pY) residues phosphorylated.

We sorted all identified *P. falciparum* proteins from treated and control samples by GO terms (cellular component, molecular function and biological process) (Fig. 4). According to the ‘cellular component’, the proteins were classified into 5 categories, whereas integral membrane component (42%) is the richest category (Fig. 4A). In ‘biological process’ assignment, the proteins were classified into 8 categories, and RNA metabolic process (17%) and translation (17%) were the main ones. Others are related to phosphate-containing compound metabolic process and transport (Fig. 4B). Finally, in ‘molecular function’ description, proteins were most currently associated to protein, RNA and ATP binding, respectively 19%, 16% and 15% (Fig. 4C).



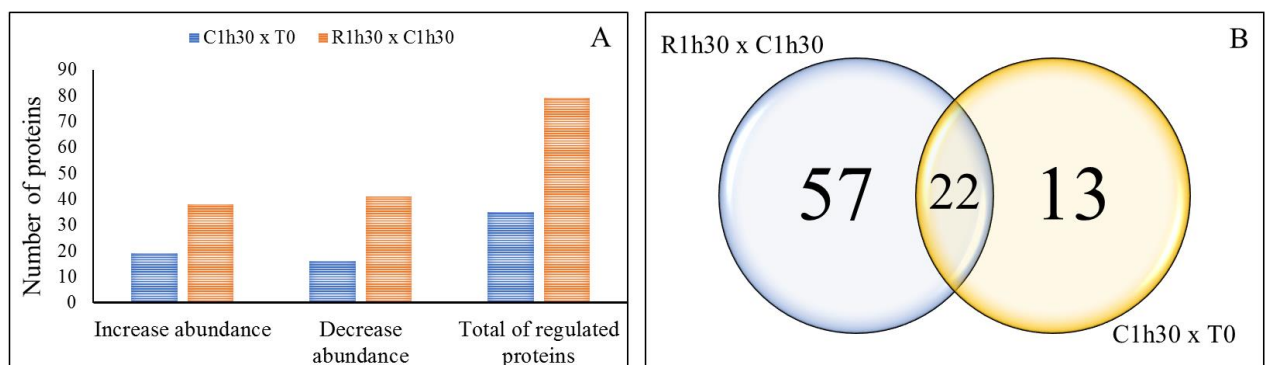
**Figure 4. Gene Ontology terms from all *Plasmodium falciparum* identified proteins. (A) GO terms describing identified proteins as Cellular component, (B) biological process and (C) molecular function.**

### *Differentially Expressed Proteins*

For the quantitative comparative analysis of the protein expression profile during schizogony time-course on the one hand and rottlerin treatment on the other hand, a stringent statistical analysis was first performed on peptide level and the ratio between both conditions (time-course C1h30/ T0 and treatment C1h30/ R1h30) was calculated. Peptides exhibiting a p-value  $< 0.05$  and a peptide fold-change  $\geq 1.30$  or  $\leq 0.7$  were considered up- or down-regulated, respectively. Peptides that satisfied cut-off criteria for fold-change and p-value are shown in *Volcano plot* graphs (Fig. S6). Then proteins with at least two peptides, a p-value  $< 0.05$  and a protein fold-change of  $\geq 1.20$  or  $\leq 0.8$  were retained. This analysis resulted in 34 proteins with significant difference of abundance between T0 and C1h30 and 79 proteins between C1h30 and R1h30 that could be grouped in main cell processes in the Table 1.

In our condition of treatment during 90 min, Giemsa-stained slides showed that treated parasites were viable and not lysed (data not showed). Thus, the proteome changes observed in the treated parasites are related to drug effect and are not due to cell death.

Of the proteins modulated between T0 and C1h30, 16 proteins presented higher abundance levels in C1h30 and 18 proteins with lower abundance levels in this same condition. Among the proteins modulated between C1h30 and R1h30, 38 proteins presented higher levels of abundance in R1h30, while 41 proteins had lower levels than in C1h30 (Figure 5A). Among the proteins modulated between the conditions C1h30 versus T0 and R1h30 versus C1h30, 22 proteins appeared modulated in the two sets of differential analysis (Figure 5B).



**Figure 5. Comparison of the numbers of regulated proteins displayed during schizogony and due to the treatment, respectively. (A)** Proteins up and down-modulated between C1h30 x T0 and R1h30 x C1h30. **(B)** Venn sets of modulated proteins shared between both conditions C1h30 x T0 and R1h30 x C1h30.

The regulated proteins could be grouped in 7 clusters in function of their expression profiles (Fig. 6). Most of them were grouped in clusters 1 and 2, with 25 and 28 members, respectively, whereas cluster 3-7 possessed 10, 12, 9, 4 and 3, respectively.

**Table 1.** *Plasmodium falciparum* proteins with modulated abundance between control samples and rottlerin-treated parasites

Cell process	Accession Number <sup>a</sup>	Protein name	Percentage change C1h30 x T0 <sup>b</sup>	Percentage change R1h30 x C1h30 <sup>c</sup>	Cluster
	<i>Carbohydrate metabolism</i>				
	PF3D7_1120100	Phosphoglycerate mutase, putative		+ 20%	1
	PF3D7_1444800	Fructose-bisphosphate aldolase		+ 25%	1
	PF3D7_0922500	Phosphoglycerate kinase		+ 33%	1
	PF3D7_0626800	Pyruvate kinase		+ 47%	1
	PF3D7_1324900	L-Lactate dehydrogenase	+ 28%	+ 48%	7
	PF3D7_1462800	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	- 34%	+ 40%	3
	PF3D7_1015900	Enolase	- 43%	+ 35%	3
	<i>ATP synthase complex</i>				
	PF3D7_1235700	ATP synthase subunit beta mitochondrial		- 49%	2
	PF3D7_1341900	V-type proton ATPase subunit D putative		- 49%	2
Metabolic process	<i>Lipid metabolism</i>				
	PF3D7_0525100	Acyl-CoA synthetase	- 29%		4
	PF3D7_1343000	Phosphoethanolamine N-methyltransferase		+ 36%	1
	PF3D7_1124600	Ethanolamine kinase		- 41%	2
	<i>Amino acid metabolism</i>				
	PF3D7_1235600	Serine hydroxymethyltransferase		+ 46%	1
	PF3D7_0608800	Ornithine aminotransferase		+ 27%	1
	<i>Nucleotide metabolism</i>				
	PF3D7_1012400	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	- 32%	+ 35%	3
	PF3D7_1029600	Adenosine deaminase		+ 45%	1
	PF3D7_1437200	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit, putative		- 35%	2
	PF3D7_1405600	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	- 35%		4
Response to stress, homeostasis and protein folding	PF3D7_0708400	Heat shock protein 90	- 36%	+ 35%	3
	PF3D7_0818900	Heat shock protein 70 (Hsp70-1)	- 27%	+ 30%	3
	PF3D7_1438900	Thioredoxin peroxidase 1		+ 36%	1

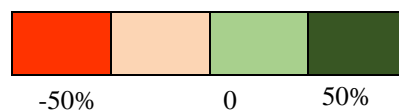
	PF3D7_0527500	Hsc70-interacting protein		+ 35%	1
	PF3D7_0802200	1-cys peroxiredoxin		+ 35%	1
	PF3D7_0621200	Pyridoxine biosynthesis protein PDX1		+ 31%	1
	PF3D7_0827900	Protein disulfide isomerase (PDI-8)		+ 26%	1
	PF3D7_1222300	Endoplasmin, putative (grp94)		+ 22%	1
	PF3D7_0816600	Chaperone protein ClpB1	+ 49%	- 39%	5
	PF3D7_1104400	Thioredoxin, putative		- 33%	2
	PF3D7_1232100	60 kDa chaperonin (Cpn60)		- 40%	2
Chromosome organization	PF3D7_1105100	Histone H2B	+ 36 %	+ 23%	7
	PF3D7_1105000	Histone H4		+ 31%	1
	PF3D7_1203700	Nucleosome assembly protein		+ 33%	1
Regulation of cell cycle	PF3D7_1417800	DNA replication licensing factor MCM2		- 58%	2
	PF3D7_0619400	Cell division cycle protein 48 homologue, putative	- 24%		4
	PF3D7_0826700	Receptor for activated c kinase	- 42%		4
Intracellular traffic	PF3D7_1108600	Endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein/ Membrane-associated calcium-binding protein (ERC)	+ 56%	+ 23%	7
	PF3D7_1242800	Rab specific GDP dissociation inhibitor		- 55%	2
<i>Maurer's cleft, host cell surface or periphery, parasite surface and apical complex</i>					
Adherence and invasion (Export of malaria proteins)	PF3D7_0935900	Ring-exported protein 1 (REX1)	+ 19%	- 81%	5
	PF3D7_1335100	Merozoite surface protein 7 (MSP7)	+ 42%	- 52%	5
	PF3D7_0722200	Rhoptry-associated leucine zipper-like protein 1	+ 45%	- 55%	5
	PF3D7_0930300	Merozoite surface protein 1 (MSP1)	+ 43%	- 40%	5
	PF3D7_1033200	Early transcribed membrane protein 10.2	+ 48%	- 48%	5
	PF3D7_1252100	Rhoptry neck protein 3		- 40%	2
	PF3D7_0424600	Plasmodium exported protein (PHISTb)		- 45%	2
	PF3D7_1201000	Plasmodium exported protein (PHISTb)		- 40%	2
	PF3D7_0310400	Parasite-infected erythrocyte surface protein		- 40%	2
	PF3D7_0201900	Erythrocyte membrane protein 3		- 39%	2
	PF3D7_0113000	Glutamic acid-rich protein		- 68%	2
	PF3D7_0202000	Knob-associated histidine-rich protein		- 21%	2
	PF3D7_0532400	Lysine-rich membrane-associated PHISTb protein		- 39%	2

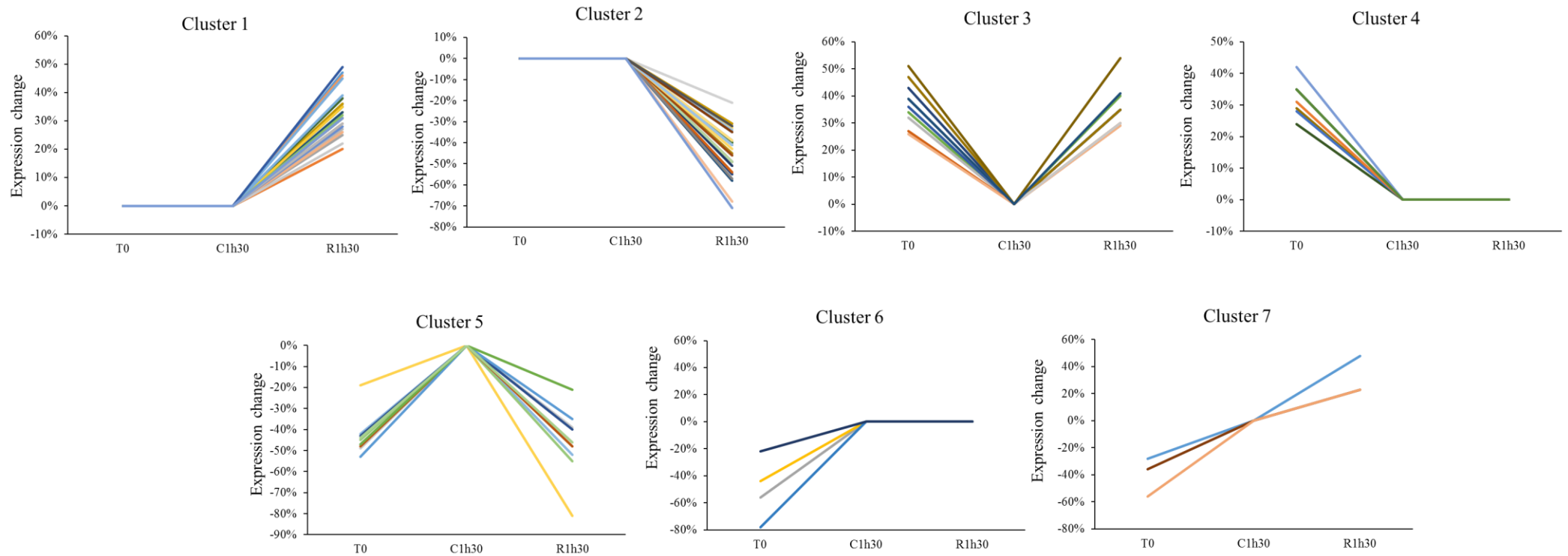
	PF3D7_0207600	Serine repeat antigen 5		- 46%	2
	PF3D7_1149000	Antigen 332 DBL-like protein		- 49%	2
	PF3D7_0905400	High molecular weight rhoptry protein 3	- 28%		4
	PF3D7_0929400	High molecular weight rhoptry protein 2	- 31%		4
	PF3D7_0500800	Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen / Erythrocyte membrane protein 2	+ 56%		6
	PF3D7_0501200	Parasite-infected erythrocyte surface protein / Exported protein 60	+ 44%		6
Protein export machine	PF3D7_1420700	Surface protein P113	+ 53%	- 35%	5
	PF3D7_1436300	Translocon component PTEX150	+ 47%	- 21%	5
	PF3D7_1116800	Heat shock protein 101		- 34%	2
	PF3D7_0831700	Heat shock protein 70 (Hsp70x)		- 51%	2
	PF3D7_0214100	Protein transport protein SEC31		- 55%	2
Proteolysis and Hemoglobin catabolic process	PF3D7_1360800	Falcilysin		- 46%	2
	PF3D7_1116700	Dipeptidyl aminopeptidase 1	- 35%		4
Nucleic Acid and Protein synthesis	PF3D7_1338300	Elongation factor 1-gamma, putative	- 47%	+ 35%	3
	PF3D7_1026800	40S Ribosomal protein S2		+ 38%	1
	PF3D7_1105400	40S Ribosomal protein S4, putative		+ 28%	1
	PF3D7_1447000	40S Ribosomal protein S5		+ 29%	1
	PF3D7_0307100	40S Ribosomal protein S12, putative		+ 29%	1
	PF3D7_1103100	60S Acidic ribosomal protein P1, putative		+ 35%	1
	PF3D7_1027800	60S Ribosomal protein L3		+ 39%	1
	PF3D7_1451100	Elongation factor 2		+ 32%	1
	PF3D7_0614500	60S Ribosomal protein L19		+ 49%	1
	PF3D7_1408600	40S Ribosomal protein S8e, putative		- 31%	4
	PF3D7_1107300	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1, putative		- 54%	4
	PF3D7_1421200	40S Ribosomal protein S25		- 57%	4
	PF3D7_1204300	Eukaryotic translation initiation factor 5A		- 31%	4
	PF3D7_1011800	PRE-binding protein	+ 78%		6
	PF3D7_1126200	40S Ribosomal protein S18, putative	- 35%		4
Protein import into nucleus	PF3D7_0812400	Karyopherin alpha		- 41%	2
	PF3D7_0524000	Karyopherin beta	- 26%	+ 29%	3
Cytoskeleton organization	PF3D7_1008700	Tubulin beta chain	- 39%	+ 30%	3



	PF3D7_1361800	Glideosome-associated conector (GAC)		- 43%	2
	PF3D7_1246200	Actin I		- 41%	2
Cellular protein modification and protein catabolic process	PF3D7_1225800	Ubiquitin-activating enzyme E1	+ 44%	- 46%	5
	PF3D7_0727400	Proteasome subunit alpha type-5, putative	+ 22%		6
Hydrolase activity	PF3D7_1403900	Serine/threonine protein phosphatase CPPED1, putative		- 35%	2
Possible paths for apoptosis / protein homooligomerization	PF3D7_1343700	Kelch protein K13		- 32%	2
	PF3D7_1404900	Conserved Plasmodium protein	- 51%	+ 54%	3
Unknown	PF3D7_1302100	Gamete antigen 27/25	- 39%	+ 41%	3
	PF3D7_0617200	Conserved Plasmodium protein		+ 31%	1
	PF3D7_1427900	Leucine-rich repeat protein (ANP32)		- 71%	2

Protein sequences satisfied a FDR < 1%. Quantitation only considered proteins with at least two peptides and peptide with p-value < 0.05. <sup>a</sup> PlasmoDB database. <sup>b</sup> Up-regulated proteins in C1h30 are indicated in green and down-regulated proteins are indicated in red. <sup>c</sup> Up-regulated proteins in R1h30 are indicated in green and down-regulated proteins are indicated in red. The degree of differential expression is reflected by the intensity of the color, with darker colors indicating a greater level of differential expression.





**Figure 6. Expression profiles of regulated proteins between T0, C1h30 and R1h30.** Regulated proteins were grouped in 7 clusters according to their modulation profiles. **Cluster 1:** Proteins with no significant difference between C1h30 and T0 but increased in R1h30 compared to C1h30. **Cluster 2:** Proteins with no significant difference between C1h30 and T0 but decreased in R1h30 compared to C1h30. **Cluster 3:** Proteins decreased in C1h30 compared to T0 but increased in R1h30 compared to C1h30. **Cluster 4:** Proteins decreased in C1h30 compared to T0, with no significant difference between R1h30 and C1h30. **Cluster 5:** Protein increased in C1h30 compared to T0 and decreased in R1h30 compared to C1h30. **Cluster 6:** Proteins increased in C1h30 compared to T0, with no significant difference between R1h30 and C1h30. **Cluster 7:** Proteins increased in C1h30 compared to T0 and increased in R1h30 compared to C1h30. T0: Parasites at the time of treatment. C1h30: Untreated parasites. R1h30: Rottlerin-treated parasites.

Table 1 shows that modulated proteins with similar trends of abundance regulation are globally grouped in the same biological processes and belong to the same clusters of expression profiles (Fig. 6). The proteins up-regulated by rottlerin treatment were mainly associated with the metabolism processes of carbohydrates, lipids and amino acids, response to stress, homeostasis and protein folding, chromosome organization and protein synthesis, and categorised clusters 1, 3 and 7. The down-regulated proteins after rottlerin treatment were mostly associated with adherence, invasion, and cytoskeleton organization and grouped in 2 and 5 (Table 1 and fig. 6).

### ***Energy metabolism***

The rottlerin-treated parasites showed an increased abundance of 7 proteins of the glycolytic pathway, plus two proteins with values below the stringent cut-off levels that we set, hexokinase [PlasmoDB: PF3D7\_0624000] (p-value 0.03, fold change 1.1) and ATP-dependent 6-phosphofructokinase [PlasmoDB: PF3D7\_0915400] (p-value 0.009 and fold change 1.14). Another important enzyme of energetic metabolism that show up regulation is the lactate dehydrogenase that catalyses the conversion of pyruvate into lactate. Oppositely, the drug caused a decrease of the abundance of 2 proteins related to ATP production in mitochondria. Consequently, it seems that rottlerin-treated parasites are led to produce energy through the lactic fermentation.

### ***Stress and protein folding***

As expected, the effect of a lethal drug is accompanied by a notable modulation of 11 proteins involved in response to stress, homeostasis and protein folding, among which 8 proteins were up-regulated and 3 down-regulated in the rottlerin-treated parasites. The increase of relative abundances of several chaperones as PfHsp90 and PfHsp70 of the multichaperone complex in the cytosol of parasite (Shonhai e Blatch, 2014), the endoplasmic reticulum paralog of Hsp90 named glucose-regulated protein 94 (GRP94) endoplasmin (Kumar *et al.*, 1988; Frey *et al.*, 2007), protein disulfide isomerase PDI8, and antioxidant enzymes as thioredoxin peroxidase I, Pf1-Cys-Prx and pdx1, reflexes the response of the parasite to try to maintain substrate in folding competent states and to minimize the cellular oxidative damage.

Immunofluorescence assays revealed that PDI8 mainly in the ER at the beginning of the schizogony, surrounding the nuclei in division and in small vesicles visible at the end of the differentiation (Mouray *et al.*, 2007) appeared not around the nuclei but concentrated closely to the food vacuole in rottlerin-treated schizont-forms with some small vesicles (Fig. S7).

The endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein (Pferc) located in endoplasmic reticulum, may play a role in protein trafficking. Also, its expression increases throughout the erythrocyte cycle of the parasite (La Greca *et al.*, 1997), corroborating with our results since this protein had an increase of abundance of 56% in the older forms of control. Rottlerin further increased the level of abundance of this protein and a similar abundance increase has also been observed in parasite under the artemether and lumefantrine treatment (Makanga *et al.*, 2005), and in N-89, an antimalarial compound (Aly *et al.*, 2007).

Interestingly, the down-regulated chaperones and antioxidant enzyme in treated parasites, ClpB1, 60 kDa chaperonin (Cpn60) and thioredoxin putative, localize in apicoplast (Lanzer *et al.*, 2006; El Bakkouri *et al.*, 2010) (Shonhai e Blatch, 2014).

### ***Adherence and invasion processes***

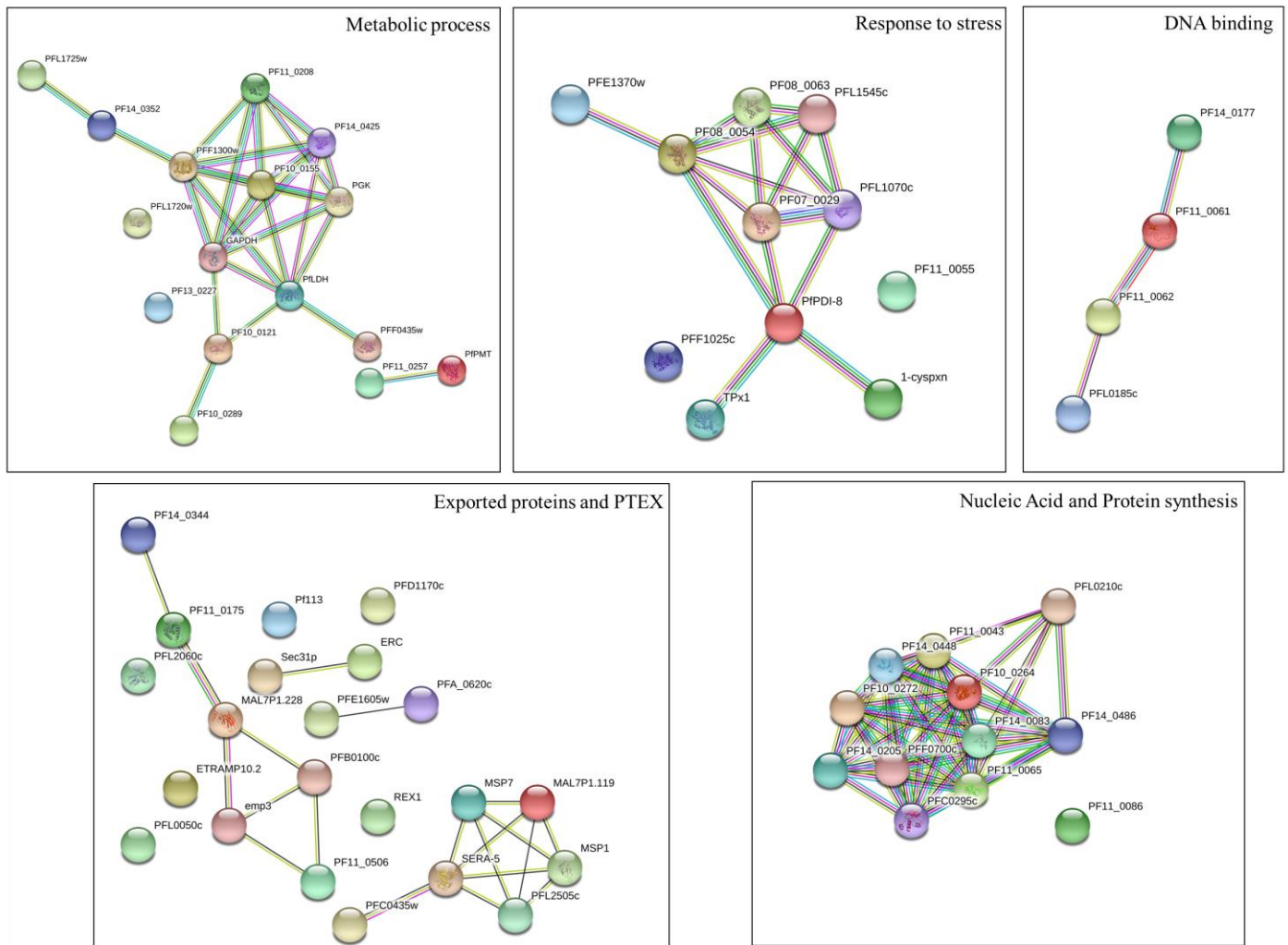
The drug generated mainly the decrease of the abundance of exported proteins in concomitant with a decrease of *Plasmodium* translocon of exported proteins (PTEX), a malaria trafficking machine, such as translocon component PTEX 150, PfHSP101, and the borderline identified exported protein 2 [PlasmoDB: PF3D7\_1471100] (p-value 0.116, fold change 0.88). Two additional proteins, Pf113 and HSP70-x down-regulated by rottlerin, have been recently identified to associate with PTEX (Elsworth *et al.*, 2016). The PfHsp70x is found to locate both at the J-dots, and within the lumen of the parasitophorous vacuole (Zhang *et al.*, 2017). The PfSec31 down-regulated by rottlerin is associated with transport vesicles and Maurer clefts in the erythrocyte cytosol (Taraschi *et al.*, 2003). Interestingly, rab specific GDP dissociation inhibitor that act as regulatory molecule in vesicular membrane traffic, showed a substantial decrease. This suggests that rottlerin altered intracellular protein traffic and protein export.

### ***Chromatin assembly and DNA replication***

Histones H2B, H4 and nucleosome assembly protein (NAP is a histone chaperone) show an increased abundance in rottlerin-treated schizonts. These proteins allow assembly and disassembly of nucleosomes. In *P. falciparum*, NAP contributes to regulate chromatin structure organization (Gill *et al.*, 2010). Moreover, the subunit 2 of the *P. falciparum* minichromosome maintenance complex (MCM) required for the initiation of DNA replication through the transition of pre-replication complex to the replication complex (Patterson *et al.*, 2006) is highly down regulated in rottlerin-treated schizonts. Moreover, the protein classified as unknown, leucine-rich repeat protein (PF3D7\_1427900), also called by acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32-related protein (ANP32) is highly down regulated through the effect of the drug. In mammalian, this protein is described to be involved in chromatin modification and remodelling, apoptotic caspase modulation, protein phosphatase inhibition, and as regulation of intracellular transport (Reilly *et al.*, 2014). So, the higher assembly of nucleosome and the dismantling of the MCM probably difficult the correct mitosis in treated parasites and cause cell division cycle arrest.

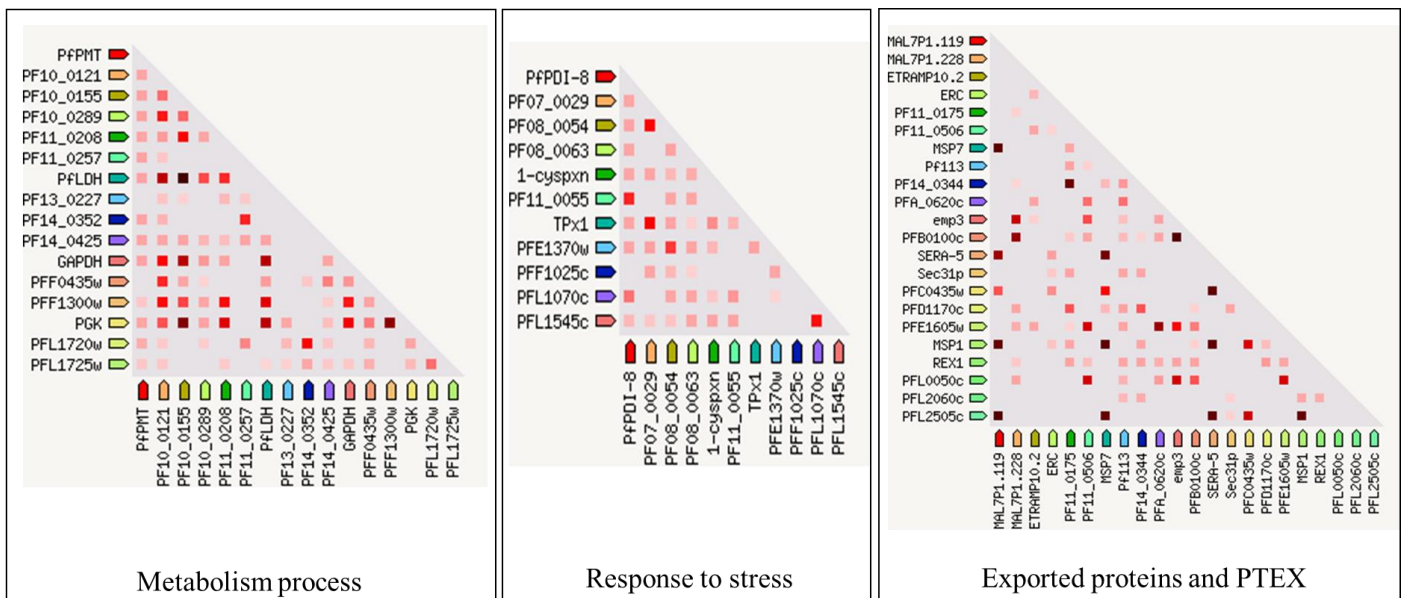
### ***Protein-protein interaction***

Many proteins play their biological role by interacting with each other, thus establishing the cell pathways. For the evaluation of protein-protein interactions, the main groups of significantly regulated proteins (see table 1) were analysed by the STRING database of known and predicted protein interactions (Szklarczyk *et al.*, 2014). The protein interactions maps (Fig. 7) showed that there is evidence of potential protein interactions between proteins involved in the same, especially with respect to metabolic process and nucleic acid and protein synthesis.



**Figure 7. The protein-protein interaction network of rottlerin-modulated proteins groups using STRING database.** PfPMT, phosphoethanolamine N-methyltransferase; PF10\_0121, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; PF10\_0155, enolase; PF10\_0289, adenosine deaminase; PF11\_0208, phosphoglycerate mutase; PF11\_0257, ethanolamine kinase, putative; PFLDH, L-lactate dehydrogenase; PF13\_0227, V-type proton ATPase subunit D, putative; PF14\_0352, ribonucleoside-diphosphate reductase; PF14\_0425, Fructose-bisphosphate aldolase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PFF0435w, ornithine aminotransferase; PFF1300w, pyruvate kinase; PGK, phosphoglycerate kinase; PFL1720w, serine hydroxymethyltransferase; PFL1725w, ATP synthase subunit beta; PfPDI-8, protein disulfide isomerase; PF07\_0029, heat shock protein 90; PF08\_0054, heat shock 70; PF08\_0063, chaperone protein ClpB1; 1-cyspxn, 1-cys peroxiredoxin; PF11\_0055, thioredoxin, putative; TPx1, thioredoxin peroxidase 1; PFE1370w, Hsp70 interacting protein; PFL1070c, endoplasmic reticulum chaperone; PFL1545c, chaperonin cpn60; PF11\_0061, histone H4; PF11\_0062, histone H2B; PF14\_0177, DNA replication licensing factor MCM2; PFL0185c, nucleosome assembly protein 1; MAL7P1.119, rhoptry-associated leucine zipper-like protein 1; MAL7P1.228, heat shock protein 70x; ETRAMP10.2, early transcribed membrane protein 10.2; ERC, membrane-associated calcium-binding protein; PF11\_0175, heat shock protein 101, putative; PF11\_0506, antigen 332, DBL-like protein; MSP7, merozoite surface protein 7; Pf113, surface protein P113; PF14\_0344, translocon component PTEX150; PFA\_0620c, Glutamic acid-rich protein; emp3, erythrocyte membrane protein 3; PFB0100c, knob-associated histidine-rich protein; SERA-5, serine-repeat antigen protein; Sec31p, protein transport Sec31p; PFC0435w, parasite-infected erythrocyte surface protein; PFD1170c, *Plasmodium* exported protein (PHISTb); PFE1605w, lysine-rich membrane-associated PHISTb protein; MSP1, merozoite surface protein 1; REX1, ring-exported protein; PFL0050c, *Plasmodium* exported protein (PHISTb); PFL2060c, rab specific GDP dissociation inhibitor; PFL2505c, rhoptry neck protein 3; PF10\_0264, 40S ribosomal protein S2; PF10\_0272, 60S ribosomal protein L3; PF11\_0043, 60S ribosomal protein P1; PF11\_0065, 40S ribosomal protein S4; PF11\_0086, polyadenylate-binding protein-interacting protein 1; PF14\_0083, 40S ribosomal protein S8e; PF14\_0205, 40S ribosomal protein S25; PF14\_0448, 40S ribosomal protein S5; PF14\_0486, elongation factor 2; PFC0295c, 40S ribosomal protein S12; PFF0700c, 60S ribosomal protein L19; PFL0210c, eukaryotic initiation factor 5a. Different colours of the lines represent the types of evidence for association: green line, neighborhood evidence; red line, fusion evidence; purple line, experimental evidence; light blue line, database evidence; blue line, co-occurrence evidence; and yellow line, textmining evidence.

Previous studies have shown that the proteomes of each stage of the *Plasmodium* life cycle suggested that there is a highly coordinated expression of parasites genes involved in common processes. It has been described that in *P. falciparum*, functionally related genes are clustered (Florens *et al.*, 2002). Thus, proteins whose genes can be correlated in expression can provide additional information about the mechanism of action of rottlerin. Because of this, an analysis using STRING database to predict co-expression was carried out with the regulated proteins in proteomic analysis that were classified in the same biological process (see table 1). Proteins involved in metabolism process, response to stress and protein folding, and adhesion, adherence and PTEX showed co-expression predicts functional association between them (Fig. 8).



**Figure 8. Co-expression network of the rottlerin-modulated protein groups using STRING database.** PfPMT, phosphoethanolamine N-methyltransferase; PF10\_0121, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; PF10\_0155, enolase; PF10\_0289, adenosine deaminase; PF11\_0208, phosphoglycerate mutase; PF11\_0257, ethanolamine kinase, putative; PFLDH, L-lactate dehydrogenase; PF13\_0227, V-type proton ATPase subunit D, putative; PF14\_0352, ribonucleoside-diphosphate reductase; PF14\_0425, Fructose-bisphosphate aldolase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PFF0435w, ornithine aminotransferase; PFF1300w, pyruvate kinase; PGK, phosphoglycerate kinase; PFL1720w, serine hydroxymethyltransferase; PFL1725w, ATP synthase subunit beta; PFPDI-8, protein disulfide isomerase; PF07\_0029, heat shock protein 90; PF08\_0054, heat shock 70; PF08\_0063, chaperone protein ClpB1; 1-cyspxn, 1-cys peroxiredoxin; PF11\_0055, thioredoxin, putative; TPx1, thioredoxin peroxidase 1; PFE1370w, Hsp70 interacting protein; PFL1070c, endoplasmic reticulum protein; PFL1545c, chaperonin cpn60; MAL7P1.119, rho-try-associated leucine zipper-like protein 1; MAL7P1.228, heat shock protein 70x; ETRAMP10.2, early transcribed membrane protein 10.2; ERC, membrane-associated calcium-binding protein; PF11\_0175, heat shock protein 101, putative; PF11\_0506, antigen 332, DBL-like protein; MSP7, merozoite surface protein 7; Pf113, surface protein P113; PF14\_0344, translocon component PTEX150; PFA\_0620c, Glutamic acid-rich protein; emp3, erythrocyte membrane protein 3; PFB0100c, knob-associated histidine-rich protein; SERA-5, serine-repeat antigen protein; Sec31p, protein transport Sec31p; PFC0435w, parasite-infected erythrocyte surface protein; PFD1170c, Plasmodium exported protein (PHISTb); PFE1605w, lysine-rich membrane-associated PHISTb protein; MSP1, merozoite surface protein 1; REX1, ring-exported protein; PFL0050c, Plasmodium exported protein (PHISTb); PFL2060c, rab specific GDP dissociation inhibitor; PFL2505c, rho-try neck protein 3. In the triangle-matrices above, the intensity of colour indicates the level of confidence that two proteins are functionally associated, given the overall expression data in the organism.

### ***The phosphoproteome modulation induced by the rottlerin***

The phosphorylation of protein is the most common posttranslational modification that causes conformational changes and consequently alters protein functions. In order to understand better the effect of the rottlerin firstly described as a protein kinase inhibitor we performed a quantitative comparative study of the phosphorylation levels. The statistical analysis was performed on peptide level and the ratio between the treated and untreated parasites (C1h30 *versus* R1h30) was calculated. Phosphopeptides exhibiting a fold- change  $\geq 1.3$  or  $\leq 0.7$  were considered regulated. This analysis resulted in 53 phosphopeptides with significant difference of abundance between C1h30 and R1h30 that correspond to 39 phosphoproteins (Table 2). 36 phosphopeptides were less abundant in the presence of the protein kinase inhibitor rottlerin.

The processes affected most severely by deregulation of the phosphorylation of proteins by the rottlerin were related to DNA and RNA. Proteins involved in the chromatin structure, histone regulation, and replication were differently phosphorylated in the presence of the drug. Also, several proteins of transcription, RNA adenylation and mRNA splicing were phospho-modulated by the drug. Moreover, proteins of signalling pathways were phospho-modulated, calmodulin, a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit and two putative serine/threonine protein kinases predicted by BLASTP in the PlasmoDB. Phosphorylation event in histones has been associated with processes related to RNA and DNA as, chromatin condensation, DNA replication, mitosis, transcription activation, response to DNA damage and stress, and apoptosis (Guttery *et al.*, 2012).



**Table 2.** *Plasmodium falciparum* phosphoproteins with modulated abundance between untreated (C1h30) and rottlerin-treated (R1h30) parasites

Cell process / Functional group	Accession Number <sup>a</sup>	MappableProts / Phosphopeptide Sequence	Phosphosites	Peptide Fold Change
<i>related to DNA</i>				
Histone regulation	<b>PF3D7_0818200</b>	<b>14-3-3 protein</b>		
		237-DNLTLWTSDLQGDQT(+79.9663)EEKS(+79.9663)K-257	T252, S256	0.46
		237-DNLTLWT(+79.9663)SDLQGDQTEEKSK-257	T244	0.52
		237-DNLTLWTSDLQGDQT(+79.9663)EEK-257	T252	0.76
Histone acetylation	<b>PF3D7_0416400</b>	<b>Histone acetyltransferase</b>		
		471-EALIKNDADGNNS(+79.9663)GEENK-489	S484	0.65
Histone methylation	<b>PF3D7_1237200</b>	<b>Conserved Plasmodium protein (Probable variant-silencing SET domain-containing protein<sup>#</sup>)</b>		
		1203-SNIEEDES(+79.9663)NDENQIIQK-1220	S1211	0.54
Histone methylation	<b>PF3D7_1466800</b>	<b>Conserved Plasmodium protein (Probable histone-lysine N-methyltransferase 1<sup>#</sup>)</b>		
		57-YDEGREIFEGENT(+79.9663)DDDTKLSK-77	T69	0.69
Histone methylation	<b>PF3D7_1207000</b>	<b>Conserved Plasmodium protein (Probable histone-lysine N-methyltransferase 1<sup>#</sup>)</b>		
		146-IKDNDS(+79.9663)VIDS(+79.9663)DNHS(+79.9663)FNNLK-164	S151, S155 S159	1.48
Nucleosome organization	<b>PF3D7_0517400</b>	<b>FACT complex subunit SPT16</b>		
		1121-FAYKS(+79.9663)DEDDEGYNK-1134	S1125	0.77
Centrosome duplication	<b>PF3D7_1458500</b>	<b>Spindle assembly abnormal protein 4</b>		
		57-EIYS(+79.9663)NNS(+79.9663)ENVQGDNNDIHKK-76	S60, S63	0.61
Replication	<b>PF3D7_1317100</b>	<b>DNA replication licensing factor MCM4</b>		
		767-ENYYNDGDNDDDDDIS(+79.9663)NYLNDSNDAQNK-795	S782	0.44

Chromatin remodelling	<b>PF3D7_0624600</b>	767-ENYYNDGDNDDDDDISNYLNDS(+79.9663)NDAQNK-794 <b>SNF2 helicase</b>	S788	1.56
Pyrimidine <i>de novo</i> synthesis	<b>PF3D7_1308200</b>	1306-DDGDDILVS(+79.9663)KNDEDDDDDDNSVDAK-1331 <b>Carbamoyl phosphate synthetase</b>	S1314	1.34
		324-DLHNCNFS(+79.9663)NS(+79.9663)SDKNDSFFK-342	S331, S333	1.58
<b>Related to RNA</b>				
pre-mRNA splicing	<b>PF3D7_0822300</b>	<b>Small nuclear ribonucleoprotein G</b>		
		1-M(+15.9949)TLT(+79.9663)VGKAGPAS(+79.9663)DFRK-16	T4, S12	0.48
pre-mRNA alternative splicing	<b>PF3D7_1359400</b>	<b>CUGBP Elav-like family member 1</b>		
rRNA processing	<b>PF3D7_1434500</b>	26-NENTS(+79.9663)EVNDYSKEDIEGDENLK-47 <b>Dynein-related AAA-type ATPase</b>	S30	0.77
Adenylation	<b>PF3D7_0623100</b>	4626-TTILDS(+79.9663)FINMY(+144.1)KQINEKSK-4644 <b>Nuclear polyadenylated RNA-binding protein NAB2</b>	S4631	0.74
Adenylation	<b>PF3D7_1107300</b>	258-RISDS(+79.9663)ADEYNNSEK-271 <b>Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1</b>	S262	0.55
		2049-NLDNYT(+79.9663)Y(+79.9663)NEKVSDYSNEK-2066	T2054, Y2055	0.61
Adenylation	<b>PF3D7_1224300</b>	1064-REGYNS(+79.9663)EDNDNTAGNYYLK-1082 <b>Polyadenylate-binding protein 1</b>	S1069	0.70
Transcription	<b>PF3D7_1007700</b>	402-KDETAASDCADTPNILY(+79.9663)VGPHQSR-425 <b>AP2 domain transcription factor AP2-I</b>	Y418	0.71
Transcription	<b>PF3D7_0903400</b>	904-LLNS(+79.9663)DAGQDS(+79.9663)ENEFSPTK-921 <b>ATP-dependent RNA helicase DDX60</b>	S907, S913	0.76
		819-VLFDSS(+79.9663)S(+79.9663)EREDDEKGDGHEIVK-840	S823, S825	3.66
		819-VLFDSS(+79.9663)S(+79.9663)EREDDEKGDGHEIVK-840	S824, S825	2.01

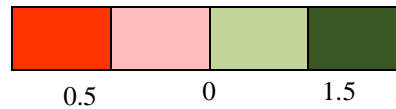
<b>Related to protein</b>				
Protein degradation	<b>PF3D7_1225800</b>	<b>Ubiquitin-activating enzyme E1</b> 13-TDESVKPIEFDKS(+79.9663)S(+79.9663)ESWKR-31	S25, S26	0.65
Protein degradation	<b>PF3D7_0808300</b>	<b>Ubiquitin regulatory protein</b> 30-SGLEVQNS(+79.9663)DDDFVQNLFK-47	S37	0.59
Translation	<b>PF3D7_0622800</b>	<b>Leucine--tRNA ligase</b> 1341-LPT(+79.9663)NYINLLVQNTY(+79.9663)VNNLPK-1360	T1343, Y1354	1.34
Translation	<b>PF3D7_1212700</b>	<b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A</b> 1348-KNDDEEAS(+79.9663)DGGDFTVFK-1364 1330-ENDELANGNEENENDEVKKNDDDEEAS(+79.9663)DGGDFTVFK-1364	S1355 S1355	0.63 1.39
Translation	<b>PF3D7_0517700</b>	<b>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</b> 4-VSDNELS(+79.9663)DKELVDFLS(+79.9663)EDS(+79.9663)DNGDENLLNK-32	S10, S19, S22	3.03
Translation	<b>PF3D7_1140200</b>	<b>Conserved Plasmodium protein (Probable eukaryotic translation initiation factor 5B<sup>#</sup>)</b> 113KIIES(+79.9663)EEET(+79.9663)NINSDEEEEEEEYQR-136 113-KIIES(+79.9663)EEETNINS(+79.9663)DDEEEEEEEYQRK-137 114-IIES(+79.9663)EEETNINS(+79.9663)DDEEEEEEEYQR-136	S117, T121 S117, S125 S117, S125	0.61 0.42 0.77
<b>Adherence and invasion</b>				
	<b>PF3D7_0202000</b>	<b>Knob-associated histidine-rich protein</b> 596-GASTT(+79.9663)AGSTTGAT(+79.9663)T(+79.9663)GANAVQSK-617	T600, T608, T609	0.62
	<b>PF3D7_1353100</b>	<b>Plasmodium exported protein</b> 121-SSSNHVES(+79.9663)NTFQNK-135	S129	0.68
	<b>PF3D7_0301700</b>	<b>Plasmodium exported protein</b> 142-VTVLEPQT(+79.9663)ENS(+79.9663)EDEENYEK-160	T149, S152	0.57
	<b>PF3D7_0532100</b>	<b>Early transcribed membrane protein 5</b>		

		145-NNVDDLDS(+79.9663)DVEEADVTEESAVETKK-169	S152	0.64
<b>Signalling pathways</b>				
Ca <sup>2+</sup> Signal transduction	<b>PF3D7_1434200</b>	<b>Calmodulin</b> 92-VFDRDGDGY(+79.9663)ISADELR-107	Y100	0.62
Protein phosphorylation	<b>PF3D7_1223100</b>	<b>cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit</b> 106-NILNDDGS(+79.9663)S(+79.9663)DGNDT(+79.9663)DVHSMFDRK-128 106-NILNDDGS(+79.9663)S(+79.9663)DGNDTDVHSM(+15.9949)FDRK-128 106-NILNDDGS(+79.9663)S(+79.9663)DGNDTDVHSMFDRK-128	S113, S114 T119 S113, S114 S113, S114	1.29 2.56 1.57
Protein phosphorylation	<b>PF3D7_1445700</b>	<b>Conserved Plasmodium protein (Probable serine/threonine-protein kinase clkA<sup>#</sup>)</b> 15-FSVFDS(+79.9663)DDNSEEEIENKDLNES(+79.9663)PKNEPDIVYEEK-48 15-FSVFDS(+79.9663)DDNS(+79.9663)EEEIENK-31 15-FSVFDS(+79.9663)DDNS(+79.9663)EEEIENKDLNES(+79.9663)PKNEPDIVYEEK-48	S20, S36 S20, S24 S20, S24, S36	1.69 1.79 1.34
Protein phosphorylation	<b>PF3D7_1468100</b>	<b>Conserved Plasmodium protein (Probable cyclin-dependent serine/threonine-protein kinase<sup>#</sup>)</b> 1428-NNNNNNENDS(+79.9663)NNEEKDNITGDHMK-1451 2496-ILENDEEEATDDNEEKNEEEKNDDNEEEEEY(+79.9663)ENNDNEK-2533 2429-NAQS(+79.9663)PNNDNDQNEVVGANER-2448	S1437 Y2526 S2432	0.64 1.42 0.47
<b>Other</b>				
Glycolysis	<b>PF3D7_1444800</b>	<b>Fructose-bisphosphate aldolase</b> 117-GLVNIPCT(+79.9663)DEEKSTQGLDGLAER-139	T124	0.64
Antioxidant	<b>PF3D7_0516400</b>	<b>Phosducin-like protein</b> 264-DNNSDNY(+79.9663)DDEDELNKK-279	Y270	0.60
protein import into nucleus	<b>PF3D7_0706000</b>	<b>Importin-7</b> 940-ESLENNDGADSICS(+79.9663)EY(+79.9663)DEDILSK-962	S953, Y955	1.68

*Unknown function*

<b>PF3D7_1465200</b>	<b>Conserved Plasmodium protein</b> 309-SYEVQDDS(+79.9663)DEDILTKDK-325	S316	0.72
<b>PF3D7_1304400</b>	<b>Conserved Plasmodium protein</b> 465-DEEDAEHTEDEEDFS(+79.9663)HIISNIR-486	S479	0.68
<b>PF3D7_1013600</b>	<b>Conserved Plasmodium protein</b> 885-IDLTDLS(+79.9663)CS(+79.9663)DKENEEER-901	S891, S893	0.78
<b>PF3D7_1441100</b>	<b>Conserved Plasmodium protein</b> 5-KNSNTVDS(+79.9663)S(+79.9663)ENVEEVVDNLTSEK-27	S12, S13	0.62

<sup>a</sup> PlasmoDB database. Up-regulated proteins in R1h30 are indicated in green and down-regulated proteins are indicated in red. The degree of differential expression is reflected by the intensity of the colour, with darker colours indicating a greater level of differential expression. # prediction from PlasmoDB by BLASTP.



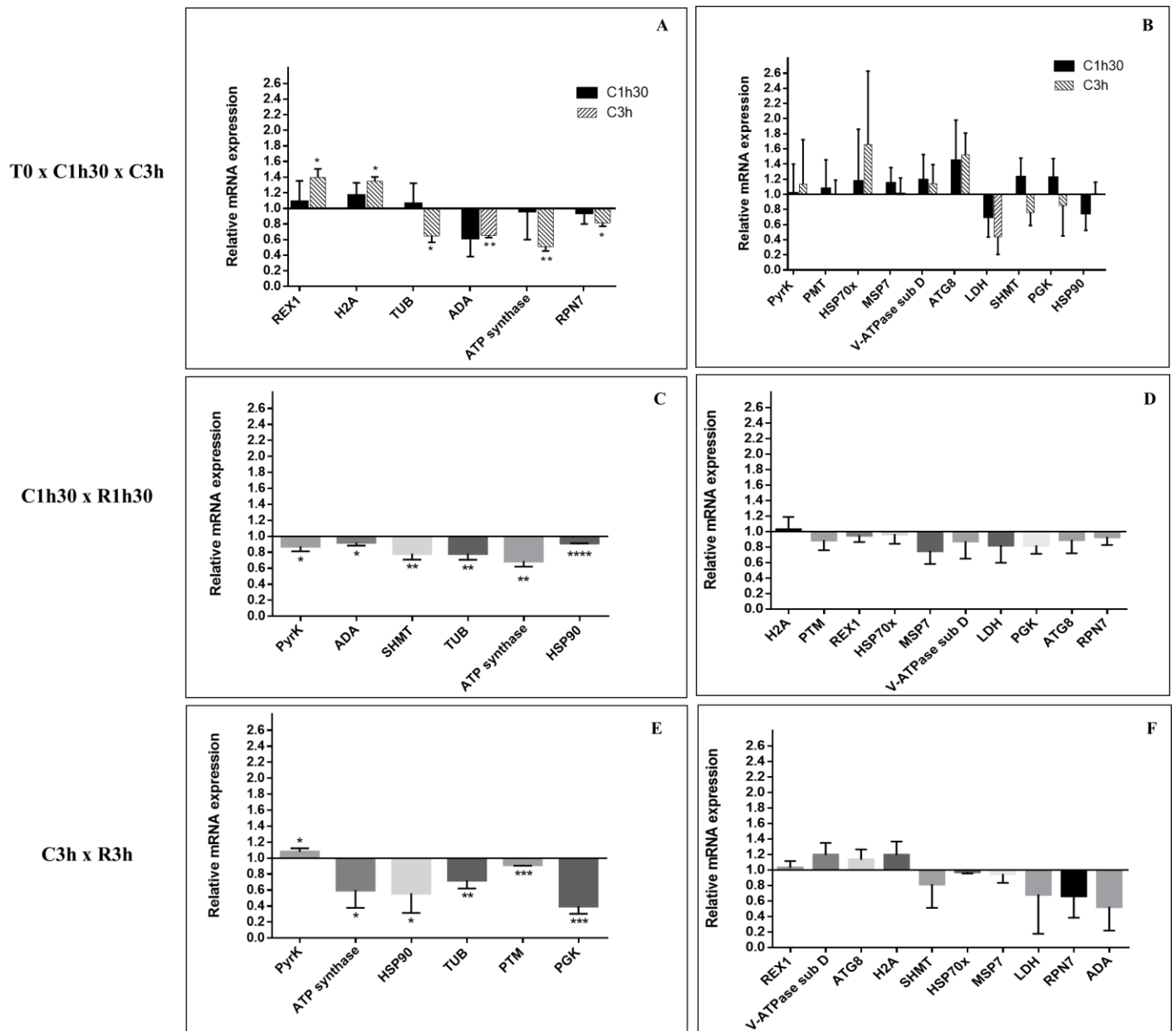
### ***Quantitative real-time RT-PCR***

In order to verify if rottlerin had can modulate on the transcriptome, a quantitative real-time RT-PCR was carried out with genes selected from proteome data. The transcriptional expression of target genes was compared in three independent analyses: i) at three time intervals of the schizogony (T0, C1h30 and C3h) for time-course of the untreated schizonts (T0 versus C1h30 versus C3h); ii) at 1h30 and iii) at 3h between treated and untreated schizonts for time-dependant pairwise quantitative and comparative analysis (C1h30 versus R1h30 and C3h versus R3h). For each analysis, 3 biological replicates were performed. The mRNA expression level of target genes (Fig. 9) was determined under control conditions (T0, C1h30, and C3h) *versus* the geometric mean of the transcription levels of the selected reference genes.

Based on the relative expression levels, three different expression profiles were found: i) transcripts that showed no significant difference in expression level ( $p > 0.05$ ) (Fig 9B, D and F); ii) transcripts that showed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in expression level (Fig 9A, C and E on the left panel; and table S5); iii) transcripts that showed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in expression level (Fig 9A, C and E on the right panel).

The time-course analysis (shown as the fold-change in gene expression *versus* control at time T0) showed 4 down-regulated (ADA, TUB, ATP synthase, and RPN7) and 2 up-regulated (REX1 and Histone H2A) transcripts in C3h (Fig. 9A-B).

While the analysis for treatment with rottlerin at 1h30 (shown as the fold-change in gene expression *versus* control at time C1h30) (Fig. 9C-D) revealed 6 down-regulated transcripts (PyrK, ADA, SHMT, TUB, ATP synthase, and HSP90). However, these transcripts did not present a strong modulation except ATP synthase that presented ~31% of variation. Three of them showed a slight but significant change (ADA, HSP90 and PyrK showed ~7%, 8.5% and 12.5% respectively).



**Figure 9. Relative mRNA expression levels of *Plasmodium falciparum* targets genes.** Relative mRNA expression of target genes between all the 3 time points T0, C1h30 and C3h: changed expression (A) and unchanged expression (B). Relative mRNA expression of target genes between C1h30 *versus* R1h30: changed expression (C) and unchanged expression (D). Relative mRNA expression of target genes between C3h *versus* R3h: changed expression (E) and unchanged expression (F). Normalization against RGs. Error bars correspond to the standard deviation, including three technical replicates for three independent biological samples. An asterisk indicates a significant difference *versus* control population (T0 – A and B; C1h30 – C and D; C3h – E and F): \*;  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

Finally, for analysis of 3h treatment with rottlerin (shown as the fold-change in gene expression *versus* control at time C3h) (Fig. 9E-F), it was found 5 and 1 transcripts down-regulated and up-regulated respectively. Of these, 2 transcripts showed slight modulation (PyrK and PTM: ~8%), but the 3 transcripts showed a strong up-regulation under rottlerin treatment (PGK, ATP synthase and HSP90 with ~66%, 55% and 44% respectively).

## DISCUSSION

With the conclusion of the genome of *P. falciparum*, together with the advances in mass spectrometry, the proteomic analysis has been an useful tool to understand the molecular mechanisms involved in the *Plasmodium* development, as well as to interpret the mechanism(s) of action of many canonical antimalarials and their drug targets (Nirmalan *et al.*, 2004; Makanga *et al.*, 2005).

### ***Rottlerin induced autophagy-like cell death***

In the current study, we showed that sub-toxic concentrations of rottlerin for host cells are able to kill *P. falciparum* specifically and dose-dependently during the merozoite morphogenesis by both transmission electron microscopy and flow cytometry. The ultrastructural analysis of *P. falciparum* schizonts showed that cell death-induced by rottlerin did not display the classical apoptotic features chromatin condensation and nuclear fragmentation (Galluzzi *et al.*, 2009). Neither a necrotic morphology, such as an increase of cell volume, organellar swelling, proteins precipitation and nucleus dissolution were not observed. However, schizont death induced by rottlerin showed structures similar to the autophagic process previously described in several protozoan parasites treated with drugs, such as a cytoplasmatic vacuolization in *P. falciparum* (Totino, Daniel-Ribeiro, Corte-Real e De Fátima Ferreira-Da-Cruz, 2008) and *Leishmania donovani* parasites (Bera *et al.*, 2003); and autophagosome-like structure in *Trypanosoma brucei* (Brennand *et al.*, 2011), *T. cruzi* and *P. berghei* (Duszenko *et al.*, 2011).

According to recent studies describing the autophagy-inducing effect of rottlerin in mammalian cells (Torricelli *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Hasima e Ozpolat, 2014; Song *et al.*, 2018) and our results, rottlerin could induce autophagy also in *P. falciparum*. In mammalian cells, rottlerin induced autophagy is described mediated by mTORC1 inhibition (Kumar *et al.*, 2013; 2014; Torricelli *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2018). Since a clear TOR homolog for *P. falciparum* has not yet been characterized (Latré De Laté *et al.*, 2017), rottlerin should induce



autophagy in malaria parasites through another mechanism. Totino *et al.* also showed that *P. falciparum* parasites under chloroquine, SNAP or staurosporine pressures died by a process similar to autophagy (Totino *et al.*, 2008). Thus, Totino *et al.* and our results corroborate the idea that drugs could trigger autophagic pathway in *P. falciparum* described to be non-canonical (Cervantes *et al.*, 2014; Navale *et al.*, 2014). Hence, the autophagic pathway can be an interesting target for the development of new antimalarial drugs.

### **Rottlerin affects *P. falciparum* proteome and phosphoproteome**

Several *Plasmodium* proteomic studies after exposure to anti-malarial drugs have generally revealed a low number of modulated proteins (Jha *et al.*, 2016). Herein, a relatively higher number of modulated proteins were observed in just 90 min of rottlerin-treatment time than the already published studies. In a semiquantitative analysis by 2-DE gel study, treatments with artemether for 5 h and lumefantrine for 8 h were associated with a modulation of 51 and 43 proteins spots, respectively (Makanga *et al.*, 2005). From a gel-based proteome study, quinine, mefloquine and, diosgenone for 3h treatment modulated just 4, 8, and 3 proteins, respectively (Segura *et al.*, 2014). In a stable isotope labelling experiment, artemisinin and chloroquine treatments for 12 h, 46 and 55 proteins were regulated, respectively (Prieto *et al.*, 2008). About doxycycline treatment using 2D-DIGE and iTRAQ-based approach after 12h of treatment, Briolant *et al.* showed that 32 and 40 proteins had deregulated expression levels (Briolant *et al.*, 2010). Finally, a global quantitative proteomic analysis, the treatment of 12h with Purvalanol-B showed only 10 modulated proteins (Bullard *et al.*, 2015).

*Energy metabolism* - After rottlerin treatment, the abundance of glycolysis proteins increased substantially, as observed in studies of antimalarial effects (Makanga *et al.*, 2005; Segura *et al.*, 2014). Nonetheless, the unique rottlerin phospho-regulated glycolytic enzyme was the fructose-bisphosphate aldolase that presented one phosphopeptide down regulated. The increase of the energy production by the treated parasite through glycolysis and lactate fermentation might represent a non-specific parasite response to rottlerin treatment, because the parasite has the capacity to change the metabolism in order to adapt to different stress conditions, including those imposed by drugs (Makanga *et al.*, 2005; Briolant *et al.*, 2010; Torrentino-Madamet *et al.*, 2011; Jha *et al.*, 2016).

Since, *Plasmodium* may arrest its erythrocytic cell cycle to stimulate gametogenesis after detection of a chemical stress, (Deutsch *et al.*, 2007), the upregulation of gamete antigen 27/25, an early gametocyte development marker could be related (Young *et al.*, 2005).

In the other hand, some modulated metabolic enzymes might represent a specific response of parasites to rottlerin, such as mitochondrial ATP synthase complex. Although erythrocyte stages of malarial parasites mainly rely on glycolysis to produce energy with little contribution by mitochondria, the appropriate functioning and unique features of parasite mitochondrial metabolism are critical for its survival and growth. Thus, the mitochondria proteins are attractive targets for antimalarial drugs (Sturm *et al.*, 2015).

Interestingly, rottlerin has already been directly or indirectly related to the uncoupling of mitochondrial respiration from oxidative phosphorylation (Soltoff, 2001). In MCF-7 cells, the ability of rottlerin to induce autophagy is an independent effect of its action as the mitochondrial uncoupler indicating that autophagy is not triggered by the Rottlerin mitochondria targeting (Torricelli *et al.*, 2015).

Concerning the V-type proton ATPase subunit D localized in parasite plasma membrane and digestive vacuole membrane in the iRBC, V-ATPase is a principal route for ATP-dependent proton efflux and pH regulation (Saliba e Kirk, 1999; Marchesini *et al.*, 2005). Treatment of *Plasmodium* with specific inhibitors of V-type H<sup>+</sup> ATPase, bafilomycin A<sub>1</sub> and derivatives (Van Schalkwyk *et al.*, 2010), concanamycin A (Auparakkitanon e Wilairat, 2006), and triaminopyrimidine (described as a specific inhibitor of subunit D) (Hameed P *et al.*, 2015) resulted in rapid parasite death.

*Response to Stress and protein synthesis* - Our findings show that the rottlerin treatment of schizonts is accompanied by an increased abundance of stress and folding proteins. Differential expression of heat shock proteins is a characteristic stress-response of the parasites to the drug effects (Makanga *et al.*, 2005; Natalang *et al.*, 2008; Segura *et al.*, 2014). The Hsp70, Hsp90 and Hsp60 have been found upregulated in the parasite under treatment with artemether (Makanga *et al.*, 2005; Natalang *et al.*, 2008) and lumefantrine (Makanga *et al.*, 2005). But also, differences in the expression of these proteins are required to permit the parasite to adapt to environmental changes (Shonhai e Blatch, 2014). The Hsp90 family represents the most abundant chaperones of stress constitutively expressed in the cytoplasm and plays a key role in the protein folding and thus the functioning of a large number of proteins, especially those involved in cell cycle regulation and signal transduction (Ramdhave *et al.*, 2013; Shahinas *et al.*, 2013). Davenport *et al.* described the rottlerin as a potential Hsp90 inhibitor and that rottlerin caused a concentration-dependent increase in the expression of Hsp70 in breast cancer cells, similar to geldanamycin, an inhibitor of Hsp90 cytosolic (Davenport *et al.*, 2014). So, the authors proposed that rottlerin interact with the ATP binding site in Hsp90's N-terminal

domain. Additionally, the inhibition of Hsp90 in *Leishmania* parasites by geldanamycin induced Hsp synthesis (Wiesgigl e Clos, 2001). In fact, the Geldanamycin application on *P. falciparum* culture led to inhibition of intraerythrocytic progression and induces HSP synthesis (Banumathy *et al.*, 2003).

Concerning the endoplasmic reticulum, its expression is induced by the presence of misfolded proteins which transport from the ER is blocked (Kumar *et al.*, 1988). Study with an inhibitor of this protein suggested that endoplasmic reticulum has a role in the maturation of kinases and other signal transduction proteins (Frey *et al.*, 2007). Moreover, geldanamycin inhibitor of Hsp90 and similar compounds can also bind to the ATPase domain of endoplasmic reticulum (Shonhai e Blatch, 2014).

Increased expression of chaperones reflects an increase in protein folding activity that may be associated with the increased abundance of several ribosomal proteins in rottlerin treated schizonts, that is, related to the cellular necessity to keep proteins in the correct state. Additionally, Kim *et al.* showed that Hsp90 regulates the function of ribosome by maintaining the stability of 40S and 60S ribosomal subunit components (Kim *et al.*, 2006). Thus, our results of global quantitative proteomic analysis suggest that *P. falciparum* attempts to increase the number of stress related proteins after rottlerin exposure along with same protein synthesis machinery, showing that the parasite strives to combat stress. However, the increased expression of the protein involved in response to stress and protein folding might represent another non-specific common feature of parasite response to drug treatment.

*Rottlerin promotes the chromatin disorganisation and replication arrest* - The decrease in PfMCM2 abundance, the phospho-regulation of PfMCM4 along with increased in histone H2B, histone H4 and histone H2B variant and the increase of peptide phosphorylation of several proteins involved in chromatin and nucleosome organization reveal that rottlerin promotes chromatin disorganization and blocks the replication corresponding to the abnormal condensation of the DAPI-labelled DNA observed by IFA (data not shown) and the difficulty to perform the nuclear division for the rottlerin-treated schizonts observed by TEM (Fig. 2).

Rottlerin blocks histone H3 phosphorylation in UL3 cells (Burkhart *et al.*, 2007) and that histone phosphorylation has been associated with chromatin condensation in plants (Rybaczek e Maszewski, 2007) and in *P. falciparum* (Guttery *et al.*, 2012). Pf14-3-3 protein that binds and reads histone H3 Phosphorylation (Dastidar *et al.*, 2013) is also found as phospho-deregulated by rottlerin. Moreover, histone chaperones promote chromatin assembly, disassembly and histone exchange to facilitate DNA replication, repair and transcription (Das

*et al.*, 2010). PfHsp90 suggested to chaperone several proteins involved in chromatin remodelling in the parasite (Pavithra *et al.*, 2007), was up regulated in rottlerin pressure, maybe in an effort to reverse the chromatin damage caused by drugs.

Additionally, the PfMCM complex composed by MCM2 to MCM7 subunits, has a replicative helicase function (Patterson *et al.*, 2006). The PfMCM2 subunit that has its peak of expression in the nucleus during DNA replication in *Plasmodium* late schizont was drastically down-regulated in rottlerin treatment (Ansari e Tuteja, 2012). The MCM subunits are phosphorylated and there is a correlation between the phosphorylation status and the subcellular localization of the MCM complex (Patterson *et al.*, 2006). In rottlerin treatment, MCM4 was phospho-modulated differently than in the control condition. Finally, Groth *et al.* showed MCM complex promote histone acetylation leaving the chromatin in a more relaxed structure (Groth *et al.*, 2007).

Our data suggested key insight into the rottlerin effect on transient phosphorylation and abundance of proteins involved in histone modelling, acetylation and methylation and consequently in the control of nuclear processes during schizogony.

*Rottlerin inhibits the export machinery and consequently decreases the abundance of exported proteins* - The main and most common symptoms of malaria disease occur due to the erythrocyte cycle when the parasite invades RBC. However, the RBCs are not a metabolically active cell hence to survive and multiply within this unfavourable host cell, the parasite exports hundreds of its proteins (5–7% of proteome) in order to changes the structural and biochemical properties of RBC (Siau *et al.*, 2016; Gilson *et al.*, 2017) and ensure its own survival and virulence, through modulation of host cell rigidity and permeability and cytoadherence (Peng *et al.*, 2015). Many of these proteins are involved in invasion, proliferation, defense, and cell communication, which are paramount for pathogenesis (Sam-Yellowe, 2009).

The protein export machine complex, the *Plasmodium* PTEX, mediates this essential and extensive protein export. As an essential nexus for protein export in the malaria parasite, PTEX is a prime drug target. As expected, peak expression of these antigens coincides with the maturation of merozoites and development of several apical organelles, including rhoptries, micronemes, and dense granules (De Koning-Ward *et al.*, 2009). The PTEX is a complex of 5-component proteins locating at PVM. Among them, a heat shock protein 101 (PfHsp101) is a ClpB-like AAA+ ATPase component, whose function is to unfold the proteins assisted by the thioredoxin-2 (PfTRX2), a protein that reduces disulfide bonds to facilitate export. An export protein 2 (PfEXP2), which forms the channel in PVM through where the unfolded protein going

through (Elsworth *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2015). Another protein, PTEX 150, seems to directly associate with EXP2, Hsp101 and an unknown protein called PTEX88, possibly it has a structural role (Elsworth *et al.*, 2016). Studies suggest that PfEXP2, PfHsp101 and PTEX150 are part of the core PTEX complex and, PTEX88 and PfTRX2 likely have an accessory role. The PTEX150 and PfHsp101 are more expressed in late schizonts (De Koning-Ward *et al.*, 2009).

It was been described that the surface protein P113 (Pf113) and PfHsp70-x were consistently associated with PTEX. The Pf113 was also found in PV (Elsworth *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). The PfHsp70-x seems to act in the protein folding that passing through PVM (Zhang *et al.*, 2017). Furthermore, it has already been shown that downregulation of PTEX150, or inactivation of PfHsp101 decrease the export of PfHsp70x (Rhiel *et al.*, 2016).

Parasites deficient in PTEX150 or HSP101 have a significant decrease in trafficking of all classes of exported proteins (Beck *et al.*, 2014) and a knockdown of PTEX components decreased the rate of repression (Elsworth *et al.*, 2014). In the TRX2 knockout, it was also observed a reduced grow-rate and the parasite had a decrease in virulence (Matthews *et al.*, 2013). Consistent with these results, our findings revealed the decrease of important PTEX components leading to a large decrease in exported proteins.

Among the exported proteins that were found downregulated in parasite treated with rottlerin, there are proteins involved in invasion, such as MSP7, RALP1 and MSP1. This this effect may explain the incapability of the parasite to reinvade new RBC

It was also observed that the downregulation of proteins involved in Maurer's cleft architecture and RBC remodelling. The ring exported protein 1 (REX1) is a peripheral membrane protein required for Maurer's cleft architecture these organelles (Maier *et al.*, 2009). Poly-Helical Interspersed Sub-Telomeric (PHIST) proteins are encoded by a large multi-gene family which is divided into three sub-families (PHISTa, b, c) based on species distribution (Oberli *et al.*, 2014; Tarr *et al.*, 2014). Some PHISTb proteins are localized in RBC periphery, and have been associated with the protein trafficking, membrane rigidity, erythrocyte membrane, knobs and the erythrocyte cytoskeleton (Oberli *et al.*, 2014; Tarr *et al.*, 2014).

In the global proteomics of *P. falciparum* life-cycle stages, it has been shown that proteins that belong to the same functional classification are more expressed in particular stage (Florens *et al.*, 2002; Lasonder *et al.*, 2002; Pease *et al.*, 2013). The more abundant proteins enriched in a schizont stage are mainly proteins involved in adherence and invasion (Lasonder *et al.*, 2002; Pease *et al.*, 2013) and these proteins are usually exported. This biological process

is essential to the parasite and is probably a specific rottlerin effect leading to parasite death at this specific stage.

### **Rottlerin does not affect transcriptionally the genes corresponding to the subset of modulated proteins**

There is a peculiar feature about gene expression in *P. falciparum* concerns the relationship between mRNA levels and the levels of the proteins that encoded by through the life cycle. Several studies have shown the non-correlation between mRNA levels and protein levels. Pease et colleagues (Pease *et al.*, 2013) demonstrated that about 57% of timing peak mRNA expression do not coincide with maximal protein abundance in a study of the three stages of the erythrocyte cycle.

The results obtained by the RT-qPCR analysis for the chosen genes were compared with data from microarray experiments, using equivalent time points (Bozdech *et al.*, 2003; Llinás *et al.*, 2006); PlasmoDB, <http://www.plasmodb.org>). PyrK, SHMT, PTM, TUB, REX1, ATP synthase, V-ATPase subunit D, HSP90, ATG8 are all closely similar for this particular set of genes. ADA and RPN7 had a similar profile with DD2 strain, but not HB3 and 3D7 strains. HSP70x did not present a significant difference but has a clear tendency to increase with time, similar to what is described in the literature. LDH had a similar profile with DD2 and 3D7 strains, but not HB3. PGK had a similar profile to 3D7 strain. H2A had a similar profile with HB3 strain, but not DD2 and 3D7 strains. And MSP7 had no similarities to the profile described.

Nirmalan and colleagues (Nirmalan *et al.*, 2004) demonstrated that LDH displayed an increase in protein abundance in the schizont stage, but with a decrease in its corresponding mRNA. Our results showed the same profile of LDH. The authors concluded that in general, there are clear differences between the accumulation of a protein and that of its mRNAs.

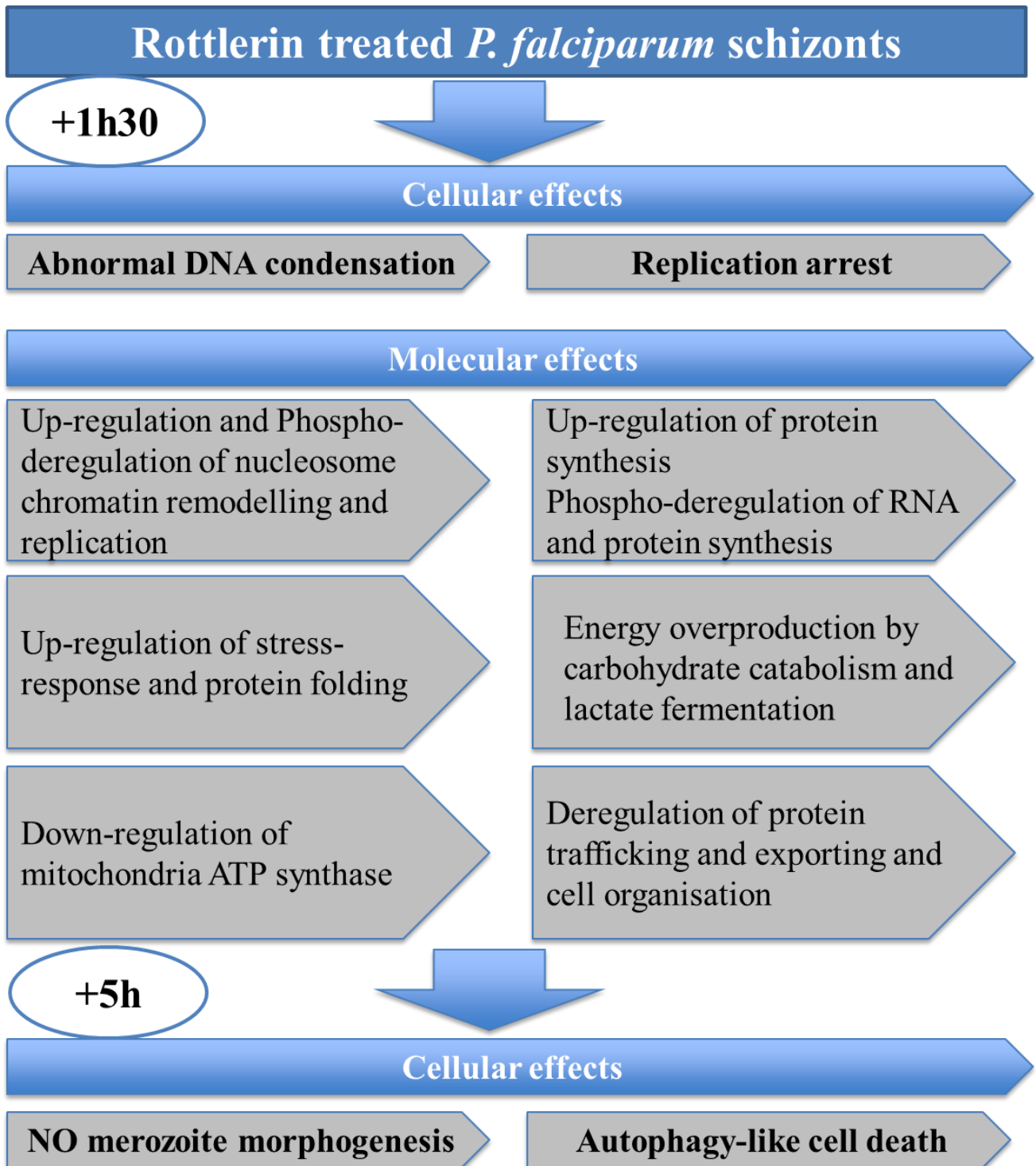
A recent study showed that the levels of several hundred mRNAs are anti-correlated with their corresponding protein products in yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Cheng *et al.*, 2018). Thus, it is not trivial to compare the mRNA and protein levels. Moreover, previous studies of transcriptional profiling of *P. falciparum* exposed to a drug have revealed very low transcriptional responses, basically attributed to generalized stress responses and little about a specific response (Gunasekera *et al.*, 2007; Ganesan *et al.*, 2008; Siwo *et al.*, 2015).

For example, treatment of the parasite with a lethal antifolate (WR99210) for up to 24 h did not induce a mRNA regulation of the principal drug target dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS, and in the folate pathway. The authors also observed that when the parasite was in the process of drug-induced cell death, there were no consistent

increases in mRNA for any of the genes in the *P. falciparum* genome (Ganesan *et al.*, 2008). A study on the effects of Chloroquine showed that, although approximately 600 genes were modulated, alterations in the specific pathway could not be discerned. These results lead to the hypothesis that principal parasite response to CQ does not occur at the transcriptional level or RNA stability. Doxycycline caused a strong down-regulation in apicoplast mRNA, but without effect in the mitochondrion, the primary action of the drug (Dahl *et al.*, 2006).

Overall, it appears that *Plasmodium* is not able to respond specifically to antimalarial drugs at transcriptional level. It should be considered that *Plasmodium*, as an obligate intracellular parasite, has evolved in an environment of controlled conditions, which favours its survival and may lead to poor selection pressure for maintaining the genes involved in transcriptional regulation after exposure to stress (Gunasekera *et al.*, 2007).

This overview illustrated by the Fig. 10, could explain the sequential *P. falciparum* cellular and molecular processes in response to the drug during the schizogony and consequently the autophagy-like cell death.



**Figure 10.** Schematic representation of the proposed relation between the phenotypic effects of the rottlerin and the proteome and phosphoproteome alterations in the *Plasmodium falciparum* schizont.



## CONCLUSION

In conclusion, the rottlerin induces the cell death of iRBC occurring just at schizont stage, during the merozoite differentiation in few hours. We observed first two main phenotypic defects, abnormal DNA condensation and nuclear division arrest following by an intracellular disorganisation and the birth of typical structures of autophagy-like death, with intracellular vacuolization and vesicles formed by several membranes inside the preserved parasitophorous vacuole membrane (PVM) and RBC membrane.

These cellular modifications induced by the drug were accompanied by important abundance protein variation and phosphorylation modulation without relevant transcriptional modifications.

Functional proteome analysis of the changes due to the rottlerin during the first 1h30 suggests:

i) Abnormal DNA condensation and arrest of replication could be related to the chromatin disorganisation with the up-regulation of histones and replication factor and the phospho-modulation of proteins involved in chromatin regulation and replication factor. The position of the nucleosome at gene promoters is fundamental for the regulation of gene expression. Nucleosome organization is altered in accord to the phases of the cell cycle. Regularly spaced nucleosome arrays being established in mitosis. Moreover, eukaryotic promoter regions are characterized by many factors, including DNA sequence elements, post-translational modifications (PTMs) of histones, the presence of chromatin remodelling factors (Nocetti e Whitehouse, 2016). Consequently, several processes related to DNA are damaged, as transcription, replication, recombination, and repair. It could explain that the arrest of replication, and the deregulation of abundance of proteins involved in transcription and translation in rottlerin-treated *P. falciparum* schizonts.

ii) Increase of the carbohydrate metabolism in order to overproduce energy with up-regulation of several enzymes of the glycolytic pathway; but there is a down-regulation of subunits of the mitochondrial and vacuolar proton and ATP synthase complex. Mitochondria are involved in energy production and conservation, and they have an uncoupling mechanism to produce heat instead of ATP. Also, mitochondria are involved in programmed cell death. Recently, evidences suggest a powerful mitochondrial influence on autophagy in mammalian cells because many autophagic regulators localize in mitochondria, which are integrated several signalling networks and may participate to modulate these pathways (as reviewed in (Rambold e Lippincott-Schwartz, 2011)). Since rottlerin decreased the abundance of mitochondrial ATP

synthase and after triggered the formation of autophagosome structures, without identified canonical autophagy markers. It could be that cells were defective in mitochondria homeostasis and went into an autophagy process induced by DNA damage.

iii) An altered redox homeostasis, mainly up-regulation of stress-response, possibly altered protein turnover, and up-expression of protein folding and protein synthesis with global abundance increase of chaperones, ribosomal proteins and phospho-modulation of proteins involved in transcription and protein synthesis.

iv) Deregulation of intracellular trafficking and organisation and inhibition of the export machinery and decrease of exported proteins, including expression changes of chaperones, transporters, remodelling the erythrocyte, apical complex proteins to turn impossible for the parasite to perform the merozoite morphogenesis.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by FAPDF [193.000.987-2015; 193.001.723/2017], INCT-CNPq-FAPEG [465771/2014-9], CNPq [430610/2016-5], CAPES-COFECUB program, CAPES (fellowship to TC), and FINEP [CT-Infra 2011]. We thank the Fundação Hemocentro de Brasília for the provision of human blood and plasma. We thank Pr. Wagner Fontes, Dr. Rayner M. L. Queiroz, Dr. Jaques M. F. Souza, Marlon D. M. Santos and Pr. Paulo Carvalho for the assistance with some aspects of this study.

**SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES**

**Supplementary Table S1.** Antiplasmodial activity of rottlerin.

Molecule	Antiplasmodial activity ( $\mu\text{M}$ )			
	$[^3\text{H}]$ -hypoxanthine incorporation assay (strain K1)		SYBR Green I-based fluorescence assay (strain 3D7)	
	IC <sub>50</sub> $\pm$ SD	IC <sub>90</sub> $\pm$ SD	IC <sub>50</sub>	IC <sub>90</sub>
Rottlerin	1.17 $\pm$ 0.17	2.09 $\pm$ 0.21	0.336	0.574
Chloroquine	0.023 $\pm$ 0.009	0.047 $\pm$ 0.012	0.009	0.012

Values of IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> are represented by means of three replicates  $\pm$  SDs. The Chloroquine-resistant *P. falciparum* strain: K1; The Chloroquine-sensitive *P. falciparum* strain: 3D7. SDs: Standard deviations; IC<sub>50</sub>: Concentration inhibiting 50% of parasite growth; IC<sub>90</sub>: Concentration inhibiting 90% of parasite growth.

***[<sup>3</sup>H]- hypoxanthine incorporation assay (strain K1)***- For the [<sup>3</sup>H] hypoxanthine incorporation assay, *in vitro* rottlerin susceptibility was measured as described by (Desjardins *et al.*, 1979; Guillon *et al.*, 2004). The results were expressed as the means determined from three independent experiments. Stock solution of chloroquine (CQ) was prepared in purified water (milli-Q grade) at 10 mM and was used as antimalarial drug control. ***SYBR Green I - based fluorescence assay (strain 3D7)*** - For the fluorescence assay, from a concentration of 20  $\mu\text{M}$ , rottlerin were serially diluted with culture medium RPMI-1640 and added to the parasite culture (1% parasitaemia and 2% haematocrit) in 96 well plates. Similarly, positive (chloroquine) control was diluted from a starting concentration of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The highest concentration of DMSO (negative control) to which the parasites were exposed was 0.4%, which was shown to have no measurable effect on parasite viability. The plates were incubated at 37 °C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. Then, the plates were frozen at -80 °C for 12h. After this period, 100  $\mu\text{L}$  of SYBR Green I (Invitrogen) prepared at 0.2  $\mu\text{L}$  in one mL of lysis buffer (20 mM Tris at pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.008% (wt/vol) saponin, and (0.08% (vol/vol) Triton X-100) was added to each well; the plates were incubated at 37 °C for 1h before reading. The fluorescence value was measured in Spectramax M5 device, with excitation and emission wavelength bands at 497 and 520 nm (515 nm cut-off), respectively. The drug concentration that causes 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) was determined by analysis of dose-response curve of mean value (Smilkstein *et al.*, 2004; Bagavan *et al.*, 2011).

**Supplementary Table S2.** Primer sequences for qRT-PCR analysis

Gene	Description	PlasmoDB Accession	Primer sequences	Amplicon length (bp)	qPCR Efficiencies
CAM	Calmodulin	PF3D7_1434200	GATACAGATGGGAACGGAACG TGACATGCCTTAGTTCATCTGC	160	103.04%
MyoA	Myosin A	PF3D7_1342600	CTCCATGGTGTAACAAGAGC CAAGAAGTGGATTTGCAGCC	163	100.94%
TSP	Transportin	PF3D7_0627700	AGTGCTGTACTTACGCTTGG ACACACCAACACGATATACTCC	140	100.25%
ADA	Adenosine deaminase	PF3D7_1029600	TACTTTGTACAGGTGATGGTGG TATGCTTACATCTTCTCCAGCG	200	107.01%
ATSP	ATP synthase subunit beta mitochondrial	PF3D7_1235700	GAAGTCTCGGCTTTGTTAGG CATCAGCTGGTACATATACGG	148	103.26%
HSP70x	Heat shock protein 70	PF3D7_0831700	GCAGAAGAATCAGAGGTTGC TTTTCTGGATTCTGGAGGC	197	100.80%
PyrK	Pyruvate kinase	PF3D7_0626800	TAGAATCCATGACCAAGAACCC GGACATAATGGTAACAGCTTCC	146	104.90%
REX1	Ring-exported protein 1	PF3D7_0935900	GCCAACTCGAAACTTCTCTG GTATGGAGCACCCGATTTTG	210	99.64%
SHMT	Serine hydroxymethyltransferase	PF3D7_1235600	ATTCGTATAGGTACCCCAGC TTGCCATTGAACAACCTTCC	202	105.94%
r60s	60S ribosomal subunit protein L18	PF3D7_1341300	ACTGCTGAGAAACACTTTGG TGACTTTCTTCTTCTCTTGC	111	90.9%
18s	18S ribosomal RNA	PF3D7_1148600	GCTGACTACGTCCCTGCCC ACAATTCATCATATCTTTCAATCGGTA	70	91.7%
stRNA	Seryl tRNA synthetase	PF3D7_0717700	AAGGTTACCACTCAAATACGC CTAATATCCTTTCCATGTGCC	75	94%
ACT	Actin I	PF3D7_1246200	AAAGAAGCAGCAGGAATCCA TTGATGGTGCAAGGGTTGTA	173	86.6%
TUB	Tubulin beta chain	PF3D7_1008700	AGGTGTAACCTGTTTCGTTAAG GAGCAAACCCGATCATAAAG	113	89%
RPN7	26S proteasome regulatory subunit RPN7	PF3D7_1129200	AGAAATACTTAGAACAAGCCCG GCTGCGTCTATCAATATTTTCG	142	91.2%
ATG8	Autophagy-related protein 8	PF3D7_1019900	CATCGCTTAAAGACGAAGTATC AGTCTCTCACATACTACAGG	101	89.4%

LDH	L-lactate dehydrogenase	PF3D7_1324900	GTTGGCTCAGGTATGATTGG TCCATGTGGCATGTTCTTTAC	102	99.9%
PGK	Phosphoglycerate kinase	PF3D7_0922500	AGCTATCACCATTGTTGGAG TGAAAGTGCTAATACACCTGG	148	88.8%
HSP90	Heat shock protein 90	PF3D7_0708400	GTACAAAGATCACCGAATTACTCC GTTTTCCCTTCATTCTGTCTACG	95	89.4%
MSP7	Merozoite surface protein 7	PF3D7_1335100	CGCAGTAGAAAATGAACAAGAAG TTTGAAATGTCGATTCTCCTCC	210	101.03%
PMT	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	PF3D7_1343000	ATATCATCCGGAGGTTTGGGAAG TATACCGTGAGTATGTGCTCC	147	100.22%
V-ATPase	V-type proton atpase subunit D putative	PF3D7_1341900	AAGTGGGTGAGGAAATGAGG CCTAACACATCAACAGTTGGG	193	94.77%
H2A	Histone H2A	PF3D7_0617800	GCACCTGTATACTTAGCAGC AGCTAATTGTATGTGCCTTGG	120	91.4%

**Supplementary Table S3. *Plasmodium falciparum* and human erythrocyte proteins identified.** Mass spectrometer output files (Raw data), peptide and protein identification files (xls files), the reference protein sequence database will be deposited in a public repository.

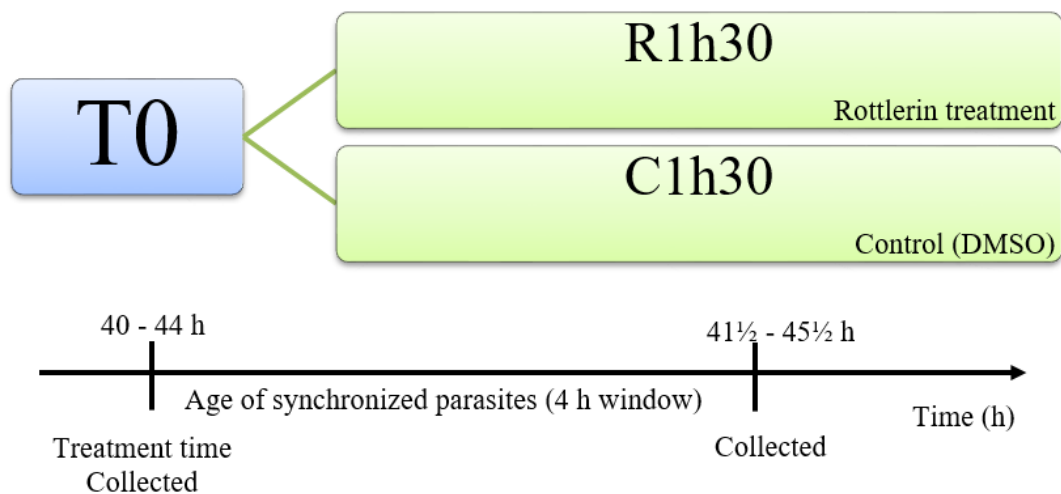
**Supplementary Table S4. *Plasmodium falciparum* phosphopeptides and phosphoproteins identified.** Mass spectrometer output files (Raw data), annotated spectra of *bona fide* phosphopeptide identifications files (xls files) and the reference protein sequence database, and will be deposited in a public repository.

**Supplementary Table S5.** Relative fold- change of mRNA of the genes with statistical difference obtained by qRT-PCR for each group

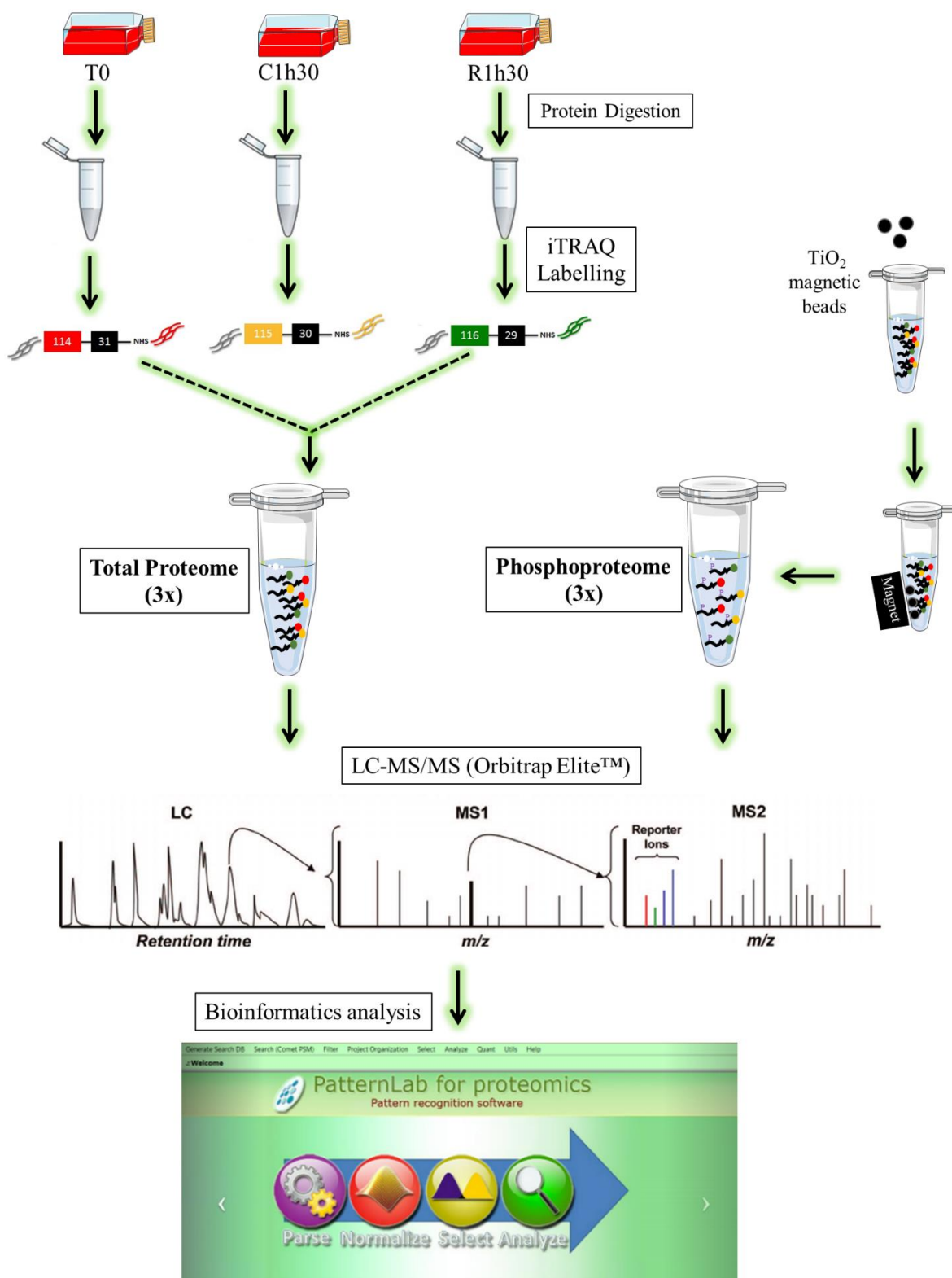
Gene	Fold-change	Percentage	Statistical difference
<b>T0 versus C3h</b>			
ADA	0.65±0.03	- 34.5%	**
TUB	0.64±0.08	- 35.5%	*
REX1	1.40±0.11	+ 39.6%	*
ATP synthase	0.50±0.05	- 49.1%	**
H2A	1.35±0.06	+ 34.8%	*
RPN7	0.81±0.04	- 18.6%	*
<b>C1h30 versus R1h30</b>			
PyrK	0.87±0.06	- 12.5%	*
ADA	0.92±0.04	- 7%	*
SHMT	0.78±0.07	- 21.7%	*
TUB	0.78±0.07	- 21.7%	**
ATP synthase	0.69±0.07	- 31.1%	**
HSP90	0.91±0.002	- 8.5%	****
<b>C3h versus R3h</b>			
PyrK	1.08±0.04	+7.8%	*
ATP synthase	0.45±0.13	- 55.1%	*
HSP90	0.56±0.25	- 43.8%	*
TUB	0.724±0.10	- 27.6%	**
PTM	0.92±0.01	- 8.2%	***
PGK	0.34±0.09	- 66.1%	***

Data was normalized using the most stable RGs for each group. Values are reported as fold-change mean ± SD of three biological replicates; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

## Supplementary figures

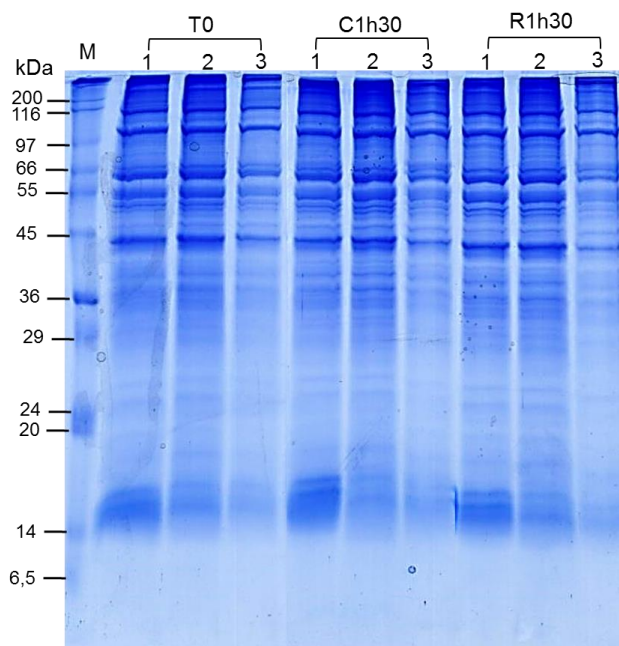


**Figure S1. Schematic representation of treatment with rottlerin or DMSO from cultures of *Plasmodium falciparum* strain S20 synchronized.** A synchronized population containing schizonts in a window 40-44 post- invasion, at this time,  $\frac{1}{3}$  was collected (T0), and  $\frac{2}{3}$  was divided in two: treated and non-treated parasites. Rottlerin at a concentration of 1  $\mu$ M or an equivalent volume of DMSO was added at time T0.

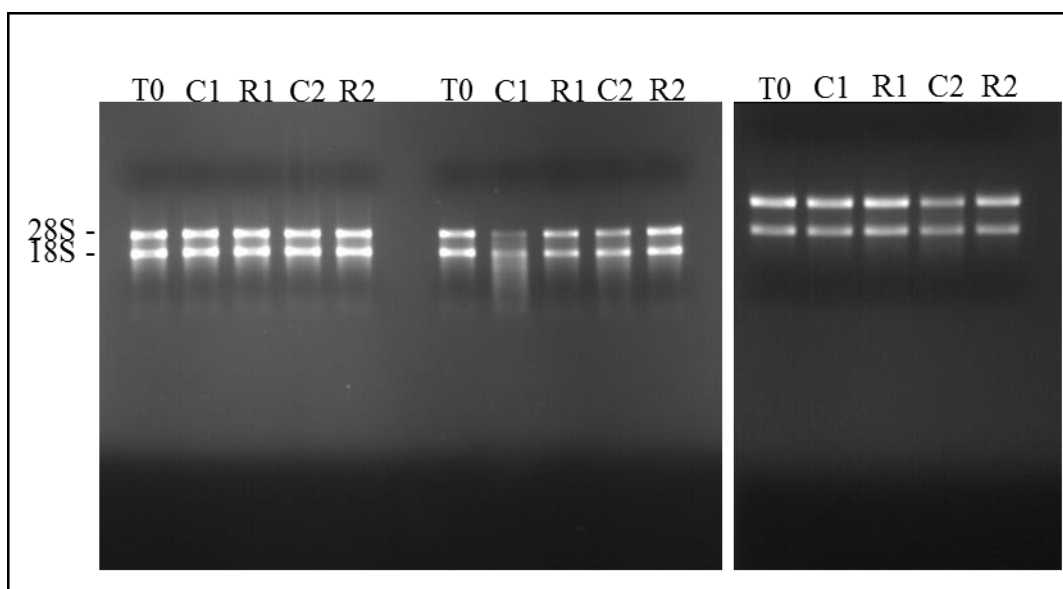


**Figure S2. Workflow of global proteomics analysis of Rottlerin effects on *Plasmodium falciparum* schizont.** Samples were collected and the treatments were stopped by rapid resuspension of the culture in a 0.15% saponin solution. Parasite lysates were resuspended in 8M urea supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail and were flash-frozen 2× to begin protein release. Each sample were labelled with iTRAQ and analysed in biological triplicate, with 3 technical repetitions each, using a Dionex Ultimante™ 3000 RSLC nano system (Thermo Fisher Scientific) coupled online with an LTQ-Orbitrap Elite™ mass spectrometer (Thermo Scientific).

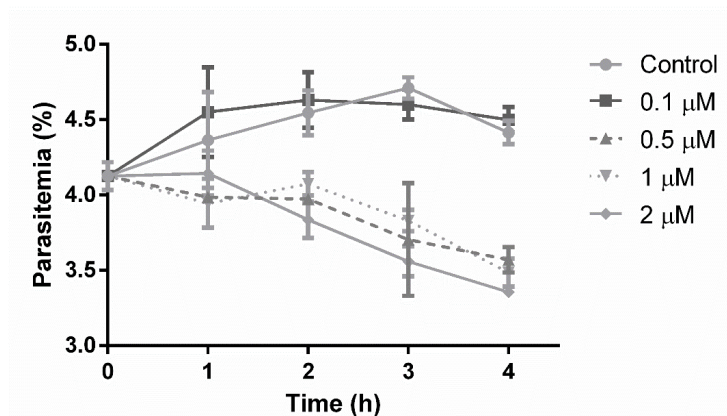




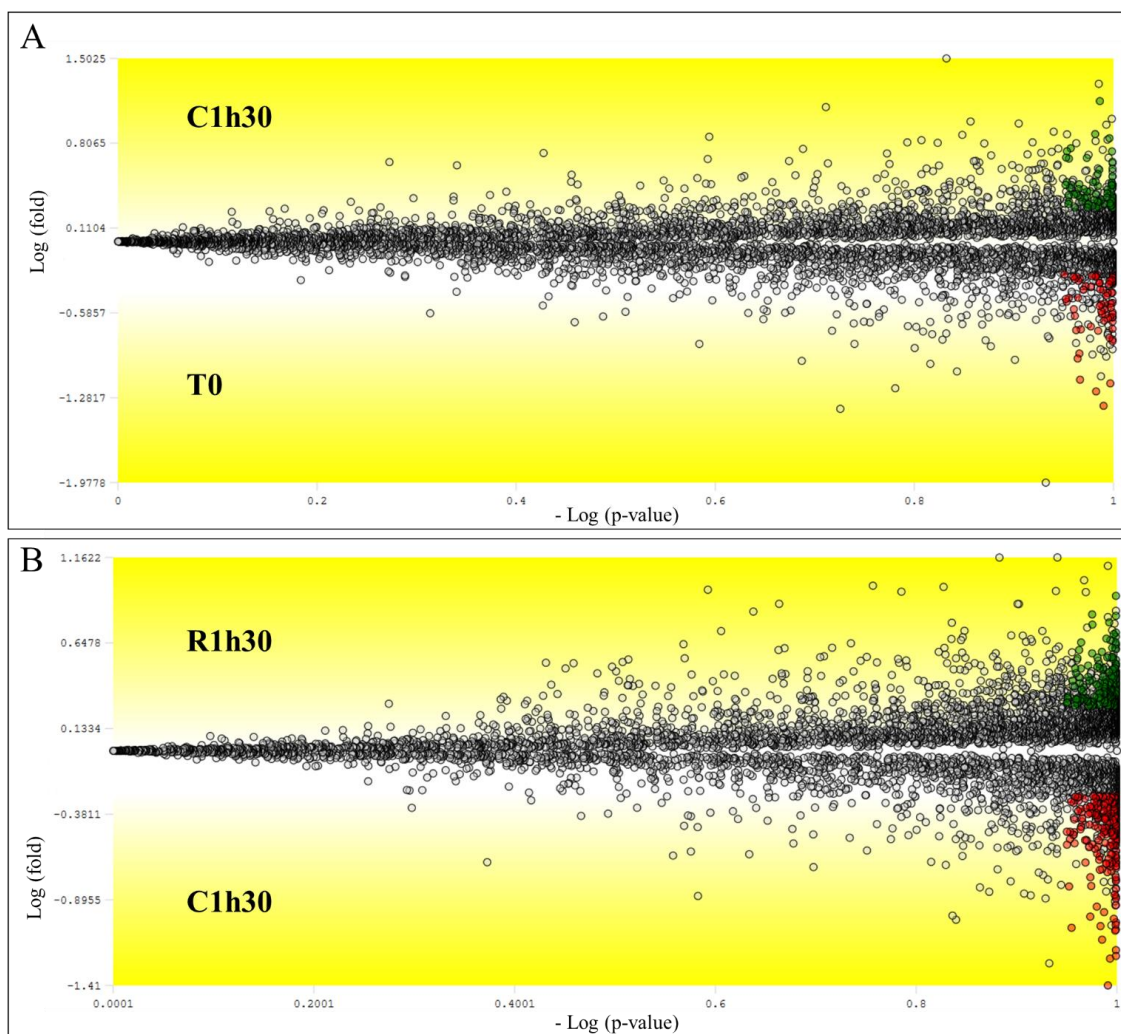
**Figure S3. Electrophoretic profile of *Plasmodium falciparum* schizont proteins.** The proteins from T0 and C1h30 and R1h30 were separated by 12% SDS-PAGE run on a SE 600 Electrophoresis Unit (Hofer) and visualized by Coomassie blue staining. Lanes named 1-3 represent biological replicates.



**Figure S4. Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from *Plasmodium falciparum* schizont.** T0, time 0; C1, untreated parasite 1h30; R1, treated-parasite 1h30; C2, untreated parasite 3h; R2, treated-parasite 3h.

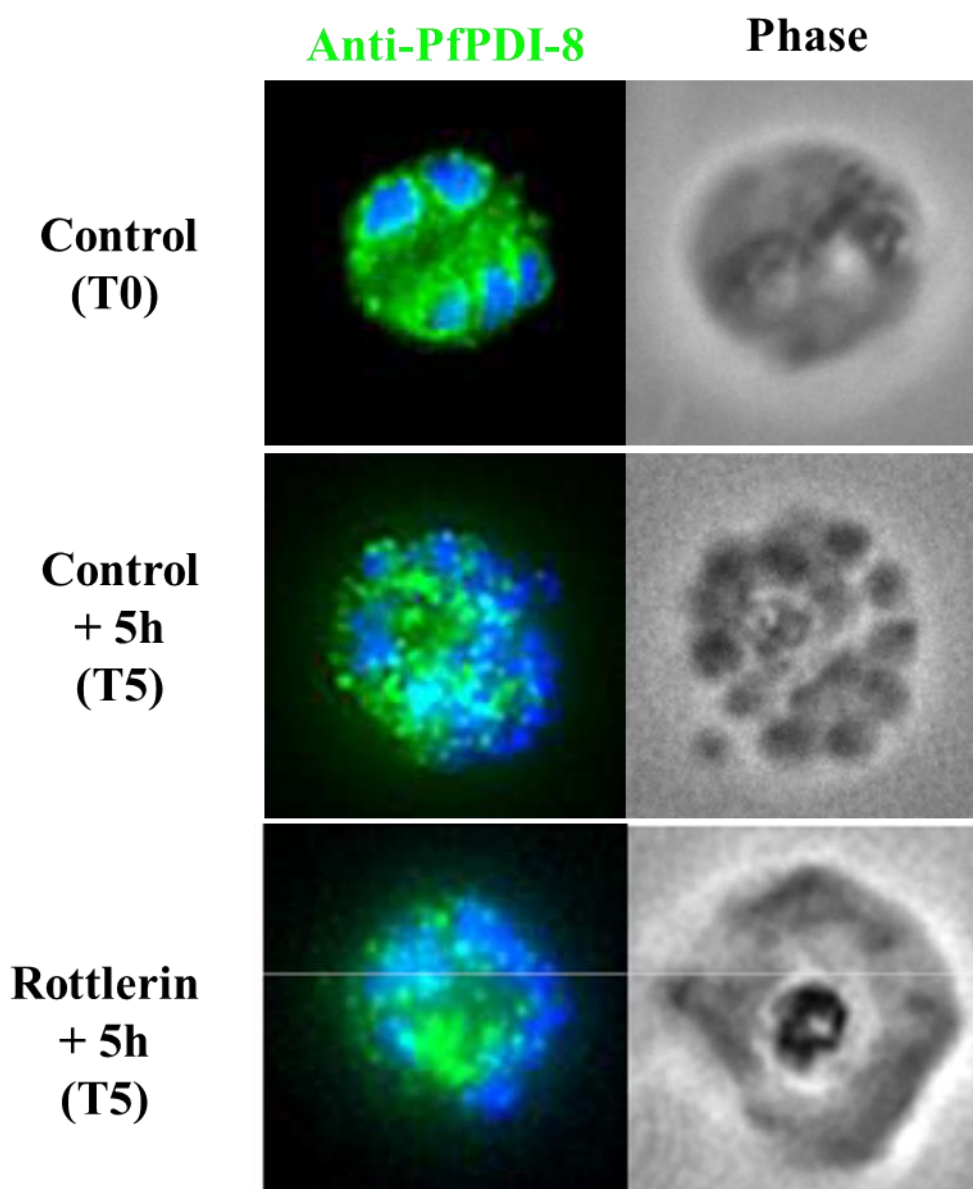


**Figure S5. Evaluation of rottlerin effect on *Plasmodium falciparum* schizogony by flow cytometry using YOYO-1 staining.** The results demonstrated that rottlerin inhibited schizogony in a dose-dependent manner. Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean of two independent experiments. T0: 36-40 hpi, T1: 40-44 hpi, T2: 44-48 hpi and T3: 48 hpi and re-invasion.



**Figure S6. Volcano plot of differentially regulated peptides between control and rottlerin-treated parasites.** Analysis of the peptide distribution observed between control parasite populations (A) and the treated and untreated- parasite (B). Each dot represents a peptide that has been mapped as a point on the graph according to its log fold change (y-axis) and its significance value (x-axis). Peptides colored in green or red are those that satisfied cutoff criteria for fold-change and p- value and gray dots represent

the peptides that did not pass through the statistical filters. (A) Volcano plot of the condition C1h30 versus T0, the green dots show the peptides that are most abundant in the C1h30, while the red dots represent peptides that are more abundant in the T0 condition. (B) Volcano plot of the condition R1h30 versus C1h30, the green dots show peptides that are most abundant in the C1h30 and the red dots represent peptides that are more abundant in the R1h30 condition.



**Figure S7. Immunofluorescence assay of *Plasmodium falciparum* using the anti-PfPDI-8 on rottlerin-treated and control parasites by confocal microscopy.** T0; control, untreated- parasite and rottlerin- treated parasite 5 h after T0. PfPDI-8 localisation is shown on the green channel. Bar in panel represents 1  $\mu\text{m}$ .

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS**

Este trabalho descreveu as alterações morfológicas e proteômicas resultantes da aplicação da rottlerina em esquizontes de *P. falciparum*.

A rottlerina (uma molécula de origem natural) foi objeto da primeira publicação de síntese em 1948, de acordo com PubMed (Backhouse e Mcgookin, 1948), e foi descrita inicialmente como inibidor de serina/treonina proteína cinase PKC em 1994, principalmente PKC $\delta$  (Gschwendt et al., 1994). A rottlerina foi usada na medicina tradicional indiana como um anti-helmíntico e um antagonista de fertilização (Hong et al., 2015). Mais de 1000 artigos sobre esta molécula foram publicados desde 2000 (PubMed). Hoje, uma variedade de propriedades biológicas tem sido atribuída a essa molécula, tais como: citotóxica, antioxidante, anti-úlceras, antitumoral, anti-crescimento celular, indutor de autofagia, indutor de apoptose e desacoplador da fosforilação oxidativa. Aos poucos, seu papel como inibidor específico de PKC $\delta$  tem sido questionado.

Nessa tese, dá-se a continuidade ao estudo dos efeitos da rottlerina sobre o ciclo eritrocítico de *P. falciparum* que leva a morte celular do parasito. Os resultados combinados indicam que a rottlerina é letal para o parasita em doses sub-tóxicas para células humanas, incluindo os eritrócitos. A lise do parasito induzida pela droga acontece especificamente na forma esquizonte, em que ocorre a divisão nuclear seguido da diferenciação dos merozoítos. Os efeitos celulares observados corroboraram com os achados das análises proteômicas e fosfoproteômicas. No entanto, não se observou uma modulação em nível transcricional pela droga.

O parasito, após 1h30 de tratamento com a rottlerina, apresentou um fenótipo claro de parada da divisão nuclear acoplado a um alongamento do DNA. De fato, houve uma diminuição da abundância das proteínas envolvidas na formação dos nucleossomos e da cromatina e na replicação acompanhada por uma importante desregulação da fosforilação de proteínas que regula a formação dessas estruturas ligadas ao DNA e a fatores da replicação.

Em contrapartida, observou-se um aumento na abundância de proteínas envolvidas na via glicolítica e na fermentação láctica, para produção de energia. Houve o aumento, também, de proteínas relacionadas a resposta ao estresse e *folding* de proteínas, concomitantemente com uma desregulação da fosforilação de proteínas da síntese de proteínas e transcritos, que indicam uma tentativa de resposta do parasito contra a droga, ainda que inespecífica.

No entanto, as proteínas ATP sintase mitocondrial e V-ATPase tiveram uma diminuição da abundância relativa após 1h30 de tratamento com a droga. As mitocôndrias estão envolvidas na produção e conservação de energia e têm um mecanismo de desacoplamento para produzir

calor em vez de ATP. Já foi descrito, em outros organismos, que a rottlerina tem um efeito como um desacoplador da mitocôndria e redutor dos níveis de ATP causando, assim, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o superóxido e o peróxido de hidrogênio. Por isso, pretendemos confirmar o disfuncionamento da mitocôndria e medir produção de ROS, como perspectiva a curto prazo.

A produção de ROS induziria, supostamente, a liberação de radicais livres, ocasionando a oxidação de biomoléculas e danificando componentes celulares, isto poderia justificar o aumento da expressão de proteínas chaperonas, de *folding* de proteínas e antioxidantes.

Além disso, as mitocôndrias estão envolvidas na morte celular programada. Já que a rottlerina diminuiu a abundância da ATP sintase mitocondrial e depois desencadeou a formação de estruturas autofagossômicas, sem a modulação de proteínas-marcadoras canônicas de autofagia. Uma possível explicação para este fenômeno é que os parasitos apresentassem defeitos na homeostase mitocondrial e entrassem em um processo de autofagia induzido por danos no DNA. Também, já foi demonstrado que a bafilomicina A1, que tem um efeito de inibição da fusão do autofagossomo com o lisossomos, não aumenta a expressão da PfATG8 (proteína que participa da formação de membranas autofagomáticas), apenas causa um deslocamento desta proteína do apicoplasto para o citoplasma do parasito (Cervantes *et al.*, 2014).

O parasito tratado apresentou, ainda, uma modulação da expressão de proteínas do tráfico intracelular com uma diminuição drástica da maquinaria de exportação (PTEX) e, conseqüentemente, das proteínas exportadas. Estas proteínas são importantes para a formação de novas organelas, para adesão e para a modificação da estrutura da membrana eritrocítica. Conseqüentemente, após de 5 h de tratamento, o parasito apresentou a formação de estruturas de autofagia, ao invés do brotamento dos merozoítos com organelas típicas do complexo apical. Embora a morte do tipo autofagia observada possui, provavelmente, causas multifatoriais. De maneira geral, a rottlerina têm se mostrado uma ferramenta interessante para estudar a diferenciação dos merozoítos.

## **6. REFERÊNCIAS**

- ALY, N. S. et al. Proteome analysis of new antimalarial endoperoxide against *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Res**, v. 100, n. 5, p. 1119-24, Apr 2007. ISSN 0932-0113.
- ANSARI, A.; TUTEJA, R. Genome wide comparative comprehensive analysis of *Plasmodium falciparum* MCM family with human host. **Commun Integr Biol**, v. 5, n. 6, p. 607-15, Nov 2012. ISSN 1942-0889.
- ARNOT, D. E.; GULL, K. The *Plasmodium* cell-cycle: facts and questions. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 92, n. 4, p. 361-5, Jun 1998. ISSN 0003-4983.
- ARNOT, D. E.; RONANDER, E.; BENGTSSON, D. C. The progression of the intra-erythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* and the role of the centriolar plaques in asynchronous mitotic division during schizogony. **Int J Parasitol**, v. 41, n. 1, p. 71-80, Jan 2011. ISSN 1879-0135.
- AUPARAKKITANON, S.; WILAIRAT, P. Antimalarial activity of concanamycin A alone and in combination with pyronaridine. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 37, n. 4, p. 619-21, Jul 2006. ISSN 0125-1562.
- BACKHOUSE, T.; MCGOOKIN, A. Rottlerin; the synthesis of tetrahydrorottlerin and of tetrahydroallorottlerin and the reversibility of the rottlerinone change. **J Chem Soc**, v. 2, p. 113-5, Feb 1948. ISSN 0368-1769.
- BAGAVAN, A. et al. Antiplasmodial activity of botanical extracts against *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Res**, v. 108, n. 5, p. 1099-109, May 2011. ISSN 1432-1955.
- BALGI, A. D. et al. Screen for chemical modulators of autophagy reveals novel therapeutic inhibitors of mTORC1 signaling. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7124, 2009. ISSN 1932-6203.
- BANNISTER, L.; MITCHELL, G. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 5, p. 209-13, May 2003.
- BANNISTER, L. H. et al. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitol Today**, v. 16, n. 10, p. 427-33, Oct 2000a. ISSN 0169-4758.
- \_\_\_\_\_. Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. **Parasitology**, v. 121 ( Pt 3), p. 273-87, Sep 2000b. ISSN 0031-1820.
- BANUMATHY, G. et al. Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 18336-45, May 2003. ISSN 0021-9258.
- BATISTA, R.; DE JESUS SILVA JÚNIOR, A.; DE OLIVEIRA, A. B. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytochemicals. Part II. Non-alkaloidal natural products. **Molecules**, v. 14, n. 8, p. 3037-3072, 2009.
- BECK, J. R. et al. PTEX component HSP101 mediates export of diverse malaria effectors into host erythrocytes. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 592-5, Jul 2014. ISSN 1476-4687.



- BEI, A. K. et al. A flow cytometry-based assay for measuring invasion of red blood cells by *Plasmodium falciparum*. **Am J Hematol**, v. 85, n. 4, p. 234-7, Apr 2010. ISSN 1096-8652.
- BERA, A. et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Mol Biochem Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 23-35, Mar 2003. ISSN 0166-6851.
- BIAMONTE, M. A.; WANNER, J.; LE ROCH, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 23, n. 10, p. 2829-43, May 2013. ISSN 1464-3405.
- BIRKHOLTZ, L. et al. Exploring functional genomics for drug target and therapeutics discovery in Plasmodia. **Acta Trop**, v. 105, n. 2, p. 113-23, Feb 2008. ISSN 0001-706X.
- BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 117, n. 1, p. 11-25, Sep 2001. ISSN 0166-6851.
- BLOLAND, P. B. et al. **Drug resistance in malaria**. World Health Organization Geneva, 2001.
- BOZDECH, Z. et al. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. **PLoS Biol**, v. 1, n. 1, p. E5, Oct 2003. ISSN 1545-7885.
- BRASIL. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. 2005
- \_\_\_\_\_. **Guia para profissionais de saúde sobre prevenção da malária em viajantes**: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão - Ministério da Saúde: 24 p. 2008.
- \_\_\_\_\_. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**: Ministério da Saúde Brasília 2010.
- \_\_\_\_\_. **Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011** Secretaria de Vigilância em Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 44: 16 p. 2013.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**, v. 5, n. 10, p. e1038-e1046, 10 2017. ISSN 2214-109X.
- BRENNAND, A. et al. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. **Mol Biochem Parasitol**, v. 177, n. 2, p. 83-99, Jun 2011. ISSN 1872-9428.
- BRIOLANT, S. et al. *Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment. **Malar J**, v. 9, p. 141, 2010. ISSN 1475-2875.
- BULLARD, K. M.; BROCCARDO, C.; KEENAN, S. M. Effects of cyclin-dependent kinase inhibitor Purvalanol B application on protein expression and developmental progression in intra-erythrocytic *Plasmodium falciparum* parasites. **Malar J**, v. 14, p. 147, Apr 2015. ISSN 1475-2875.
- BURKHART, B. A.; KENNETT, S. B.; ARCHER, T. K. Osmotic stress-dependent repression is mediated by histone H3 phosphorylation and chromatin structure. **J Biol Chem**, v. 282, n. 7, p. 4400-7, Feb 2007. ISSN 0021-9258.

- CALVO, E. et al. Expression of housekeeping genes during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Res**, v. 88, n. 3, p. 267-71, Mar 2002. ISSN 0932-0113.
- CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nat Protoc**, v. 11, n. 1, p. 102-17, Jan 2016. ISSN 1750-2799.
- \_\_\_\_\_. YADA: a tool for taking the most out of high-resolution spectra. **Bioinformatics**, v. 25, n. 20, p. 2734-6, Oct 2009. ISSN 1367-4811.
- CERVANTES, S. et al. The multifunctional autophagy pathway in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Autophagy**, v. 10, n. 1, p. 80-92, Jan 2014. ISSN 1554-8635.
- CHARNEAU, S. O. **Abordagens moleculares dos mecanismos envolvidos ao final da esquizogonia intraeritrocitária de *Plasmodium falciparum* (agente da Malária) por Híbridação substrativa supressiva e DNA *micro-array***. 2005. (Doutorado). Biologia Molecular e Celular dos Protozoários, Museu Nacional de História Natural de Paris
- CHENG, Z. et al. Pervasive, Coordinated Protein-Level Changes Driven by Transcript Isoform Switching during Meiosis. **Cell**, v. 172, n. 5, p. 910-923.e16, Feb 2018. ISSN 1097-4172.
- COHEN, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. **Trends Biochem Sci**, v. 17, n. 10, p. 408-13, Oct 1992. ISSN 0968-0004.
- COOPER, R. A.; CARUCCI, D. J. Proteomic approaches to studying drug targets and resistance in Plasmodium. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 4, n. 1, p. 41-51, Mar 2004. ISSN 1568-0053.
- COWMAN, A. F. et al. Malaria: biology and disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610-624, 2016. ISSN 0092-8674.
- DAHL, E. L. et al. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3124-31, Sep 2006. ISSN 0066-4804.
- DAS, C.; TYLER, J. K.; CHURCHILL, M. E. The histone shuffle: histone chaperones in an energetic dance. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 9, p. 476-89, Sep 2010. ISSN 0968-0004.
- DASTIDAR, E. G. et al. Comprehensive histone phosphorylation analysis and identification of Pf14-3-3 protein as a histone H3 phosphorylation reader in malaria parasites. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53179, 2013. ISSN 1932-6203.
- DAVENPORT, J. et al. High-throughput screen of natural product libraries for hsp90 inhibitors. **Biology (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 101-38, Feb 2014. ISSN 2079-7737.
- DE KONING-WARD, T. F. et al. A newly discovered protein export machine in malaria parasites. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 945-9, Jun 2009. ISSN 1476-4687.
- DEITSCH, K. et al. Mechanisms of gene regulation in Plasmodium. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 201-208, 2007. ISSN 0002-9637.

- DELVES, M. et al. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. **PLoS Med**, v. 9, n. 2, p. e1001169, Feb 2012. ISSN 1549-1676.
- DESJARDINS, R. E. et al. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 16, n. 6, p. 710-718, 1979. ISSN 0066-4804.
- DUSZENKO, M. et al. Autophagy in protists. **Autophagy**, v. 7, n. 2, p. 127-58, Feb 2011. ISSN 1554-8635.
- EL BAKKOURI, M. et al. The Clp chaperones and proteases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J Mol Biol**, v. 404, n. 3, p. 456-77, Dec 2010. ISSN 1089-8638.
- ELSWORTH, B. et al. PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 587-91, Jul 2014. ISSN 1476-4687.
- \_\_\_\_\_. Proteomic analysis reveals novel proteins associated with the *Plasmodium* protein exporter PTEX and a loss of complex stability upon truncation of the core PTEX component, PTEX150. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 11, p. 1551-1569, Nov 2016. ISSN 1462-5822.
- FIDOCK, D. A. et al. Mutations in the *P. falciparum* Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance. **Molecular cell**, v. 6, n. 4, p. 861-871, 2000. ISSN 1097-2765.
- FLORENS, L. et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 520-6, Oct 2002. ISSN 0028-0836.
- FLORENT, I.; CHARNEAU, S.; GRELLIER, P. *Plasmodium falciparum* genes differentially expressed during merozoite morphogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 135, n. 1, p. 143-8, May 2004. ISSN 0166-6851.
- FRANÇA, T. C.; SANTOS, M. G. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.
- FREY, S. et al. The ATPase cycle of the endoplasmic chaperone Grp94. **J Biol Chem**, v. 282, n. 49, p. 35612-20, Dec 2007. ISSN 0021-9258.
- GALLUZZI, L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 8, p. 1093-107, Aug 2009. ISSN 1476-5403.
- GANESAN, K. et al. A genetically hard-wired metabolic transcriptome in *Plasmodium falciparum* fails to mount protective responses to lethal antifolates. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 11, p. e1000214, Nov 2008. ISSN 1553-7374.
- GILL, J. et al. Structure, localization and histone binding properties of nuclear-associated nucleosome assembly protein from *Plasmodium falciparum*. **Malar J**, v. 9, p. 90, Apr 2010. ISSN 1475-2875.

- GILSON, P. R. et al. Host cell remodelling in malaria parasites: a new pool of potential drug targets. **Int J Parasitol**, v. 47, n. 2-3, p. 119-127, 02 2017. ISSN 1879-0135.
- GOMES, A. P. et al. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011. ISSN 0103-507X.
- GROTH, A. et al. Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1928-31, Dec 2007. ISSN 1095-9203.
- GSCHWENDT, M. et al. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 199, n. 1, p. 93-8, Feb 1994. ISSN 0006-291X.
- GUERIN, P. J. et al. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 9, p. 564-73, Sep 2002. ISSN 1473-3099.
- GUERRA, C. A.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 8, p. 353-8, Aug 2006. ISSN 1471-4922.
- GUILLOIN, J. et al. Synthesis, antimalarial activity, and molecular modeling of new pyrrolo [1, 2-a] quinoxalines, bispyrrolo [1, 2-a] quinoxalines, bispyrido [3, 2-e] pyrrolo [1, 2-a] pyrazines, and bispyrrolo [1, 2-a] thieno [3, 2-e] pyrazines. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 8, p. 1997-2009, 2004. ISSN 0022-2623.
- GUNASEKERA, A. M. et al. *Plasmodium falciparum*: genome wide perturbations in transcript profiles among mixed stage cultures after chloroquine treatment. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 1, p. 87-92, Sep 2007. ISSN 0014-4894.
- GUTTERY, D. S. et al. A putative homologue of CDC20/CDH1 in the malaria parasite is essential for male gamete development. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002554, Feb 2012. ISSN 1553-7374.
- HAMEED P, S. et al. Triaminopyrimidine is a fast-killing and long-acting antimalarial clinical candidate. **Nat Commun**, v. 6, p. 6715, Mar 2015. ISSN 2041-1723.
- HASIMA, N.; OZPOLAT, B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1509, Nov 2014. ISSN 2041-4889.
- HAY, S. I. et al. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 6, p. 327-36, Jun 2004. ISSN 1473-3099.
- HONG, K. K. et al. The Mosaic of Rottlerin. **J Org Chem**, v. 80, n. 21, p. 10668-74, Nov 2015. ISSN 1520-6904.
- HOPKINS, J. et al. The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. **Protist**, v. 150, n. 3, p. 283-95, Oct 1999. ISSN 1434-4610.
- IETTA, F. et al. Rottlerin-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* growth in BeWo trophoblast-like cells. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 1279, 04 2017. ISSN 2045-2322.

- ISHII, R. et al. Prostaglandin E2 production and induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 is inhibited in a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, by *Mallotus japonicus* phloroglucinol derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1571, n. 2, p. 115-123, 2002. ISSN 0304-4165.
- JAMBOU, R. et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. **Lancet**, v. 366, n. 9501, p. 1960-3, Dec 2005. ISSN 1474-547X.
- JHA, D. et al. Alteration in *Plasmodium falciparum* proteome upon treatment with various anti-malarial drugs. **Journal of Proteins & Proteomics**, v. 7, n. 1, 2016. ISSN 0975-8151.
- KESTER, K. E. et al. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. **J Infect Dis**, v. 183, n. 4, p. 640-7, Feb 2001. ISSN 0022-1899.
- KIM, T. S. et al. Interaction of Hsp90 with ribosomal proteins protects from ubiquitination and proteasome-dependent degradation. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 2, p. 824-33, Feb 2006. ISSN 1059-1524.
- KOMAKI-YASUDA, K. et al. Identification of a novel and unique transcription factor in the intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74701, 2013. ISSN 1932-6203.
- KUMAR, D.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Rottlerin-induced autophagy leads to the apoptosis in breast cancer stem cells: molecular mechanisms. **Mol Cancer**, v. 12, n. 1, p. 171, Dec 2013. ISSN 1476-4598.
- \_\_\_\_\_. Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Cancer Lett**, v. 343, n. 2, p. 179-89, Feb 2014. ISSN 1872-7980.
- KUMAR, N. et al. *Plasmodium falciparum* gene encoding a protein similar to the 78-kDa rat glucose-regulated stress protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 17, p. 6277-81, Sep 1988. ISSN 0027-8424.
- KYES, S.; PINCHES, R.; NEWBOLD, C. A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 105, n. 2, p. 311-5, Feb 2000. ISSN 0166-6851.
- LA GRECA, N. et al. Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 89, n. 2, p. 283-93, Nov 1997. ISSN 0166-6851.
- LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J Parasitol**, v. 65, n. 3, p. 418-20, Jun 1979. ISSN 0022-3395.
- LANZER, M. et al. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 1, p. 23-36, Jan 2006. ISSN 0020-7519.

- LASONDER, E. et al. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 537-42, Oct 2002. ISSN 0028-0836.
- LATRÉ DE LATÉ, P. et al. Apicomplexan autophagy and modulation of autophagy in parasite-infected host cells. **Biomed J**, v. 40, n. 1, p. 23-30, 02 2017. ISSN 2320-2890.
- LE ROCH, K. G. et al. Global analysis of transcript and protein levels across the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Genome Res**, v. 14, n. 11, p. 2308-18, Nov 2004. ISSN 1088-9051.
- \_\_\_\_\_. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. **Science**, v. 301, n. 5639, p. 1503-8, Sep 2003. ISSN 1095-9203.
- LECHWARD, K. et al. Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. **Acta Biochim Pol**, v. 48, n. 4, p. 921-33, 2001. ISSN 0001-527X.
- LI, Q. et al. Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1. **Cytometry A**, v. 71, n. 5, p. 297-307, May 2007. ISSN 1552-4922.
- LIST, E. et al. The use of proteomics to study infectious diseases. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 8, n. 1, p. 31-45, 2008. ISSN 1871-5265.
- LLINÁS, M. et al. Comparative whole genome transcriptome analysis of three *Plasmodium falciparum* strains. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 4, p. 1166-73, 2006. ISSN 1362-4962.
- MAIER, A. G. et al. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 5, p. 341-54, May 2009. ISSN 1740-1534.
- MAIOLI, E. et al. Non-conventional rottlerin anticancer properties. **Arch Biochem Biophys**, v. 645, p. 50-53, May 2018. ISSN 1096-0384.
- \_\_\_\_\_. Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers. **Biol Proced Online**, v. 11, p. 227-40, 2009. ISSN 1480-9222.
- MAIOLI, E.; TORRICELLI, C.; VALACCHI, G. Rottlerin and cancer: novel evidence and mechanisms. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 350826, 2012. ISSN 1537-744X.
- MAKANGA, M. et al. Towards a proteomic definition of CoArtem action in *Plasmodium falciparum* malaria. **Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1849-58, May 2005. ISSN 1615-9853.
- MARCHESINI, N. et al. A malaria parasite-encoded vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase is targeted to the host erythrocyte. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 36841-36847, 2005. ISSN 0021-9258.
- MATTHEWS, K. et al. The *Plasmodium* translocon of exported proteins (PTEX) component thioredoxin-2 is important for maintaining normal blood-stage growth. **Mol Microbiol**, v. 89, n. 6, p. 1167-86, Sep 2013. ISSN 1365-2958.

- MOURAY, E. et al. Biochemical properties and cellular localization of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 337-46, Mar 2007. ISSN 0300-9084.
- MUNDWILER-PACHLATKO, E.; BECK, H.-P. Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. 19987-19994, 2013. ISSN 0027-8424.
- MÜLLER, O. Malaria in Africa. **Challenges for control and elimination in the 21st century**. Frankfurt: Peter Lang, 2011.
- NATALANG, O. et al. Dynamic RNA profiling in *Plasmodium falciparum* synchronized blood stages exposed to lethal doses of artesunate. **BMC Genomics**, v. 9, p. 388, Aug 2008. ISSN 1471-2164.
- NAVALE, R. et al. Characterization of the autophagy marker protein Atg8 reveals atypical features of autophagy in *Plasmodium falciparum*. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113220, 2014. ISSN 1932-6203.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 12<sup>a</sup>. 2011. 264 ISBN 9788538802204.
- NIRMALAN, N.; SIMS, P. F.; HYDE, J. E. Quantitative proteomics of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and its application to studies of development and inhibition. **Mol Microbiol**, v. 52, n. 4, p. 1187-99, May 2004. ISSN 0950-382X.
- NOCETTI, N.; WHITEHOUSE, I. Nucleosome repositioning underlies dynamic gene expression. **Genes Dev**, v. 30, n. 6, p. 660-72, Mar 2016. ISSN 1549-5477.
- NOEDL, H. et al. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. **N Engl J Med**, v. 359, n. 24, p. 2619-20, Dec 2008. ISSN 1533-4406.
- NÁJERA, J. A.; GONZÁLEZ-SILVA, M.; ALONSO, P. L. Some lessons for the future from the Global Malaria Eradication Programme (1955–1969). **PLoS medicine**, v. 8, n. 1, p. e1000412, 2011. ISSN 1549-1676.
- OBERLI, A. et al. A *Plasmodium falciparum* PHIST protein binds the virulence factor PfEMP1 and comigrates to knobs on the host cell surface. **FASEB J**, v. 28, n. 10, p. 4420-33, Oct 2014. ISSN 1530-6860.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malar J**, v. 9, p. 115, 2010. ISSN 1475-2875.
- OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. et al. Uncomplicated malaria treatment in the Brazilian Amazon: knowledge, practices and perceptions of health workers in high-incidence municipalities. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 1445-1456, 2011. ISSN 1413-8123.
- PATTERSON, S. et al. Pre-replication complex organization in the atypical DNA replication cycle of *Plasmodium falciparum*: characterization of the mini-chromosome maintenance (MCM) complex formation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 145, n. 1, p. 50-9, Jan 2006. ISSN 0166-6851.

- PAVITHRA, S. R.; KUMAR, R.; TATU, U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **PLoS Comput Biol**, v. 3, n. 9, p. 1701-15, Sep 2007. ISSN 1553-7358.
- PEASE, B. N. et al. Global analysis of protein expression and phosphorylation of three stages of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development. **J Proteome Res**, v. 12, n. 9, p. 4028-45, Sep 2013. ISSN 1535-3907.
- PENG, M.; CASCIO, D.; EGEEA, P. F. Crystal structure and solution characterization of the thioredoxin-2 from *Plasmodium falciparum*, a constituent of an essential parasitic protein export complex. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 456, n. 1, p. 403-9, Jan 2015. ISSN 1090-2104.
- PETERSEN, I.; EASTMAN, R.; LANZER, M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. **FEBS Lett**, v. 585, n. 11, p. 1551-62, Jun 2011. ISSN 1873-3468.
- PHILLIPS, M. A. et al. Malaria. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17050, Aug 2017. ISSN 2056-676X.
- PREISER, P. et al. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. **Microbes Infect**, v. 2, n. 12, p. 1461-77, Oct 2000. ISSN 1286-4579.
- PRIETO, J. H. et al. Large-scale differential proteome analysis in *Plasmodium falciparum* under drug treatment. **Methods Mol Biol**, v. 1201, p. 269-79, 2015. ISSN 1940-6029.
- \_\_\_\_\_. Large-scale differential proteome analysis in *Plasmodium falciparum* under drug treatment. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e4098, 2008. ISSN 1932-6203.
- RADFAR, A.; DIEZ, A.; BAUTISTA, J. M. Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 12, p. 2034-42, Jun 2008. ISSN 0891-5849.
- RAMBOLD, A. S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. **Cell Cycle**, v. 10, n. 23, p. 4032-8, Dec 2011. ISSN 1551-4005.
- RAMDHAVE, A. S. et al. Targeting heat shock protein 90 for malaria. **Mini Rev Med Chem**, v. 13, n. 13, p. 1903-20, Nov 2013. ISSN 1875-5607.
- REILLY, P. T. et al. Cracking the ANP32 whips: important functions, unequal requirement, and hints at disease implications. **Bioessays**, v. 36, n. 11, p. 1062-71, Nov 2014. ISSN 1521-1878.
- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3<sup>a</sup>. 2011. ISBN 9788527715805.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208, 1963.
- RHIEL, M. et al. Trafficking of the exported *P. falciparum* chaperone PfHsp70x. **Sci Rep**, v. 6, p. 36174, 11 2016. ISSN 2045-2322.
- RYBACZEK, D.; MASZEWSKI, J. Phosphorylation of H2AX histones in response to double-strand breaks and induction of premature chromatin condensation in hydroxyurea-treated root



- meristem cells of *Raphanus sativus*, *Vicia faba*, and *Allium porrum*. **Protoplasma**, v. 230, n. 1-2, p. 31-9, 2007. ISSN 0033-183X.
- SALIBA, K. J.; KIRK, K. pH regulation in the intracellular malaria parasite, *Plasmodium falciparum* H<sup>+</sup> extrusion via a V-type H<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 47, p. 33213-33219, 1999. ISSN 0021-9258.
- SAM-YELLOWE, T. Y. The role of the Maurer's clefts in protein transport in *Plasmodium falciparum*. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 6, p. 277-284, 2009. ISSN 1471-4922.
- SCHUCK, D. C. et al. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds. **Cytometry A**, v. 79, n. 11, p. 959-64, Nov 2011. ISSN 1552-4930.
- SEGURA, C. et al. Partial characterization of *Plasmodium falciparum* trophozoite proteome under treatment with quinine, mefloquine and the natural antiplasmodial diosgenone. **Biomedica**, v. 34, n. 2, p. 237-249, 2014. ISSN 0120-4157.
- SHAHINAS, D.; FOLEFOC, A.; PILLAI, D. R. Targeting *Plasmodium falciparum* Hsp90: Towards Reversing Antimalarial Resistance. **Pathogens**, v. 2, n. 1, p. 33-54, Feb 2013. ISSN 2076-0817.
- SHARMA, J.; VARMA, D. R. A Review on Endangered plant of *Mallotus philippensis* (Lam.) M. Arg. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 1256-1265, 2011.
- SHONHAI, A.; BLATCH, G. L. **Heat shock proteins of malaria**. Springer, 2014. ISBN 9400774389.
- SIAU, A. et al. Proteome mapping of Plasmodium: identification of the *P. yoelii* remodelome. **Sci Rep**, v. 6, p. 31055, 08 2016. ISSN 2045-2322.
- SIBLEY, C. H.; PRICE, R. N. Monitoring antimalarial drug resistance: Applying lessons learned from the past in a fast-moving present. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 126-133, 2012. ISSN 2211-3207.
- SIWO, G. H. et al. An integrative analysis of small molecule transcriptional responses in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1030, Dec 2015. ISSN 1471-2164.
- SMILKSTEIN, M. et al. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 5, p. 1803-6, May 2004. ISSN 0066-4804.
- SOLTOFF, S. P. Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase C delta tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 41, p. 37986-92, Oct 2001. ISSN 0021-9258.
- \_\_\_\_\_. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKC $\delta$ . **Trends in pharmacological sciences**, v. 28, n. 9, p. 453-458, 2007. ISSN 0165-6147.

- SONG, J. et al. Rottlerin promotes autophagy and apoptosis in gastric cancer cell lines. **Mol Med Rep**, v. 18, n. 3, p. 2905-2913, Sep 2018. ISSN 1791-3004.
- SONG, K. S. et al. Rottlerin induces autophagy and apoptotic cell death through a PKC-delta-independent pathway in HT1080 human fibrosarcoma cells: the protective role of autophagy in apoptosis. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 650-8, Jul 2008. ISSN 1554-8635.
- STURM, A. et al. Mitochondrial ATP synthase is dispensable in blood-stage *Plasmodium berghei* rodent malaria but essential in the mosquito phase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 33, p. 10216-23, Aug 2015. ISSN 1091-6490.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D447-D452, 2014. ISSN 1362-4962.
- TARASCHI, T. F. et al. Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3420-6, Nov 2003. ISSN 0006-4971.
- TARR, S. J. et al. A conserved domain targets exported PHISTb family proteins to the periphery of *Plasmodium* infected erythrocytes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 196, n. 1, p. 29-40, Aug 2014. ISSN 1872-9428.
- TORRENTINO-MADAMET, M. et al. Global response of *Plasmodium falciparum* to hyperoxia: a combined transcriptomic and proteomic approach. **Malar J**, v. 10, p. 4, Jan 2011. ISSN 1475-2875.
- TORRICELLI, C. et al. Phosphorylation-independent mTORC1 inhibition by the autophagy inducer Rottlerin. **Cancer Lett**, v. 360, n. 1, p. 17-27, Apr 2015. ISSN 1872-7980.
- \_\_\_\_\_. Alternative Pathways of Cancer Cell Death by Rottlerin: Apoptosis versus Autophagy. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 980658, 2012. ISSN 1741-4288.
- TOTINO, P. R. et al. *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 4, p. 478-86, Apr 2008. ISSN 0014-4894.
- \_\_\_\_\_. *Plasmodium falciparum*: erythrocytic stages die by autophagic-like cell death under drug pressure. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 4, p. 478-86, Apr 2008. ISSN 0014-4894.
- TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-5, Aug 1976. ISSN 0036-8075.
- TUTEJA, R. Malaria - an overview. **FEBS J**, v. 274, n. 18, p. 4670-9, Sep 2007. ISSN 1742-464X.
- VAN SCHALKWYK, D. A. et al. Inhibition of *Plasmodium falciparum* pH regulation by small molecule indole derivatives results in rapid parasite death. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 9, p. 1291-9, May 2010. ISSN 1873-2968.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 2002. ISSN 1474-760X.

- WELLS, T. N.; HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.; VAN VOORHIS, W. C. Malaria medicines: a glass half full? **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 6, p. 424-42, Jun 2015. ISSN 1474-1784.
- WHITE, J. H.; KILBEY, B. J. DNA replication in the malaria parasite. **Parasitol Today**, v. 12, n. 4, p. 151-5, Apr 1996. ISSN 0169-4758.
- WHITE, N. J. et al. Malaria. **Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723-35, Feb 2014. ISSN 1474-547X.
- WHO. **World malaria report 2017**. 2018.
- \_\_\_\_\_. **World malaria report 2016**. 2017.
- \_\_\_\_\_. **World malaria report 2015**. 2015.
- WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 11, p. 3307-16, Nov 2001. ISSN 1059-1524.
- WONGSRICHANALAI, C. et al. Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 4, p. 209-18, Apr 2002. ISSN 1473-3099.
- \_\_\_\_\_. Mefloquine--its 20 years in the Thai Malaria Control Program. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 35, n. 2, p. 300-8, Jun 2004. ISSN 0125-1562.
- YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, Jun 2012. ISSN 1471-2105.
- YOUNG, J. A. et al. The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. **Mol Biochem Parasitol**, v. 143, n. 1, p. 67-79, Sep 2005. ISSN 0166-6851.
- ZAIDI, S. F. et al. Potent bactericidal constituents from *Mallotus philippinensis* against clarithromycin and metronidazole resistant strains of Japanese and Pakistani *Helicobacter pylori*. **Biol Pharm Bull**, v. 32, n. 4, p. 631-6, Apr 2009. ISSN 0918-6158.
- ZENG, H. et al. Mallotoxin is a novel human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel activator. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 319, n. 2, p. 957-62, Nov 2006. ISSN 0022-3565.
- ZHANG, D. et al. Neuroprotective effect of protein kinase C $\delta$  inhibitor rottlerin in cell culture and animal models of Parkinson's disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 3, p. 913-922, 2007. ISSN 0022-3565.
- ZHANG, Q. et al. Proteomic analysis of exported chaperone/co-chaperone complexes of *P. falciparum* reveals an array of complex protein-protein interactions. **Sci Rep**, v. 7, p. 42188, 02 2017. ISSN 2045-2322.
- ZHU, Y. et al. Rottlerin as a novel chemotherapy agent for adrenocortical carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 22825-22834, Apr 2017. ISSN 1949-2553.