



Universidade de Brasília

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

**Efeitos da rottlerin na esquizogonia
eritrocitária de *Plasmodium falciparum* e
implementação e avaliação de teste *in vitro*
por fluorescência de atividade
antiplasmodial**

THUANY DE MOURA CORDEIRO

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília – DF

THUANY DE MOURA CORDEIRO

**Efeitos da rottlerin na esquizogonia eritrocitária de
Plasmodium falciparum e implementação e avaliação de
teste *in vitro* por fluorescência de atividade
antiplasmodial**

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

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília
2014

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Bioquímica e Química de Proteínas e de Interação Patógeno- Hospedeiro do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, pela vida, pela força, pela coragem e pela oportunidade de alcançar mais este objetivo tão sonhado.

A minha mãe, Edinalda, pelo exemplo de mulher, pelo amor e apoio incondicional que me faz ter forças para ir à luta e conquistar meus objetivos.

Ao meu orientador e amigo Sébastien, pelo exemplo profissional e de caráter que me inspira todos os dias a ser uma pessoa melhor.

E a minha amiga-irmã Hialy, pela amizade e companheirismo fundamental e por todas as coisas boas que tem feito por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador *Prof. Dr. Sébastien Charneau*, pela orientação, pela paciência, pelo carinho, pela motivação, por estar sempre ao meu lado me ajudando a superar os obstáculos. Pela confiança no meu potencial e por me apoiar, mesmo nos momentos em que tudo deu errado, mas principalmente por ser uma das melhores pessoas que eu poderia ter conhecido em minha vida, tanto pela sua competência profissional, como pelo sua integridade de caráter.

Ao *Prof. Phillipe Greiller*, pela imensa colaboração com esta pesquisa.

Ao *Prof. Jaime Santana e Profa. Izabela Dourado*, pela colaboração indispensável para esta pesquisa.

Ao *Prof. Fabian Borghetti*, pela colaboração e por ter cedido o material da biodiversidade brasileira.

À *Professora Cecília e a Sarah Falcão*, pela disposição e paciência no desenvolvimento, manipulação e operação do equipamento e análise dos dados gerados pela citometria de fluxo.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pelo consentimento da bolsa de mestrado.

À *Gerência de Processamento e Distribuição de Hemocomponentes – GEPROD da Fundação Hemocentro de Brasília - FHB/SES através da pessoa Fábio de França Martins* pelo convênio de provisionamento.

Aos amigos e colegas do Laboratório Interação Patógeno- *Graziella, Camila, Cissé, Iracyara, Allan, Clênia, Flávia, Rauciane, Brina, Jhonata e Raquel*, pelo carinho, companheirismo e amizade.

Aos Professores e colegas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, *Carlos André, Wagner, Mariana, Pedro, Consuelo, Hialy, Anne, Elaine, Luz Elena, Maurício, Nicholas, Adelson, Rayner, Jaques, Micaella, Simone, Marina, Diana, Renata, Flávia, Caroll, Aline, Jéssica, Agenor, Agnelo, Samuel, Nuno e Antônio* pelo carinho, amizade e apoio.

Ao *Prof. Carlos André*, pelo carinho, pelos conselhos e pela disposição em sempre ajudar e colaborar.

À *Profa. Carla*, por ter confiado, mesmo sem me conhecer no primeiro momento, e ter me indicado ao melhor orientador que existe na UnB.

À **Renta Garcia**, pela cooperação, junto com o seu projeto de Iniciação científica, para a implantação do teste de atividade antiplasmodial baseado em fluorescência. Mas acima de tudo, pelo carinho, respeito e amizade.

Agradeço a **Hialy e André**, pela amizade e apoio durante todo o meu mestrado. Por compartilhar comigo todos os momentos de alegrias e tristezas, eles têm sido a minha família aqui em Brasília. Especialmente a **Hialy**, que é muito mais que uma amiga, é uma irmã, e sem dúvida, a nossa amizade é o melhor resultado que eu tenho deste mestrado. Tudo poderia ter dado errado, mas somente por esta amizade, ainda assim valeria a pena.

À **Anne**, pela ajuda crucial e indispensável na execução da eletroforese bidimensional, na detecção de *spots* pelo *Image Master*, na seleção e extração dos *spots* para a espectrometria de massas. Mas principalmente, pela amizade, pelo carinho, paciência e companheirismo. Dentre os vários colegas que trabalham no LBQP com eletroforese bidimensional, a minha decisão por pedir ajuda a **Anne** foi pela minha admiração profissional por ela, mas ao trabalharmos juntas, uma admiração pessoal também surgiu, e hoje, é uma das pessoas mais íntegra, autêntica e verdadeira que eu conheci na UnB.

À **Elaine**, pela ajuda na compreensão e execução das análises de dados gerados pela espectrometria de massas.

À **Luz Elena**, pela amizade, carinho, respeito, companheirismo, disposição e paciência.

Ao **Rayner**, por ter ajudado na etapa de identificação das proteínas por espectrometria de massas, pela amizade, carinho e companheirismo.

Ao **Adelson**, pela amizade, carinho, respeito, por me ensinar a ter uma cabeça de cientista, por me ensinar várias das técnicas que eu sei hoje e por me ensinar a raciocinar sobre a ciência.

A **Simone**, pelos conselhos, paciência, amizade e carinho.

À **Fabiana e Eloá** pelo carinho, amizade e exemplo. Por serem as pessoas que mais têm acreditado no meu potencial profissional. As melhores oportunidades profissionais que eu tenho tido sempre tem estas duas pessoas envolvidas. Enfim, não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram e têm feito por mim.

A minha amiga, *coach*, pastora **Fabiane**, pelo carinho, amizade, companheirismo, por estar ao meu lado na fase mais difícil deste mestrado, me ajudando a descobrir as minhas melhores habilidades, definir a minha identidade, e adquirir competências potencializadas, auto responsabilidade, tomada do controle da vida e dos caminhos a

serem percorridos e assim superar os momentos de crise. Por me ensinar a ter foco e mais foco e sempre decidir pelo melhor.

À minha mãe **Edinalda**, pelos conselhos, incentivo, pelas orações, por me ensinar a ser uma pessoa determinada e me mostrar que com muita garra e dedicação posso alcançar meus objetivos e por este amor incondicional que tem por mim. Hoje, o que eu mais me orgulho em mim é a pessoa que eu me tornei, mais dos que os objetivos que eu conquistei. E ser esta pessoa de caráter só foi possível por eu tive e tenho este exemplo de mulher, mãe, amiga, honestidade. Obrigada mãe por tudo, não sei o que seria de mim sem você!!

Às minhas irmãs, **Nathany e Gabriela**, meu sobrinho **Miguel** e meu pai, **Joaquim**, pelo carinho, apoio, torcida, enfim, por serem quem são.

Agradeço a **todas as pessoas** que, direta ou indiretamente, me apoiaram ao longo destes 2 anos de mestrado.

A **Deus**, que me permitiu chegar até aqui, por ter me presenteado com SEU favor e amor, trazendo sobre mim oportunidades benditas, promessas maravilhosas e realizadas. 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.*"

Por fim, agradeço à **Cecília, Mariana e Cissé**, por terem aceitado tão prontamente o convite para fazer parte da banca de avaliação desta dissertação de mestrado.

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, o CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos e especificamente os programas: Cooperação franco-brasileira CAPES-COFECUB (723/11), Rede Pró-Centro-Oeste (FAPEG / CNPq 563998/2010-4 e 563998/2010-5), e Incentivo a Pesquisa em Parasitologia Básica (CAPES 23038.005298/2011-83).

“Que a força do medo que tenho não me impeça de ver o que anseio. Que a morte de tudo em que acredito não me tape os ouvidos e a boca. Porque metade de mim é o que eu grito, mas a outra metade é silêncio...

Que essa minha vontade de ir embora se transforme na calma e na paz que eu mereço.

Que essa tensão que me corrói por dentro seja um dia recompensada. Porque metade de mim é o que eu penso, mas a outra metade é um vulcão...”

Oswaldo Montenegro

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários *Plasmodium spp.* O *P. falciparum* é considerado o mais severo por ser o responsável pela maioria dos casos de morte causados pela doença. Devido ao rápido surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes às drogas antimalárias dá-se a importância de realizar um *screening* de compostos da biodiversidade, além de elucidar os mecanismos de ação de substâncias com comprovada ação antiplasmodial, como por exemplo, a rottlerin, um inibidor da proteína quinase C. As proteínas quinases desempenham um papel essencial em muitas funções celulares, o que as tornam alvos muito atraentes para o desenvolvimento de novas drogas. A metodologia considerada padrão ouro para avaliar a atividade antimalária de drogas é o ensaio com incorporação de hipoxantina tritiada. No entanto, o alto custo, a adoção de medidas de segurança e a produção de lixo radioativo limitam a utilização desta técnica. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram à implementação do teste de atividade antiplasmodial baseado em fluorescência com SYBR Green I[®], avaliação da atividade antimalária das subfrações cromatográficas de sílica-gel do extrato de acetato de etila de *Qualea grandiflora*, uma planta típica do Cerrado brasileiro, e avaliação dos efeitos da rottlerin no ciclo intra-eritrocitário do *P. falciparum* por métodos bioquímicos e citofluorimétricos.

Três subfrações de *Q. grandiflora* apresentaram atividade antiplasmodial moderada, sem atividade citotóxica e hemolítica aparentes. Foi demonstrado o efeito da rottlerin, um potencial efetor da autofagia, sobre o ciclo eritrocitário de *P. falciparum* por citometria de fluxo. De fato, a análise da população enriquecida de esquizonte de *P. falciparum* em cultura tratada por rottlerin comparada com a não tratada revelou que houve inibição da diferenciação dos merozoítos, acarretando na morte rápida do parasito. A fim de entender quais eram os alvos proteicos de ação desta molécula, foi realizada uma análise proteômica comparativa preliminar por eletroforese bidimensional. Três proteínas, *Heat Shock Protein 90* (HSP90), 3-fosfoglicerato quinase (3-PGK) e lactato desidrogenase (LDH), superexpressas na população de esquizontes não tratada com a rottlerin foram identificadas. Estas proteínas pertencem à classe de proteínas quinases ou possuem um domínio de interação com quinase. A HSP90 está envolvida no processo de enovelamento proteico com um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do parasito e, conseqüentemente, estudada como potencial alvo de droga antiplasmodial. A LDH e a 3-PGK são enzimas do metabolismo da glicose, e assim, potenciais alvos bem conhecidos para compostos antimaláricos devido à dependência deste parasito à glicólise para produção de energia.

O estudo da biodiversidade do Cerrado pode contribuir para a descoberta de compostos antimalários e a conservação deste bioma ameaçado. A não detecção das proteínas identificadas na presença de rottlerin pode estar relacionada à indução da autofagia na esquizogonia eritrocitária e constituem potenciais alvos de drogas antimaláricas.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*, Malária, rottlerin, morfogênese de merozoítos, proteômica, citometria de fluxo, atividade antiplasmodial, *Qualea grandiflora*.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium spp* protozoa. The *P. falciparum* is considered the most severe, since it is responsible for the majority of deaths related to this disease. Due to the rapid emergence of resistant strains of *P. falciparum* against antimalarial drugs, a great importance can be given to the screening of biodiversity compounds in addition to elucidate the mechanisms of action of substances with demonstrated antiplasmodial action such as rottlerin, an inhibitor of protein kinase C. Protein kinases play a pivotal role in many cellular functions, which make them very attractive targets for the development of new drugs. The methodology considered the gold standard for assessing antimalarial drug activity is the [³H]hypoxanthine incorporation assay. However, the high cost, adoption of safety regulations and the production of radioactive waste limit the application of this technique. Therefore, the objectives of this study were to implement the antiplasmodial activity test based on SYBR[®] Green I fluorescence, assessment of antimalarial activity of silica gel chromatographic subfractions of *Qualea grandiflora* ethyl acetate extract, a typical plant of the Brazilian Cerrado, and assessment of the rottlerin's effects in erythrocytic cycle of *P. falciparum* by biochemical and cytofluorimetric methods.

Three subfractions of *Q. grandiflora* showed moderate antiplasmodial activity without apparent cytotoxic and hemolytic activities. It was demonstrated the effect of rottlerin, a potential autophagy effector, on *P. falciparum* erythrocytic cycle by flow cytometry. In fact, analysis of the schizont enriched population of *P. falciparum* in rottlerin-treated culture compared to untreated ones revealed that there was an inhibition of merozoites differentiation, resulting in the rapid death of the parasite. In order to elucidate which proteins were the targets of rottlerin action, a preliminary comparative proteomic analysis by two-dimensional electrophoresis was performed. Three proteins, heat shock protein 90 (HSP90), 3- phosphoglycerate kinase (PGK-3) and lactate dehydrogenase (LDH), upregulated in schizont population non treated with rottlerin were identified. These proteins belong to the class of protein kinases or possess domains that interact with them. The HSP90 is involved in the protein folding process with a critic role in parasite growth and development, thus being studied as a potential target for antiplasmodial drugs. The 3- PGK and LDH are enzymes of glucose metabolism, hence well known potential targets for antimalarial compounds due to parasite dependence on glycolysis to produce energy.

The study of Cerrado biodiversity can contribute to the discovery of antimalarial compounds and to the conservation of this threatened biome. The not detection of these proteins identified in the presence of rottlerin may be related to autophagy induction in erythrocytic schizogony and constitute potential targets for antimalarial drugs.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Malaria, rottlerin, merozoite morphogenesis, proteomics, flow cytometry, antiplasmodial activity, *Qualea grandiflora*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição da malária pelo mundo	19
Figura 2: Epidemiologia da malária no Brasil	20
Figura 3: Incidência da malária no Brasil	21
Figura 4: Ciclo biológico dos protozoários causadores da malária	23
Figura 5: Acúmulo de hemozoína dentro do vacúolo digestivo.....	24
Figura 6: Morfologia do estágio esquizonte de <i>P. falciparum</i>	26
Figura 7: Morfologia do estágio de merozoítos de <i>Plasmodium falciparum</i>	29
Figura 8: Fases da Campanha de Erradicação da Malária, conforme estabelecido pela OMS	35
Figura 9: Distribuição epidemiológica da resistência de <i>P. falciparum</i> aos fármacos antimaláricos	36
Figura 10: Modelos hipotéticos para as vias de transporte de drogas antimaláricas e localização do alvo de drogas	40
Figura 11: Estrutura química da rottlerin	47
Figura 12: Efeitos da rottlerin na morfogênese de merozoítos	48
Figura 13: Ciclo eritrocitário do <i>P. falciparum</i> em que a rottlerin age na faixa entre 42-48 h	49
Figura 14: Eletromicrografias de <i>P. falciparum</i> mostrando a morfologia da morte celular parecida ao processo de autofagia na presença de estaurosporina, SNAP ou cloroquina	50
Figura 15: Redução de MTT em formazan nas células vivas por redutases mitocondriais	60
Figura 16: Fluxograma da avaliação da atividade antiplasmodial, citotóxica e hemolítica	61
Figura 17: Fluxograma da avaliação dos efeitos da rottlerin por citometria de fluxo. .	63
Figura 18: Fluxograma da análise comparativa proteômica baseada em géis 2D	68
Figura 19: Fluxograma geral mostrando todas as etapas metodológicas utilizadas neste estudo	69
Figura 20: Curvas de dose-resposta não normalizadas das diferentes condições testadas no ensaio de atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> baseado em fluorescência com uso da cloroquina como droga controle	72

Figura 21: Curvas de dose-resposta normalizadas das diferentes condições testadas no ensaio de atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> baseado em fluorescência com uso da cloroquina como droga controle	73
Figura 22: Distribuição da fluorescência para o canal FITC dos controles negativos (eritrócitos não infectados e infectados sem marcação) e controle positivo (eritrócitos infectados e marcados) obtidos por citometria de fluxo	77
Figura 23: Distribuição da fluorescência para o canal PE dos controles negativos (eritrócitos não infectados e infectados sem marcação) e controle positivo (eritrócitos infectados e marcados) obtidos por citometria de fluxo	78
Figura 24: Avaliação do ciclo biológico da população controle de <i>P. falciparum</i> em presença de DMSO por citometria de fluxo	80
Figura 25: Avaliação do efeito da rottlerin 1 μ M sobre ciclo biológico de <i>P. falciparum</i> por citometria de fluxo	81
Figura 26: Avaliação do efeito da rottlerin 2 μ M sobre ciclo biológico de <i>P. falciparum</i> por citometria de fluxo	82
Figura 27: Parasitemia das culturas tratadas com rottlerin (1 μ M e 2 μ M) e não tratada durante a esquizogonia eritrocitária	83
Figura 28: Efeitos da rottlerin na morfologia de esquizontes (40 - 44h após invasão) por visualização dos esfregaços por microscopia óptica	85
Figura 29: Perfil eletroforético de extrato total de <i>Plasmodium falciparum</i> em SDS-PAGE 12% corado com coomassie R-350	86
Figura 30: Perfil 2DE de extrato de esquizonte de <i>P. falciparum</i> corado com nitrato de prata	87
Figura 31: Perfis eletroforético 2D de extratos proteicos obtidos a partir da extração parasitária de culturas de esquizonte não tratadas e tratadas com rottlerin	89
Figura 32: Histograma da distribuição de fluorescência em culturas de <i>P. falciparum</i> em outros estudos	100
Figura 33: Efeito do SNAP, estaurosporina e cloroquina na viabilidade de <i>P.falciparum</i> avaliado por citometria de fluxo.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Datas da introdução e do primeiro relato da resistência às drogas antimaláricas.....	37
Tabela 2: Comparação entre os testes mais utilizados para a avaliação da atividade antiplasmodial com parasitos na fase intra-eritrocitária.....	43
Tabela 3: Tampão de equilíbrio.....	66
Tabela 4: Ensaio antiplasmodiais e de citotoxicidade das subfrações das folhas de <i>Qualea grandiflora</i>	75
Tabela 5: Bioensaio <i>in vitro</i> da atividade antiplasmodial da rottlerin.....	76
Tabela 6: Identificação dos <i>spots</i> proteicos selecionados de <i>P. falciparum</i> por <i>peptide mass fingerprinting</i> (PMF).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1D – Eletroforese unidimensional
- 2D - Eletroforese bidimensional
- 3-PGK – *3-Phosphoglycerate Kinase* - 3- fosfoglicerato quinase
- ACN – Acetonitrila
- AQ – Amodiaquina
- ART - Artemisinina
- ATG – Proteínas codificadas pelos genes relacionados à autofagia
- BSA - *Bovine Serum Albumine* - Albumina sérica bovina
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- cDNA- DNA complementar
- CHAPS - *3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*
- CMA – Autofagia mediada por acompanhante
- CQ – Cloroquina
- DDT - Diclorodifeniltricloroetano
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DTT – Ditioneitol
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- ER – Retículo Endoplasmático
- FITC - *Fluorescein isothiocyanate* - Isotiocianato de Fluoresceína
- HSP - *Heat-shock Protein* – Proteína de Choque Térmico
- IC₅₀ – Concentração inibitória necessária para inibir 50% da população
- IC₉₀ - Concentração inibitória necessária para inibir 90% da população
- IEF - *Isoelectric focusing* - Focalização isoeletrica
- IPG *strip* – tira de gel com gradiente de pH imobilizado
- iTRAQ - *isobaric tag for relative and absolute quantitation* - Marcação isobárica para quantificação absoluta e relativa

LC - Cromatografia Líquida

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

LDH – Lactato Desidrogenase

LM - Lumefantrina

MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization* - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MNHN – Museu Nacional de História Natural de Paris

MQ – Água grau Milli-Q[®]

MQ - Mefloquina

MS – Espectrometria de Massa

MS/MS - Espectrômetro de massas em série

MSP - Proteínas de superfície do merozoíto

PABA- Ácido Paraaminobenzóico

PBS - Salina tamponada com fosfato

Pf – *Plasmodium falciparum*

PE – Fosfatidiletanolamina

pH – Potencial Hidrogeniônico

pI – Ponto isoelétrico

Pf3-PGK - 3-fosfoglicerato quinase de *P. falciparum*

PfARP - Proteína de *Plasmodium falciparum* codificada por gene relacionado a apoptose

PfHSP90 – *Heat-shock Protein 90 of P. falciparum* – Proteína de choque térmico 90 de *P. falciparum*

PfLDH – Lactato Desidrogenase de *P. falciparum*

PKA – Proteína quinase A

PKC- Proteína quinase C

PKC δ – Proteína quinase C isotipo delta

RBC – *Red blood cell* – Glóbulos vermelhos, hemácias, eritrócitos

RFU: *relative fluorescent units* – Unidades de fluorescência relativa

q.s.p – Quantidade suficiente para

SDS – dodecilsulfato de sódio

SI - Índice de seletividade

SNAP - S-nitroso-N-acetil-penicilamina

TCA - Ácido tricloroacético

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Situação da Malária no mundo	19
1.2 Malária no Brasil.....	20
1.3 Ciclo de vida dos protozoários causadores da Malária.....	21
1.4 Morfogênese dos merozoítos de <i>P. falciparum</i>	24
1.5 Características da doença	29
1.5.1 Malária não complicada.....	30
1.5.2 Malária grave e complicada.....	30
1.5.3 Malária de Recaídas.....	32
1.5.4 Outras manifestações da Malária.....	32
1.5.5 Diagnóstico.....	33
1.6 Tratamento da malária	33
1.7 Resistência aos fármacos antimaláricos	35
1.8 Testes de atividade antimalarial <i>in vitro</i>.....	41
1.9 Morte celular e autofagia em <i>P. falciparum</i>	44
1.10 A rottlerin.....	46
1.10.1 Rottlerin como inibidor da morfogênese de merozoítos, o contexto científico	47
2. JUSTIFICATIVA	52
3. OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo Geral.....	55
3.2 Objetivos específicos.....	55
3.3 Etapas metodológicas	55
4. METODOLOGIA	56
4.1 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>.....	57
4.2 Subfrações do extrato de folhas da planta <i>Qualea grandiflora</i> a partir do acetato de etila.....	57
4.3 Bioensaios da atividade antimalarial <i>in vitro</i>	58

4.3.1 Ensaio de incorporação de hipoxantina tritiada.....	58
4.3.2 Ensaio de fluorescência por SYBR Green I	59
4.4 Teste de Hemólise	60
4.5 Ensaio de Citotoxicidade.....	60
4.6 Fluxograma dos bioensaios	61
4.5 Avaliação dos efeitos da rottlerin no ciclo biológico de <i>P. falciparum</i> por citometria de fluxo	61
4.5.1 Sincronização dos parasitos.....	61
4.5.2 Tratamento com a Rottlerin.....	62
4.5.3 Citometria de Fluxo	62
4.5.4 Fluxograma.....	63
4.6 Proteômica dos efeitos da rottlerin na morfogênese dos merozoítos	64
4.6.1 Sincronização.....	64
4.6.2 Tratamento com a rottlerin	64
4.6.3 Extração parasitária por lise eritrocitária seletiva.....	64
4.6.4 Determinação da quantidade de proteínas de cada amostra	65
4.6.5 Eletroforese bidimensional	65
4.6.6 Seleção dos <i>spots</i> de interesse	66
4.6.7 Digestão <i>in gel</i>	67
4.6.8 Espectrometria de massas	67
4.6.9 Fluxograma.....	68
4.7 Delineamento experimental	69
5. RESULTADOS.....	70
5.1 Padronização do bioensaio de atividade antiplasmodial <i>in vitro</i> baseado em fluorescência com SYBR Green I.....	71
5.2 Atividade antiplasmodial das subfrações de <i>Qualea grandiflora</i>	74
5.3 Bioensaio de atividade antiplasmodial da rottlerin <i>in vitro</i>	76
5.4 Efeitos da rottlerin sobre o ciclo biológico de <i>Plasmodium falciparum</i> por citometria de fluxo	76
5.4.1 Padronização da marcação com SYBR Green I	76
5.4.2 Efeitos da rottlerin na esquizogonia eritrocitária.....	79

5.5	Efeitos da rottlerin sobre a expressão proteica durante a esquizogonia eritrocitária de <i>P. falciparum</i> por proteômica comparativa.....	84
5.6.1	Padronização de eletroforese bidimensional para extrato parasitário de <i>P. falciparum</i>	86
5.7	Comparação preliminar dos perfis eletroforético 2D de esquizontes tratados e não tratados pela a rottlerin	88
5.8	Identificação por <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> dos 3 spots superexpressos em esquizontes não tratados pela rottlerin.....	90
6.	DISCUSSÃO	92
6.1.	Implementação dos testes de atividade antiplasmodial por SYBR Green I.....	93
6.2.	Efeitos da rottlerin sobre o ciclo biológico de <i>P. falciparum</i>	97
6.3.	Análise proteômica comparativa preliminar por Eletroforese Bidimensional dos efeitos da rottlerin sobre a merogonia de <i>P. falciparum</i>	102
7.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	107
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

1. INTRODUÇÃO

1.1 Situação da Malária no mundo

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Somente 5 de aproximadamente 100 espécies desses protozoários são responsáveis por infectar seres humanos: *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. ovale*; *P. malariae* e *P. knowlesi*, espécie recentemente reconhecida como agente causador desta doença em humanos. O *P. falciparum* é considerado o mais perigoso por causar malária cerebral (a forma mais grave da doença), podendo levar o indivíduo infectado a morte quando não tratado adequadamente (FRANÇA, SANTOS E FIGUEROA-VILLAR, 2008; BRASIL, 2008; WHO, 2013).

Esta doença é considerada a protozoose mais grave, afetando cerca de 300 a 500 milhões de pessoas no mundo anualmente. Sua distribuição epidemiológica é mais relevante nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, como mostra a figura 1, colocando sob risco aproximadamente 40% da população mundial (cerca de 2,4 bilhões de pessoas) em mais de 100 países (SACHS e MALANEY, 2002; GUERRA, SNOW e HAY, 2006; FRANÇA, SANTOS E FIGUEROA-VILLAR, 2008).



Figura 1: Distribuição da malária pelo mundo (adaptado OMS, 2011).

Em 2012, foram registrados cerca de 207 milhões de casos desta doença. A maioria destes casos (80%) era do continente africano, seguido pela Região do Sudeste da Ásia (13%) e da Região do Mediterrâneo Oriental (6%). Neste mesmo ano, estimou-se que ocorreram 627.000

(intervalo de incerteza, 473.000-789.000) óbitos por malária em todo o mundo. Dessas mortes estimadas, a maioria ocorreu na África Subsaariana (90%) e em crianças menores de 5 anos de idade (77%) (WHO, 2013).

1.2 Malária no Brasil

No Brasil, as principais espécies causadoras da malária são *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*. No entanto, as infecções por *P. vivax* predominam, sendo a espécie responsável por aproximadamente 78,7% dos casos notificados na região Amazônica entre 2000 e 2011. O Brasil integra os trinta países em que há maior número de casos de malária no mundo (BRASIL, 2013; WHO, 2013).

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, como mostra a figura 2. 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 2: Epidemiologia da malária no Brasil (adaptado WHO, 2013).

Mais de 420.000 casos foram registrados anualmente entre 2000 a 2011 no país. Sendo que, entre 2000 e 2002 houve uma redução da incidência de malária. Porém no período de 2002 a 2005 observou-se um aumento do número de casos da doença, chegando a atingir 607.782 casos em 2005. 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. No entanto, a partir do ano de 2006, observa-se um declínio do número de casos notificados (Fig. 3), apresentando uma redução média de 56.866 casos a cada ano (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; BRASIL, 2013).

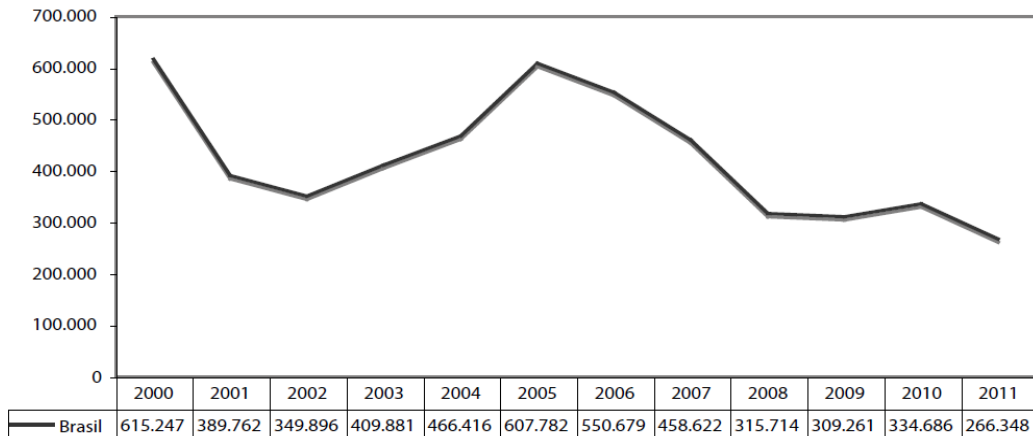


Figura 3: Incidência da malária no Brasil. Casos notificados entre 2000 e 2011 (BRASIL, 2013).

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 regional e local de atenção à saúde. Esses objetivos deverão ser alcançados pelo diagnóstico precoce e preciso e pelo tratamento imediato e eficaz dos casos (BRASIL, 2005).

1.3 Ciclo de vida dos protozoários causadores da Malária

O ciclo biológico das espécies de *Plasmodium* causadores da malária envolve dois hospedeiros: os seres humanos e as fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* (vetor). Dentro do ciclo de vida desses protozoários no homem, observam-se dois ciclos de reprodução assexuada: o ciclo hepático pré-eritrocitário transitório e o ciclo intra-eritrocitário (BANNISTER *et al.*, 2000a; BANNISTER E MITCHELL, 2003; NEVES *et al.*, 2011; REY, 2011).

A infecção se inicia através da inoculação de esporozoítos pelo inseto vetor infectado durante o repasto sanguíneo (Fig. 4, etapa 1). Estes esporozoítos atingem a corrente sanguínea, que por sua vez, infectam os hepatócitos (Fig. 4, etapa 2) e se diferenciam em esquizontes

teciduais ou hepáticos (Fig. 4, etapa 3), que se rompem e liberam merozoítos na corrente sanguínea (Fig. 4, etapas 4 e 5). Após esta replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica), os parasitos invadem os eritrócitos dando início ao ciclo intra-eritrocitário (BANNISTER E MITCHELL, 2003; NEVES *et al.*, 2011; REY, 2011).

Este ciclo é o mais estudado, pois é o responsável pelas manifestações clínicas mais importantes e pela morbimortalidade da malária e é a fase em que se pode manter em cultura. Além disso, por diferentes abordagens foi mostrado que 20% dos transcritos preditos de *P. falciparum* são específicos do ciclo intra-eritrocitário (BOZDECH *et al.*, 2003; LE ROCH *et al.*, 2003), o que é um estímulo à compreensão dos mecanismos moleculares desse ciclo.

Após a invasão dos eritrócitos (Fig. 4, etapa 7), os merozoítos infectantes se transformam para os estágios de anel (0-20 h) (Fig. 4, etapa 8) e trofozoíto (20-36 h) (Fig. 4, etapa 9), em que não ocorre divisão celular, e em seguida realiza três a quatro ciclos de mitose se transformando no estágio esquizonte multinuclear (36-48 h) (Fig. 4, etapa 10). O esquizonte se diferencia durante as últimas horas em 16-24 merozoítos que, após a ruptura do eritrócito, são liberados na circulação sanguínea (Fig. 4, etapa 11), para iniciar um novo ciclo intra-eritrocitário (BANNISTER E MITCHELL, 2003; NEVES *et al.*, 2011).

O ciclo intra-eritrocitário 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*. Após várias gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os microgametócitos (masculino) e os macrogametócitos (feminino) (Fig. 4, etapa 12), que ao serem ingeridos pelo inseto durante o repasto sanguíneo, são capazes de evoluir dando origem ao ciclo sexuado e depois ao ciclo esporogônico (Fig. 4, etapa 12 a 18) (BANNISTER *et al.*, 2000a; PREISER *et al.*, 2000; BLACKMAN e BANNISTER, 2001).

Estes gametócitos ao atingirem o estômago do mosquito se transformam em gametas extracelulares, macrogametas e microgametas (Fig. 4, etapa 13), 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 (CO₂). O 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 (Fig. 4, etapa 14). Após a fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto (Fig. 4, etapa 15). 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. 4, etapa 16). Então, inicia-se a esporogonia (formação de esporozoítos) até que ocorre a ruptura da parede do oocisto, liberando os esporozoítos (Fig. 4, etapa 17), que são disseminados pela hemolinfa até atingirem

as células das glândulas salivares (Fig. 4, etapa 18) e serão inoculados juntamente com a saliva em um hospedeiro humano, durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo destes protozoários causadores da malária (BANNISTER *et al.*, 2000a; PREISER *et al.*, 2000; BANNISTER E MITCHELL, 2003; NEVES *et al.*, 2011).

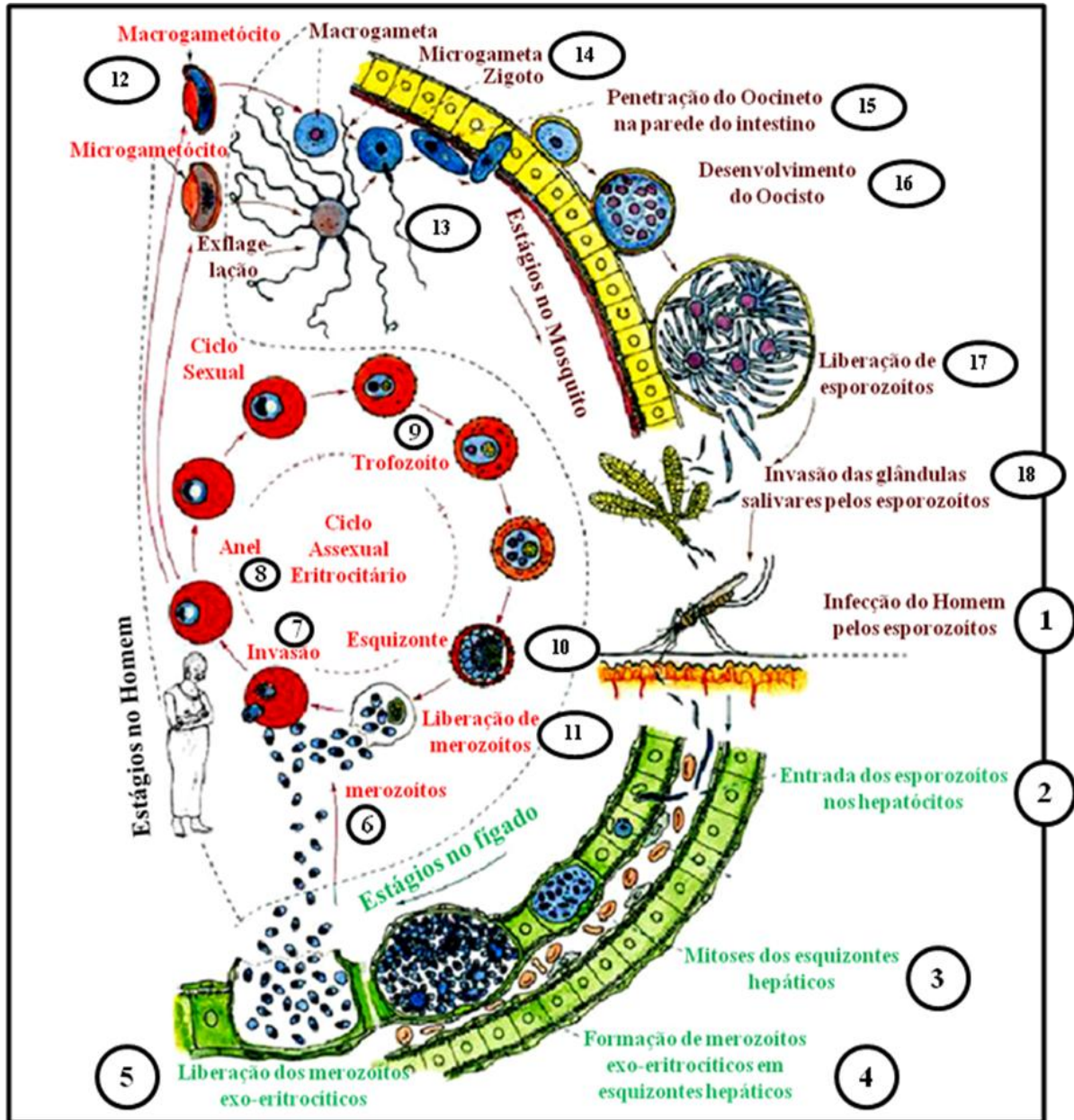


Figura 4: Ciclo biológico dos protozoários causadores da malária: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. knowlesi* (adaptado BANNISTER E MITCHELL, 2003).

Durante o ciclo intra-eritrocitário, estes protozoários utilizam como principal fonte de nutrição a hemoglobina, porém alguns elementos presentes no plasma, como glicose, metionina, biotina, certas purinas e pirimidinas, fosfato e ácido paraminobenzóico (PABA) também são utilizados para o seu desenvolvimento. A ingestão da hemoglobina ocorre por endocitose de

pequenas porções de citoplasma das hemácias, da membrana do vacúolo parasitóforo e da membrana plasmática do parasito, formado uma organela denominada citóstoma. Em seguida, a digestão ocorre no interior do vacúolo digestivo do protozoário, com a formação do pigmento malárico (Fig. 5), que consiste em cristais castanhos inertes, a hemozoína, formada a partir da associação de derivados de heme (ferriprotoporfirina IX) resultante do catabolismo da hemoglobina. Quando ocorre a ruptura das células infectadas (eritrócitos ou hepatócitos), a hemozoína acumulada é liberada no plasma e, então, é fagocitada pelas células de Kupffer no fígado ou pelos macrófagos do baço e de outros órgãos (BANNISTER *et al.*, 2000a; PREISER *et al.*, 2000; BANNISTER E MITCHELL, 2003; NEVES *et al.*, 2011).

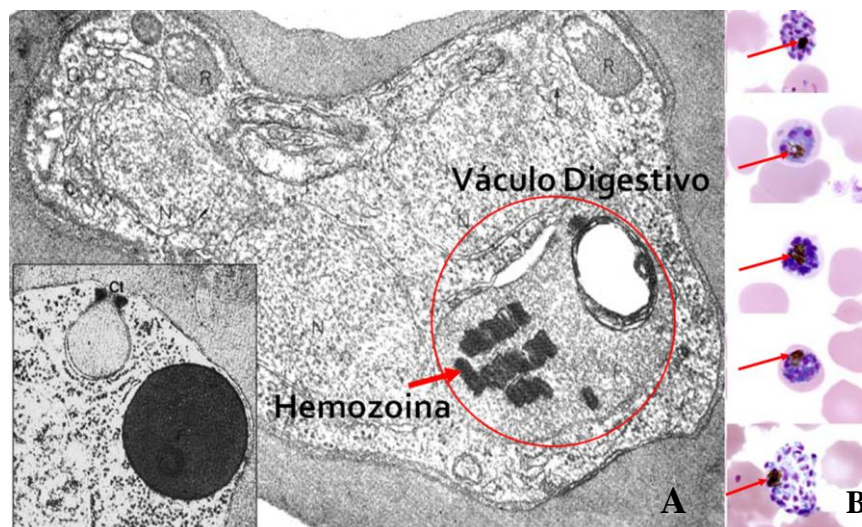


Figura 5: Acúmulo de hemozoína dentro do vacúolo digestivo. **A.** Microscopia Eletrônica Transmissão (adaptado LANGRETH *et al.*, 1978). **B.** Microscopia ótica mostrando em destaque (seta) a hemozoína dentro do vacúolo digestivo.

1.4 Morfogênese dos merozoítos de *P. falciparum*

A morfogênese dos merozoítos de *Plasmodium 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 – róptrias, 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; BANNISTER *et al.*, 2000a; b).

O estágio de esquizonte 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 24 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; 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.*, 2000a). 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 róptrias. 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 róptrias ou se transformar, individualmente, em micronemas ou grânulos densos (BANNISTER *et al.*, 2000a).

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 *et al.*, 2000a).

A figura 6 representa a morfologia dos esquizontes de *P. falciparum*, mostrando a morfogênese dos merozoítos.

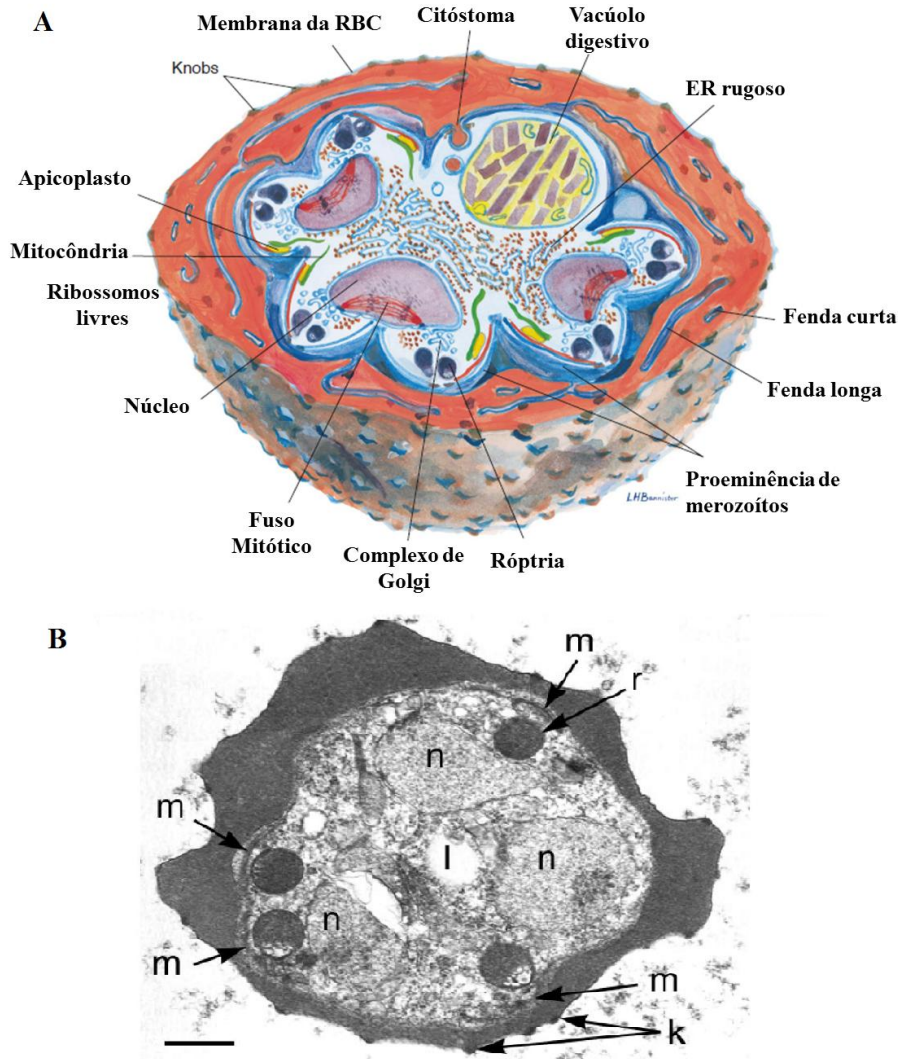


Figura 6: Morfologia do estágio esquizonte de *P. falciparum*. **A.** Esquema mostrando a organização do estágio esquizonte de *P. falciparum* perto do fim desta fase, dentro de uma hemácia cortada transversalmente para mostrar o parasito e a estrutura do eritrócito, incluindo fendas de Maurer (aqui 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 merozoíto 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 μ m. ER, retículo endoplasmático (adaptado BANNISTER *et al.*, 2000a).

O merozoíto é a forma invasiva dos protozoários do gênero *Plasmodium*, apresenta uma forma ovoide, com uma proeminência (proeminência apical) em uma das extremidades. Estas formas no *P. falciparum* medem cerca de 1,6 μm de comprimento e 1,0 μm de largura, aproximadamente o tamanho de uma bactéria. Apesar de ser uma forma minúscula, possui todo o aparato necessário para escapar do eritrócito após a esquizogonia e rapidamente, aderir e invadir um novo eritrócito. Embora o período que esta forma é extracelular ocorre rapidamente, vale ressaltar a sua importância imunológica, pois são expostos aos anticorpos do hospedeiro entre a saída de uma hemácia e a invasão de outra (HOPKINS *et al.*, 1999; NEVES *et al.*, 2011).

No corpo celular encontram-se numerosos ribossomos, uma mitocôndria e um plastídeo, o núcleo localizado basalmente. O citoesqueleto é mínimo, em que algumas destas organelas estão ancoradas, o que ajuda a dar forma ao merozoíto (PREISER *et al.*, 2000; BLACKMAN e BANNISTER, 2001).

Os merozoítos 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).

Neste estágio do parasito, sua superfície apresenta uma camada espessa eriçada, sendo cada cerda 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 1 do merozoíto (MSP), compreendendo as mais abundantes proteínas externas do merozoíto que são clivadas ou perdidas durante o processo de invasão. Existem outras duas membranas que estão ligadas a membrana plasmática do parasito por pontes cruzadas de filamentos e constituem a parte exterior e interior de um saco membranoso achatado denominado, cisterna (às vezes também chamado de alvéolo), que circunda a superfície inteira do parasito, com exceção da proeminência apical. As funções desta cisterna ainda não estão bem descritas, mas é provável que estejam relacionadas de alguma forma à invasão, porque estão presentes em oocinetos e esporozoítos, que também são formas de invasão do parasito em outras etapas do ciclo biológico (BANNISTER *et al.*, 2000a; PREISER *et al.*, 2000; BLACKMAN e BANNISTER, 2001; BANNISTER E MITCHELL, 2009).

As róptrias, micronemas e grânulos densos são vesículas membranosas que constituem as organelas apicais, importantes por liberarem seus conteúdos durante a invasão, causando uma mudança no formato e na composição da membrana do eritrócito invadido (HOPKINS *et al.*, 1999; PREISER *et al.*, 2000; BLACKMAN e BANNISTER, 2001; NEVES *et al.*, 2011).

As róptrias 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 róptrias e, provavelmente, liberam seu conteúdo através desses dutos na fase inicial da invasão. Os conteúdos destas duas organelas são importantes tanto na adesão dos merozoítos na superfície do eritrócito, quando na formação do vacúolo parasitóforo (HOPKINS *et al.*, 1999; BANNISTER *et al.*, 2000a; b; BLACKMAN e BANNISTER, 2001).

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 róptrias. Após a invasão eritrocitária, 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 (HOPKINS *et al.*, 1999; BANNISTER *et al.*, 2000a; b; PREISER *et al.*, 2000; BLACKMAN e BANNISTER, 2001; BANNISTER E MITCHELL, 2009).

A figura 7 representa a morfologia dos merozoítos de *P. falciparum*, mostrando todas as estruturas acima descritas.

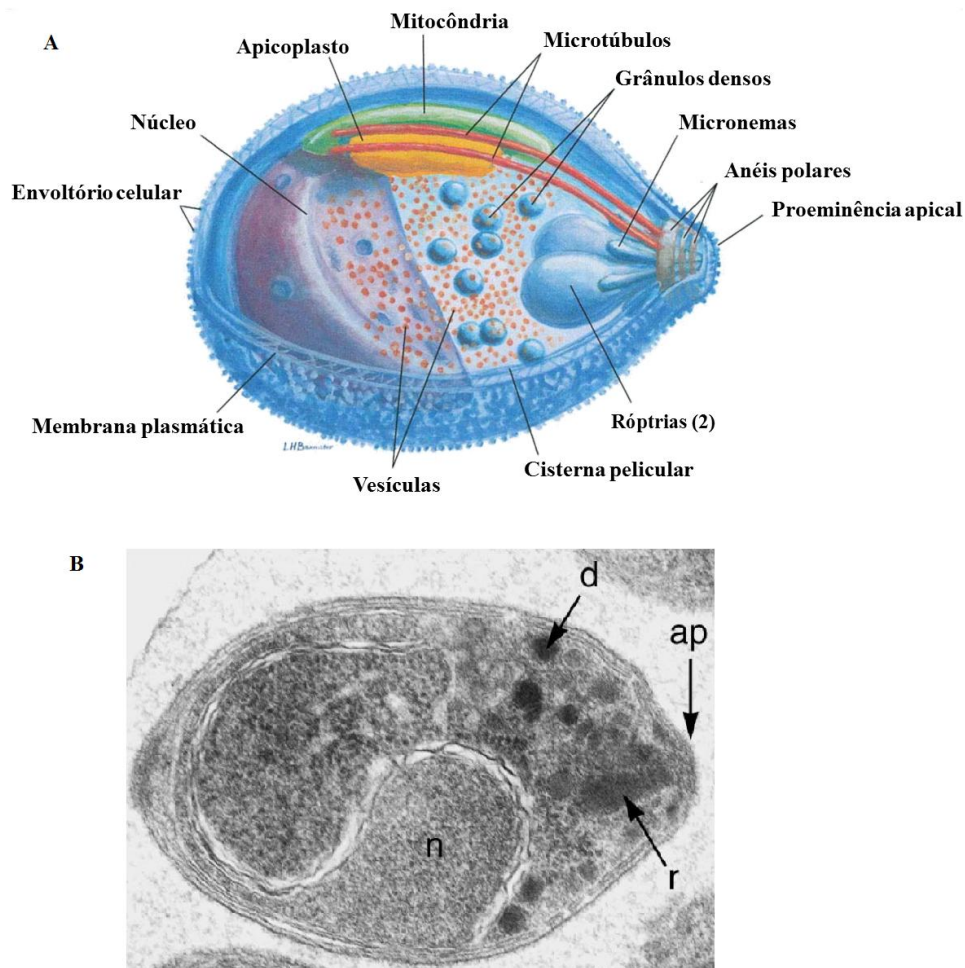


Figura 7: Morfologia do estágio de merozoítos de *Plasmodium falciparum*. **A.** Esquema mostrando a organização tridimensional de um merozoíto, com a película parcialmente cortada para mostrar as estruturas internas. **B.** Imagem de microscopia eletrônica de um merozoíto já formado mostrando a proeminência apical (ap) com uma róptria (r), grânulos densos (d), e um núcleo recortado (n). Barras de escala = 0,5 μm (adaptado BANNISTER *et al.*, 2000a).

1.5 Características da doença

As manifestações clínicas mais características desta doença são as febres intermitentes, que podem ocorrer a cada dois (malária terçã) ou três dias (malária quartã), dependendo da espécie, pois está relacionado ao ciclo de vida de cada espécie do parasito. Entretanto, em virtude da quimioprevenção da malária realizada ainda na fase de assincronismo das esquizogonias sanguíneas, é bastante comum a observação de febres irregulares (NEVES *et al.*, 2011; REY, 2011).

Outros sinais e sintomas comuns são: calafrios, sudorese, dores de cabeça, náuseas e vômitos, dores no corpo e mal-estar geral. Achados físicos podem incluir: temperaturas elevadas, transpiração, fraqueza, esplenomegalia, icterícia, hepatomegalia e aumento da frequência respiratória (BRASIL, 2008b; NEVES *et al.*, 2011).

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 9-14 dias, para *P. vivax* de 12-17 dias, para *P. ovale* 18-40 dias e para *P. malariae* de 16-18 dias. Logo após esta fase, um período sintomático inicial que precede a febre clássica se apresenta com cefaleia, mal-estar, cansaço e mialgia (NEVES *et al.*, 2011; REY, 2011).

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 costuma durar entre 6 a 10 horas (NEVES *et al.*, 2011; REY, 2011).

De forma geral, o quadro clínico da malária pode ser classificado em: Malária não complicada, malária grave ou complicada e malária de recaídas (GOMES *et al.*, 2011; OSORIO-DE-CASTRO *et al.*, 2011).

1.5.1 Malária não complicada

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*, e 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 a 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).

1.5.2 Malária grave e complicada

Indivíduos que apresentam imunodeficiência, bem como crianças e gestantes, podem apresentar manifestações mais graves da doença, podendo ser fatal em infecções causadas por *P. falciparum*. 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; NEVES *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. As formas clínicas da malária complicada são: malária cerebral, insuficiência renal aguda, edema pulmonar, hipoglicemia, icterícia e hemoglobinúria (GOMES *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011).

- Malária cerebral: esta forma clínica é causada pela espécie *P. falciparum*. 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; NEVES *et al.*, 2011).
- 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; NEVES *et al.*, 2011).
- 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; NEVES *et al.*, 2011).
- Hipoglicemia: mais frequente em crianças, ocorre geralmente em associação com outras complicações da doença, principalmente a malária cerebral. Pode ocorrer em mulheres grávidas com malária não complicada ou após o tratamento com quinina (GOMES *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011).
- Icterícia: 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; NEVES *et al.*, 2011).
- 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; NEVES *et al.*, 2011).

- Outras manifestações: pode ocorrer a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), que é uma reação inflamatória nos pulmões que inibe a troca de oxigênio, podendo se apresentar mesmo após a diminuição da parasitemia em resposta ao tratamento farmacológico; anormalidades na coagulação do sangue; hipotensão arterial causada pelo colapso cardiovascular e acidose metabólica, muitas vezes em associação com hipoglicemia (GOMES *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011).

A malária grave é uma emergência médica e deve ser tratada com urgência e de forma agressiva (GOMES *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011).

1.5.3 Malária de Recaídas

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).

1.5.4 Outras manifestações da Malária

Distúrbios neurológicos podem persistir, ocasionalmente, a malária cerebral, especialmente em crianças. Tais distúrbios incluem problemas com movimentos (ataxia), paralisias, dificuldades na fala, surdez e cegueira (GOMES *et al.*, 2011).

As infecções recorrentes com *P. falciparum* podem resultar em anemia grave. Isso ocorre especialmente em crianças pequenas na África tropical com infecções frequentes e que são inadequadamente tratadas (GOMES *et al.*, 2011).

A malária durante a gravidez (especialmente por *P. falciparum*) pode causar doença grave na mãe, podendo levar ao parto prematuro ou um bebê de baixo peso ao nascer (CHAGAS *et al.*, 2009).

Em raras ocasiões, *P. vivax* pode causar ruptura do baço (LACERDA, OLIVEIRA E ALECRIM, 2007).

A síndrome nefrótica (uma doença renal crônica grave) pode resultar de infecções crônicas ou repetidas com *P. malariae* (MARSDEN, 1990).

A Esplenomegalia Malárica Hiperreativa (também chamada de "Síndrome de Esplenomegalia Tropical") ocorre raramente e é atribuída a uma resposta imunológica anormal a

infecções maláricas repetidas. A doença é caracterizada por uma importante esplenomegalia e hepatomegalia, achados anormais imunológicos, anemia, e uma susceptibilidade a infecções por outro agente infeccioso (tal como a pele ou infecções respiratórias) (CRANE, 1992).

1.5.5 Diagnóstico

O principal método de diagnóstico da malária é a partir do exame parasitológico de sangue. A principal técnica é o esfregaço sanguíneo e a observação das formas eritrocitárias do parasito por microscopia.

No entanto, outros 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 o exame parasitológico de sangue (REY, 2011; WHO, 2013).

1.6 Tratamento da malária

A farmacoterapia da malária é realizada com quimioterápicos que tem como objetivo principal interromper a esquizogonia sanguínea, responsável pelas manifestações clínicas da doença (BANNISTER E MITCHELL, 2003; FRANÇA, SANTOS E FIGUEROA-VILLAR, 2008). Entretanto, devido ao seu ciclo biológico complexo com a existência diversos estágios de vida, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias, e a quimioprofilaxia em casos por *P. falciparum* no início da infecção, ainda na fase hepática. Os fármacos da classe 8- aminoquinolinas (primaquina e tafenoquina) são utilizados nestes casos específicos (ROBBERT *et al.*, 2001; NEVES *et al.*, 2011).

No entanto, o tratamento é longo, muitas vezes ineficaz devido às altas taxas de reinfecção do paciente, principalmente em regiões endêmicas e, ainda, frequentemente inacessível a população. Agregado a todos estes fatores que dificultam o combate à malária, ainda soma-se o crescente número de cepas resistentes a estas terapias disponíveis. Neste contexto, a busca por novas alternativas terapêuticas que se mostrem mais eficazes e acessíveis à população é de extrema importância (BANNISTER E MITCHELL, 2003; FRANÇA, SANTOS E FIGUEROA-VILLAR, 2008; NEVES *et al.*, 2011).

O tratamento da malária é baseado na quimioterapia, pois não existe vacina eficaz. Assim, o tratamento tem como objetivo interromper a multiplicação assexuada no ciclo intra-eritrocitário, responsável pela patogênese e pelos sintomas clínicos. Um tratamento rápido e eficiente é provavelmente o melhor método de combater a doença em função do custo-benefício (GUERIN *et al.*, 2002).

A terapêutica oral impede a progressão para um estado mais grave da doença e para as complicações resultantes. Se as drogas são administradas com eficiência, uma diminuição da morbidade bem como da mortalidade global relacionada à malária podem ser alcançadas. No entanto, a maioria das pessoas nas áreas endêmicas tem pouco acesso ao diagnóstico e ao tratamento. Além disso, o tratamento geralmente é inadequado devido à falta de disponibilidade de medicamentos eficazes e de qualidade assegurada (GUERIN *et al.*, 2002).

As plantas foram e continuam sendo fontes importantes de drogas. Um exemplo é o paclitaxel vendido como Taxol[®], um diterpeno derivado da árvore Teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia Nutt.*, utilizado para o tratamento de cânceres (WANI *et al.*, 1971). No caso da malária, a quinina, uma aminoquinolina alcalóide isolada a partir da casca de espécies de *Cinchona* por Pelletier e Caventou em 1820, ainda é utilizada como droga antimalarial, apesar de ter sido usada no desenvolvimento de drogas sintéticas como a cloroquina (1940) e a primaquina (1952), dentre outras. Até recentemente, a cloroquina era a única droga sintética utilizada no tratamento da malária (BATISTA, SILVA JUNIOR E DE OLIVEIRA *et al.* 2009).

Desde 1960, o surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes a drogas, particularmente à cloroquina, tem motivado a pesquisa de plantas medicinais antimalariais. Esses estudos levaram ao desenvolvimento 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. Infelizmente, *P. falciparum* já está desenvolvendo resistência à artemisinina e aos seus derivados (JAMBOU *et al.* 2005), assim como à terapia de combinação de drogas, como atovaquona e proguanil (WICHMANN *et al.* 2004).

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, a grande maioria dos agentes quimioterápicos antimaláricos existentes é baseada em produtos naturais. Desta forma, a biodiversidade de moléculas vegetais, principalmente advindas das plantas tropicais, continua sendo uma fonte importante de modelos moleculares na busca de medicamentos antipalúdicos. Ademais, um melhor entendimento da

biologia dos *P. vivax* e *P. falciparum* em nível molecular é um pré-requisito ao desenvolvimento fortemente esperado de estratégias terapêuticas alternativas (BIRKHOLTZ *et al.* 2008).

1.7 Resistência aos fármacos antimaláricos

A primeira medida de intervenção para o controle da malária se baseou na erradicação dos mosquitos do gênero *Anopheles*, 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 malária em mais de 10 países entre 1900 e 1946 (HAY *et al.*, 2004; PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

Entre 1955 e 1969, a OMS criou um programa para a erradicação da malária no mundo, denominado “*Global Malaria Eradication Programme*”, que tinha duas vertentes: 1) utilização do DDT para interromper a transmissão da malária, chamada de “fase de ataque”; 2) quimioprevenção com o emprego da cloroquina, denominada de “fase de consolidação” (Fig. 8). Os sucessos, os benefícios de longo prazo, os problemas de consolidação e manutenção têm sido documentadas, no entanto, esta estratégia fez com que mais 27 países (principalmente na Europa) declarassem a erradicação da malária (HAY *et al.*, 2004; GUERRA, SNOW E HAY, 2006; NÁJERA, GONZÁLEZ-SILVA E ALONSO, 2011; PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

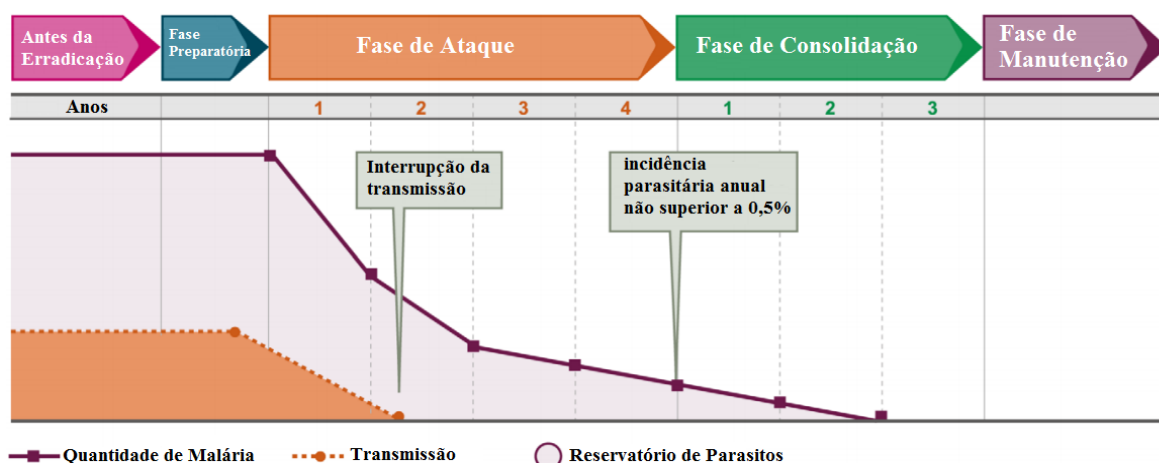


Figura 8: Fases da Campanha de Erradicação da Malária, conforme estabelecido pela OMS. (Adaptado NÁJERA, GONZÁLEZ-SILVA E ALONSO, 2011).

No entanto, a resistência generalizada aos inseticidas disponíveis, a existência de guerras e imigração da população, a impossibilidade para manter o programa de erradicação em países emergentes por causa da dificuldade de investimento financeiro, e por fim, a falta de participação da população limitaram a erradicação da malária e favoreceu o surgimento de cepas resistentes a cloroquina e, que, pelos mesmos motivos da limitação da erradicação, estas cepas de *P.falciparum* resistentes foram disseminadas entre os países que não conseguiram eliminar a doença, como mostra a figura 9, em que as regiões tropicais e subtropicais são as mais acometidas pela doença e pelo aparecimento das cepas resistentes (NÁJERA, GONZÁLEZ-SILVA E ALONSO, 2011; PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

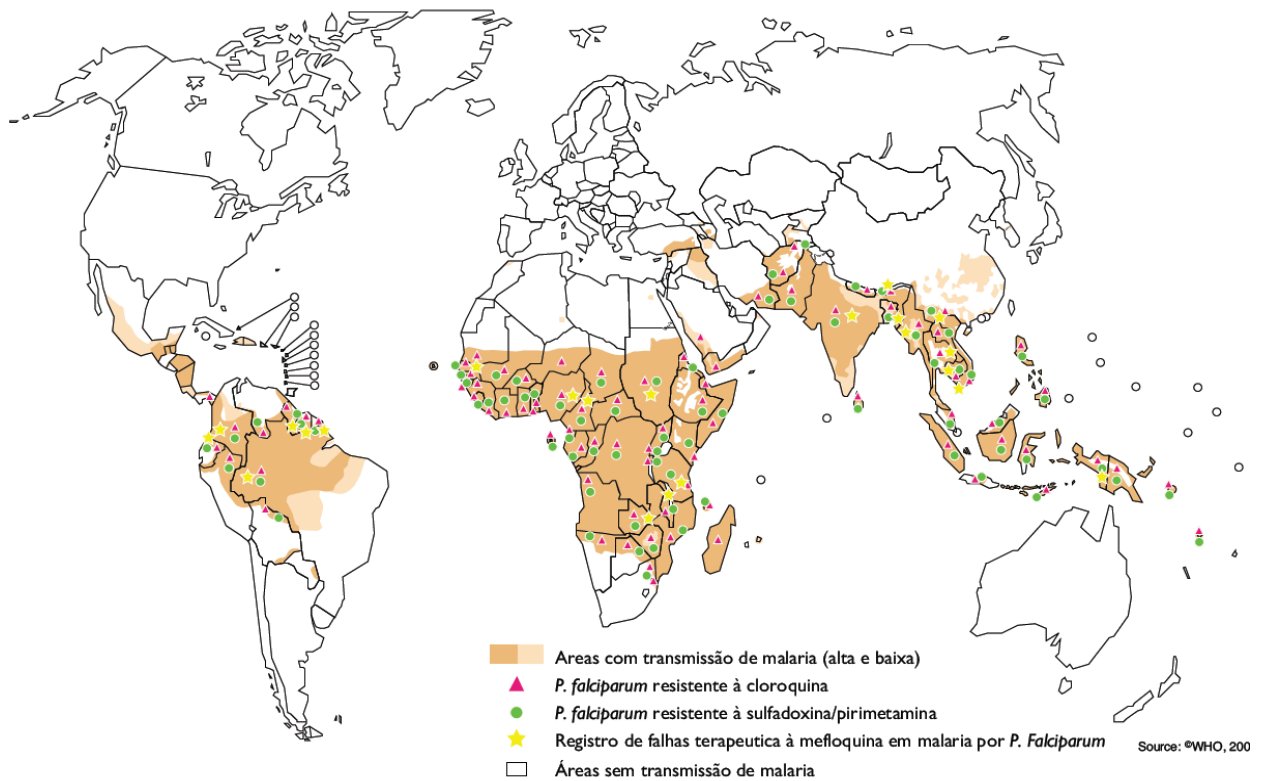


Figura 9: Distribuição epidemiológica da resistência de *P. falciparum* aos fármacos antimaláricos, centros sentinelas até 2004 (BRASIL, 2008b).

Após o surgimento das cepas resistentes a cloroquina, a partir de 1960, a alternativa terapêutica adotada para o tratamento da malária foi a sulfadoxina-pirimetamina (Fansidar), no entanto, rapidamente já 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, mas rapidamente surgem cepas resistentes, como mostra a tabela 1 (FIDOCK *et al.*, 2000; WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002; SIBLEY E PRICE, 2012).

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

Droga antimalarial	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

Fonte: adaptado de (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002)

O surgimento de cepas resistentes de *Plasmodium* aos quimioterápicos antimalariais é influenciado por vários fatores, dentre eles, a taxa de mutação do parasita, a carga parasitária, a seletividade das drogas e a adesão ao tratamento (PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

A taxa de mutação, em *P. falciparum*, é de aproximadamente 10^{-9} , considerado relativamente baixo (PAGET-MCNICOL E SAUL, 2001). O aumento da taxa de mutação é um processo adaptativo e vantajoso para o parasito, uma vez que favorece a sobrevivência deste às mudanças de ambiente, por sofrer seleção em resposta à exposição de drogas (PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

A influência da carga parasitária (infecções por *P. falciparum* com 10^{10} - 10^{12} parasitos em um indivíduo) no aparecimento de cepas resistentes parece estar relacionado com a eliminação mais rápida de mutações deletérias e melhorando, assim, a seleção de mutações de compensação (BLOLAND E ORGANIZATION, 2001; HASTINGS, PAGET-MCNICOL E SAUL, 2004).

A utilização inapropriada das drogas por dosagem 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 E ORGANIZATION, 2001; MÜLLER, 2011).

Petersen e colaboradores (2011) descreveram, de modo geral, os principais modelos hipotéticos para as vias de transporte de drogas antimaláricas e da localização do alvo destas drogas, ilustradas na figura 10. As principais proteínas de transporte envolvidas nestas vias são PfCRT – transportador de resistência a cloroquina, pfMDR1 – proteína de resistência a multidrogas 1 e PfMRP – proteína associadas a resistência a multidrogas.

PfCRT e pfMDR1 se localizam na porção interna da membrana do vacúolo digestivo (FIDOCK *et al.*, 2000; PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011), revelando a grande importância desta organela, tanto como alvo de drogas como na modulação da sensibilidade do parasito às terapias medicamentosas. Esta modulação por estas proteínas, provavelmente, está relacionada com o sequestro da droga para fora do vacúolo digestivo (alvo da ação das drogas antimalariais), ou na limitação do acúmulo das drogas neste. Já a PfMRP está localizada na membrana plasmática parasitária, atuando, possivelmente, como uma bomba de efluxo de drogas de modo geral (RAJ *et al.*, 2009).

A figura 10A mostra um esquema do possível mecanismo de resistência à cloroquina e amodiaquina. Estas duas moléculas possuem a estrutura química semelhante a 4-aminoquinolina, e por isso, os parasitos geralmente apresentam resistência cruzada entre elas. Portanto, provavelmente, possuem o mesmo alvo e a uma mesma via de transporte. A maioria das drogas que se acumula dentro do vacúolo digestivo do parasito sofre difusão passiva, mas pode ter sua concentração aumentada por meio da atividade de PfMDR1, uma vez que a susceptibilidade do parasito é aumentada quando este transportador está superexpresso. Ao passo que, quando PfCRT 76T está presente, os parasitos apresentaram resistência, pois este atua com uma bomba de efluxo, jogando as moléculas ativas da droga para fora do vacúolo digestivo, local de ação destas drogas, impedindo ou limitando os seus efeitos. No entanto, há pequenas variações na força de resistência a amodiaquina dependendo de mutações adicionais em PfCRT (principalmente nos aminoácidos 72-75), conquanto, este fenômeno não é observado para a cloroquina. Os polimorfismos N86Y em PfMDR1 pode aumentar ainda mais a resistência, supostamente por diminuir o transporte ativo para o vacúolo digestivo. Além disso, PfMRP, presumivelmente auxilia o efluxo ativo, pelo menos para a cloroquina (PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

Na figura 10B observa-se um mecanismo de resistência a mefloquina. O primeiro fator que confere resistência a esta droga é a amplificação de pfmdr1, resultando em aumento de sua expressão. Um mecanismo de ação de resistência à mefloquina, portanto, pode ser que a superexpressão de PfMDR1 que causa um acúmulo de mefloquina no vacúolo digestivo e seqüestro da droga para longe do seu local de ação hipotético, localizada fora do vacúolo digestivo. Alternativamente, a observação de que a mefloquina inibe a atividade de transportador PfMDR1 também poderia levar à hipótese de que esta atua diretamente na função de PfMDR1. PfMRP atua como uma bomba de efluxo de drogas, em geral, reduzindo a concentração de mefloquina dentro do parasito (PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

A figura 10C mostra um mecanismo de resistência à lumefantrina. Vale ressaltar que existem poucos dados sobre o alvo desta droga. No entanto, a evidência mais recente revela uma resistência cruzada inversa com cloroquina e uma influência de PfCRT e PfMDR1 haplótipos e o número de cópias de PfMDR1 na susceptibilidade à lumefantrina. Um tipo selvagem de PfMDR1 haplótipo (N86) e amplificação *pfmdr1* podem levar à resistência à lumefantrina. Além disso, tem sido mostrado que o tipo selvagem PfCRT (K76) também diminui a susceptibilidade. Se o transporte de drogas segue padrões semelhantes, tal como sugerido por cloroquina, amodiaquina e mefloquina, lumefantrina se acumula no vacúolo digestivo através do transporte ativo por *pfmdr1* em parasitos resistentes a lumefantrina e, podem existir vias de transporte potencialmente adicionais. Parasitos que possuem uma forma mutante do PfCRT (76T) podem apresentar maior suscetibilidade pelo transporte ativo desta proteína multada fora do vacúolo digestivo. Isto sugere que o alvo primário da lumefantrina é encontrado no citosol ou outra organela do parasito. Embora não testado, PfMRP pode ser capaz de transportar ativamente lumefantrina (PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

A figura 10D observa-se que os alvos da artemisinina e seus derivados permanecem ainda desconhecidos, mas foi sugerido que a artemisinina é ativada por ferro ferroso e, posteriormente, alquila moléculas como heme e proteínas específicas, perturbando assim o metabolismo do parasito e, finalmente, causando a sua morte. O ferro ferroso está presente tanto no vacúolo digestivo, bem como do lado de fora do vacúolo digestivo. Portanto, a artemisinina pode ativar e alquilar o heme e proteínas em ambos os compartimentos. O aumento da expressão do *pfmdr1* leva a uma fraca, mas significativa diminuição da suscetibilidade à artemisinina, sugerindo um acúmulo de artemisinina no vacúolo digestivo. Além disso, um *knock-out* de PfMRP aumenta a susceptibilidade a artemisinina, o que indica que ele atua como um transportador de efluxo de artemisinina. Com base em dados atuais, as concentrações mais elevadas no compartimento citosólico estão correlacionadas com um aumento da sensibilidade, sugerindo que a inativação de enzimas e proteínas citosólicas é mais prejudicial à sobrevivência do parasito do que a sua ação no vacúolo digestivo (PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

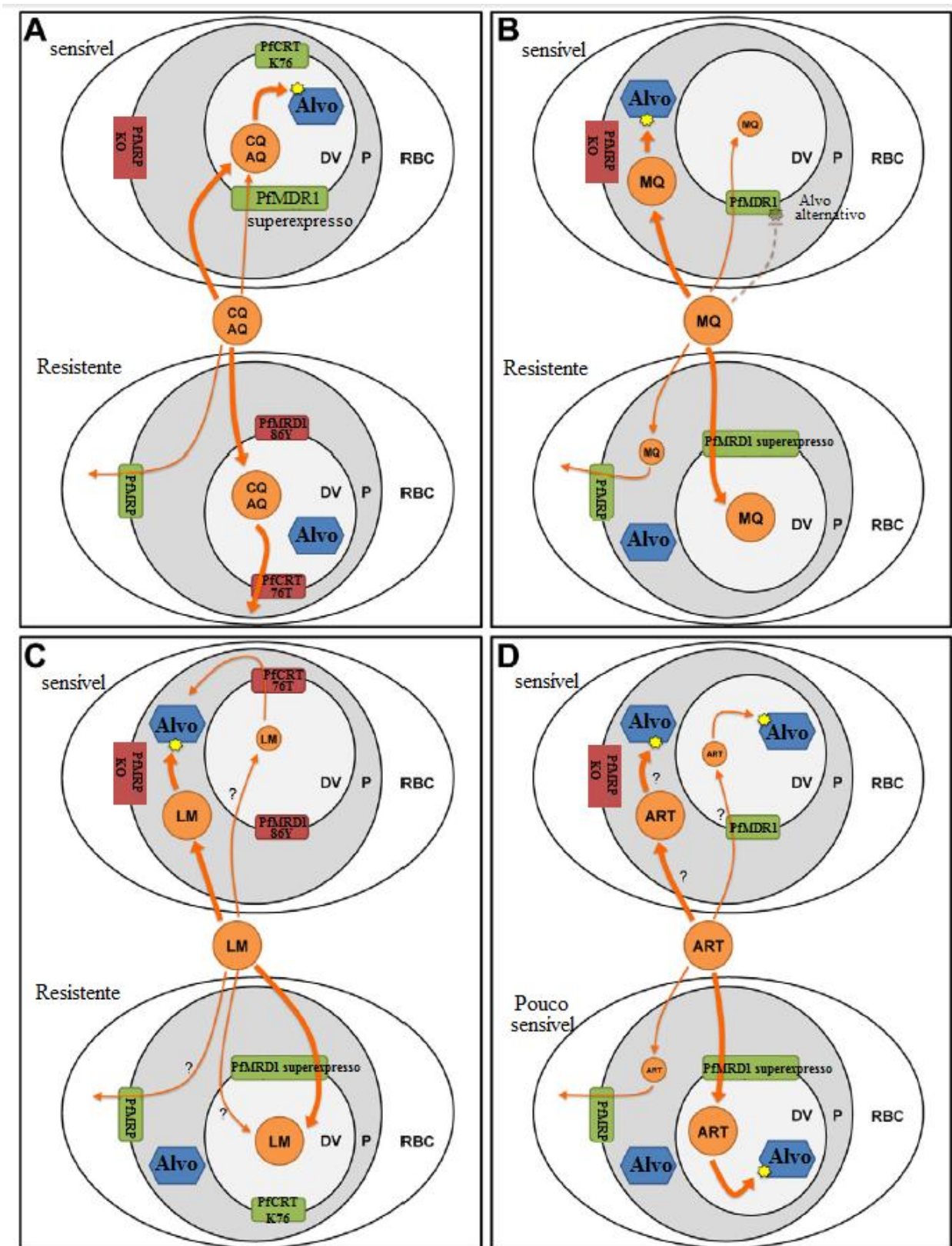


Figura 10: Modelos hipotéticos para as vias de transporte de drogas antimaláricas e localização do alvo de drogas. **A.** Mecanismo de resistência à cloroquina e amodiaquina. **B.** Mecanismo de resistência a mefloquina. **C.** Mecanismo de resistência a lumefantrina. **D.** Mecanismo de resistência a artemisinina e derivados. PfCRT: Transportador de resistência a cloroquina em *P. falciparum*; PfMDR1: transportador de resistência a multidrogas 1 de *P. falciparum*; PfMRP: proteína associada a resistência a multidrogas de *P. falciparum*; CQ: cloroquina; AQ: amodiaquina; MQ: mefloquina; LM: lumefantrina; ART: artemisinina (e derivados); KO: *knock-out*; RBC: hemácia/ eritrócito; P: parasito; DV: vacúolo digestivo (adaptado PETERSEN, EASTMAN E LANZER, 2011).

1.8 Testes de atividade antimalarial *in vitro*

O principal objetivo dos testes de atividade antiplasmodial *in vitro* consiste em avaliar ou medir a sensibilidade do *P. falciparum* a concentrações crescentes de drogas e/ou compostos. A interpretação dos resultados é realizada a partir da análise de gráficos denominados curva de dose-resposta, e são apresentados a partir do índice da porcentagem de inibição de 50 % do crescimento parasitário (IC₅₀) comparado com culturas não tratadas (NOGUEIRA E DO ROSÁRIO; 2010).

Existem vários métodos propostos para a avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro*. Os mais comuns são: contagem de esquizontes por meio da gota espessa, método conhecido como teste padrão de maturação de esquizontes da OMS, incorporação de precursor de ácido nucleico radiomarcado (hipoxantina tritiada, por exemplo), conhecido como ensaio isotópico (DESJARDINS *et al.*, 1979; CHULAY, HAYNES E DIGGS, 1983), quantificação das proteínas 2 rica em histidina (HRP2) e lactato desidrogenase (LDH) do parasita pelo ensaio imunoenzimático ELISA (DRUILHE *et al.*, 2001; NOEDL *et al.*, 2004), e o teste de intercalação no DNA com o uso de corantes (CORBETT *et al.*, 2004; SMILKSTEIN *et al.*, 2004). As características destes testes estão elencadas na tabela 2.

Contagem de esquizontes por meio da gota espessa é um teste baseado na contagem do número de parasitos após a avaliação da morfologia de seu crescimento utilizando microscopia óptica. A maior desvantagem desta metodologia é o fato de ser trabalhosa e susceptível a variações individuais. Porém, é um método simples e econômico, podendo ser realizado em estudos de campo. O microteste Mark III da OMS é a técnica padronizada desta metodologia (WERNSDORFER E KOUZNETSOV, 1980).

A metodologia considerada padrão ouro para a avaliação de atividade antiplasmodial contra *P. falciparum in vitro* é o ensaio com incorporação de hipoxantina tritiada (DESJARDINS *et al.*, 1979), método baseado na inibição da absorção de hipoxantina (purina utilizada para a síntese de ácidos nucleicos e metabolismo energético) radiomarcada por trítio (terceiro isótopo do hidrogênio - representado por ³H), pelo parasito para demonstrar o efeito da droga. A etanolamina é uma alternativa ao uso de hipoxantina tritiada, apresentando como maior vantagem à possibilidade de complementação do meio de cultura com hipoxantina para melhorar o crescimento do parasita. No entanto, existem outros marcadores, como o palmitato, serina, colina, inositol e isoleucina, que também são indicados para uso em testes isotópicos (ELABBADI, ANCELIN E VIAL, 1992). Desvantagens são: as normas referentes ao manuseio

de materiais radiativos, alto custo do equipamento necessário, como contadores de cintilação líquida e equipamentos de colheita (SMILKSTEIN *et al.*, 2004).

A quantificação das proteínas do parasita, denominados ensaios colorimétricos, é um método fácil de implementar e altamente reprodutível. As técnicas mais utilizadas são a detecção da atividade de LDH do *P. falciparum* (pLDH) e a avaliação de concentrações de proteína 2 rica em histidina 2 (*Histidine-rich protein 2* -HRP2) por ELISA e ensaios *double-site enzyme-linked LDH immunodetection* (DELI) (HOPKINS *et al.*, 2007; NOGUEIRA E DO ROSÁRIO; 2010).

O princípio do teste de atividade enzimática do pLDH, o mais comum dentro desta metodologia, é baseado na diferença estrutural existente do LDH do parasito em comparação com LDH humana, desta forma, há um declínio rápido dos níveis desta enzima do parasito quando ocorre a morte celular (BASCO *et al.*, 1995).

O ensaio DELI é baseado na quantificação da enzima LDH produzida pelo protozoário através do método de ELISA sanduíche de alta sensibilidade, utilizando dois anticorpos monoclonais (captura e revelador) direcionados contra epítomos distintos da pLDH (DRUILHE *et al.*, 2001; PRATT-RICCIO *et al.*, 2013).

O teste de HRP2 é baseado na avaliação do aumento das concentrações de HRP2 detectadas por anticorpos em amostras de cultura de *P. falciparum* que tiveram o crescimento inibido pela droga testada (NOEDL *et al.*, 2004).

E por fim, os testes de intercalação no DNA com o uso de corantes é baseado na quantificação automática do crescimento parasitário após sua ligação com corantes fluorescente para DNA. Os intercalantes mais utilizados são: DAPI, Picogreen, YOYO-1 e SYBR Green I (SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BANIECKI, WIRTH E CLARDY, 2007; JOHNSON *et al.*, 2007). Esta metodologia têm apresentado resultados comparáveis aos de testes isotópicos (tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre os testes mais utilizados para a avaliação da atividade antiplasmodial com parasitos na fase intra-eritrocitária.

	Microteste Mark III da OMS	Ensaio Isotópico	Ensaio Enzimático pLDH	Ensaio pLDH DELI	Ensaio HRP2	Teste de intercalação no DNA*
Sensibilidade	alta	alta [#]	baixa	alta	alta	alta
Tempo de cultura	24 h	42 h (até 72 h)	48 h	48 h	48 h – 72 h	72 h
Parasitemia Inicial	0,6 – 0,8%	--	0,5%	0,5% [†]	0,01 – 0,1%	0,05% -0,8% [‡]
Avaliação da inibição do crescimento	Microscopia (maturação dos esquizontes)	Incorporação de precursores radiomarcados	Atividade enzimática de pLDH	ELISA	ELISA	Fluorescência
Demanda de equipamento	Baixa (microscópio)	Alta (contador de cintilação)	Moderada (leitor de microplaca)	Moderada (leitor de microplaca)	Moderada (leitor de microplaca)	Moderada (fluorímetro)
Carga de trabalho envolvida	alta	baixa	baixa	moderada	baixa	baixa

*Corantes mais utilizados: SYBR Green I, Picogreen, DAPI e YOYO-1; [†]Densidades parasitárias a partir de 0,005% podem ser testadas; [‡]No caso da cor YOYO1, é feita a detecção por meio da separação de células ativadas por fluorescência (FACS) em um aparelho bastante caro. [#]Para parasitemias > 0,5% (NOGUEIRA E DO ROSÁRIO; 2010).

1.9 Morte celular e autofagia em *P. falciparum*

Existem vários processos que estão envolvidos na morte celular, tais como: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência. Estes processos são diferenciados entre si de acordo com as características morfológicas e bioquímicas específicas de cada um (DANIAL E KORSMEYER, 2004; GRIVICICH, REGNER E ROCHA, 2007).

Apoptose é definida como um processo de morte celular programada, ou seja, é um processo de “autodestruição celular”, requerendo energia e síntese proteica, exercendo o papel oposto ao da mitose. Assim, a sua função principal é a manutenção da homeostase (KERR, WYLLIE E CURRIE, 1972; HENGARTNER, 2000; GRIVICICH, REGNER E ROCHA, 2007; TOTINO *et al.*, 2008).

Já a autofagia é um processo acionado em resposta a condições que levam a um estresse metabólico gerando a degradação de componentes celulares. É considerado um processo celular fisiológico, adaptativo, conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Durante a autofagia, partes do citoplasma são envolvidas por uma membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos, que irão se juntar com os lisossomos para degradar os constituintes celulares (GRIVICICH, REGNER E ROCHA, 2007; BRENNAND *et al.*, 2011; TOMLINS *et al.*, 2013; CERVANTES *et al.*, 2014).

Por muito tempo, pensava-se que a apoptose era um evento molecular de organismos multicelulares, mas estudos recentes têm demonstrado que organismo unicelulares, incluindo protozoários, como *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, *Leishmania major* e *Plasmodium berghei* também sofrem apoptose. Neste último, foi possível observar características típicas da morte programada de células de mamífero, incluindo a condensação da cromatina, fragmentação do DNA, o aparecimento de fosfatidilserina (PS) no folheto exterior da membrana plasmática e formação eventual de corpos apoptóticos (PICOT *et al.*, 1997; AMEISEN, 1998; MUTAI E WAITUMBI, 2010).

Estudos recentes envolvendo *P. falciparum*, utilizando um indutor de apoptose, etoposido ou a cloroquina, observaram-se a fragmentação do DNA mitocondrial e mudanças do potencial de membrana em fases eritrocitárias (PICOT *et al.*, 1997; MESLIN *et al.*, 2007; MUTAI E WAITUMBI, 2010). Embora já existam homólogos de caspases descritos em metazoários, estas ainda foram identificados em *Plasmodium*, existindo apenas duas proteases de cisteína anotadas (Pf13 - 0289 e Pf - 0363) na base de dados do genoma de *P. falciparum* (MUTAI E WAITUMBI, 2009). No entanto, Al-Olayan, Williams e Hurd (2002) fizeram um estudo utilizando dois inibidores de caspases, Z-VAD.fmk (*benziloilcarbonil - Val - Ala - Asp*

flouromethylketone) e Z.DEVD.FMK (*Benziloxycarbonil - Asp - Glu - Val - Asp - flouromethylketone*) e observaram que houve uma inibição da apoptose em *Plasmodium*, levantando a hipótese da presença de caspases neste protozoário e a função destas proteínas pode ser crucial para o processo de apoptose em *Plasmodium*.

Uma proteína (PfARP) codificada por um gene relacionado a apoptose foi purificada e caracterizada em *P. falciparum*, no entanto o papel desta proteína no crescimento, na fase de multiplicação e progressão não foi descrito (GUHA *et al.*, 2007).

Em células eucarióticas, a autofagia consiste em uma série de etapas sequenciais, que são: seleção e marcação da carga, o reconhecimento e o transporte da maquinaria proteolítica, degradação da carga e reciclagem de pequenos polipeptídios ou aminoácidos. As proteínas e organelas, alvos de degradação, são envolvidas por uma membrana dupla para formar uma autofagossomo que se funde com um lisossomo para serem degradados (BRENNAND *et al.*, 2011; SINAI E ROEPE, 2012; CERVANTES *et al.*, 2014).

Existem três principais processos de degradação de componentes celulares que são mediados por membrana e conservados na maioria dos eucariotos: 1) macroautofagia, que envolve a remoção de proteínas desnecessárias e organelas danificadas; 2) microautofagia, que ocorre quando o lisossomo envolve diretamente o material citoplasmático, e 3) autofagia mediada por acompanhante (CMA) que depende de uma proteína chaperona para translocar as proteínas desdobradas individualmente para o lisossomo. Como é um processo molecular inespecífico envolvido na reciclagem de proteínas para manter a homeostase em condições de estresse metabólico, a autofagia está envolvida no envelhecimento, degradação de patógenos, diferenciação celular e remoção de organelas velhas ou danificadas (BRENNAND *et al.*, 2011; SINAI E ROEPE, 2012; CERVANTES *et al.*, 2014).

O ciclo biológico do *P. falciparum* envolve várias etapas de diferenciação celular que são necessárias para a morfogênese das várias formas de vida do parasito, além de passar por períodos que podem gerar um estresse metabólico, como restrição de nutrientes, mudanças de pH e temperatura, sendo assim, proteínas e organelas específicas de cada estágio são degradadas em cada uma destas etapas ou em resposta às condições as quais o parasito está exposto. Neste sentido, o entendimento das proteínas e da regulação das vias envolvidas neste processo de degradação é de fundamental importância para o entendimento da biologia do parasito, bem como podem ser alvos de fármacos para o tratamento da malária (BRENNAND *et al.*, 2011; CERVANTES *et al.*, 2014).

Apesar da apoptose ser um mecanismo bem descrito em protozoários, inclusive aos do filo Apicomplexa, como *Toxoplasma gondii*, *P. berghei* e *P. falciparum*, existem alguns

estudos *in vitro*, com as formas do ciclo eritrocitário de *P. falciparum*, que mostram que a morte induzida por diferentes estímulos ocorreu sem a fragmentação do DNA, sugerindo que a morte celular neste protozoário pode não estar relacionada com a apoptose, mas poderia estar relacionada com a morte celular por autofagia (DOSREIS E BARCINSKI, 2001; NYAKERIGA *et al.*, 2006; LE CHAT, SINDEN E DESSENS, 2007; TOTINO *et al.*, 2008).

Totino e colaboradores (2007) demonstraram que a morte celular ocasionada pela ação da cloroquina, pressão por S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) ou estaurosporina não estavam relacionadas a apoptose, mas a um processo de morte celular independente de caspase, caracterizado por vacuolização citoplasmática, semelhante à morte celular causada por autofagia.

Atualmente, mais de 30 genes de proteínas relacionadas à autofagia (ATG) em leveduras e humanos estão descritos na literatura. Estes genes têm se mostrado conservados em eucariotos, entretanto, estudos preliminares com protozoários tem revelado que estes genes são muito diversificados, estando, por vezes, modificados, perdidos ou expandidos, provavelmente em virtude dos ciclos biológicos adaptativos. De forma geral, a autofagia em protozoários parece desempenhar um papel crítico para a sobrevivência dos parasitos (TOTINO *et al.*, 2008; BRENNAND *et al.*, 2011; CERVANTES *et al.*, 2014).

1.10 A rottlerin

No passado, em uma abordagem abrangente através de um *screening* com diversas moléculas comerciais, conhecidas por suas propriedades especiais em outros sistemas (inibidores de quinases), com o objetivo de identificar ferramentas específicas para o estudo do desenvolvimento do parasito ao definir os efeitos biológicos destas moléculas em diferentes fases do ciclo eritrocitário, foi mostrado pelo grupo que a rottlerin tinha uma alta atividade antiplasmodial (0,9 μ M para cepas sensíveis e resistentes a cloroquina) e causava a morte do *P. falciparum* especificadamente no momento da morfogênese dos merozoítos.

A rottlerin, também conhecida como malotoxina, é o principal composto fenólico extraído da planta *Mallotus philippinensis* (MAIOLI *et al.*, 2009).

Esta planta é conhecida popularmente como Kamala e é geralmente encontrada em ecossistemas mistos com outras espécies, tanto em florestas como em cerrado aberto. A sua distribuição é predominante no sul da Ásia e Oceania, encontrada desde o ocidente dos Himalaias, Índia, Sri Lanka, até o sul da China, na Malásia, Austrália e Melanésia (ORWA *et al.*, 2009). Esta planta é utilizada popularmente para: a) o tratamento de infecções por

parasitos da pele; b) como anti-helmíntico; c) o extrato em hexacloroetano é utilizado no tratamento de vermes do fígado em bovinos e d) se tem relatos da utilização dos frutos e das cascas para o tratamento de teníase e úlceras de estômago (SHARMA E VARMA, 2011).

A fórmula química da rottlerin 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. 11) (SIGMA-ALDRICH).

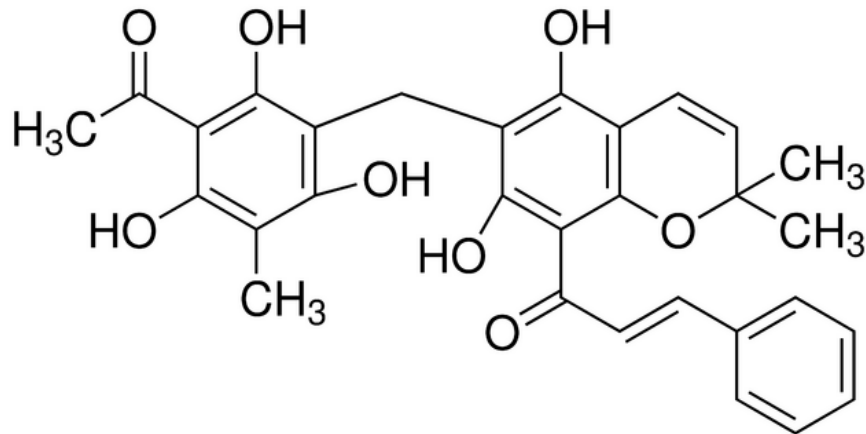


Figura 11: Estrutura química da rottlerin (SIGMA-ALDRICH).

Esta molécula foi inicialmente descrita como um inibidor da proteína quinase C (PKC), em particular, de PKC δ (inibição 5 a 10 vezes maior do que para outros isotipos de PKC). No entanto, é capaz de inibir outros tipos de quinase, por exemplo, PKA, caseína quinase II, cálcio-calmodulina quinase III e EF-2 quinase (GSCHWENDT *et al.*, 1994). Ademais, já se tem relatos na literatura da sua potencial ação como indutor de autofagia (BALGI *et al.*, 2009).

1.10.1 Rottlerin como inibidor da morfogênese de merozoítos, o contexto científico

O mecanismo de ação da rottlerin no *P. falciparum* ainda não é conhecido. No entanto, as hipóteses existentes a cerca dos mecanismos de ação desta molécula neste parasito são: inibição da diferenciação do merozoítos com indução da morte celular por apoptose ou autofagia.

No intuito de observar a morfologia da morte celular induzida pela rottlerin em *P. falciparum*, o grupo utilizou uma abordagem por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Nesta abordagem, todas as formas do ciclo eritrocitário foram submetidos ao tratamento com

1 μM da droga, e imagens foram adquiridas. No entanto, a morte celular foi observada apenas na forma esquizonte, como mostra a figura 12.

No tempo 0 do experimento observa-se a formação dos núcleos em um esquizonte jovem. Quatro horas após o tratamento com rottlerin 1 μM , observa-se uma desregulação das estruturas e o aparecimento de algumas vesículas intracelulares. Mais 4 horas, observa-se uma morfologia anormal do esquizonte devido ao que parecer ser uma lise do parasito dentro da hemácia sem o rompimento da membrana do vacúolo parasitóforo (Fig. 12).

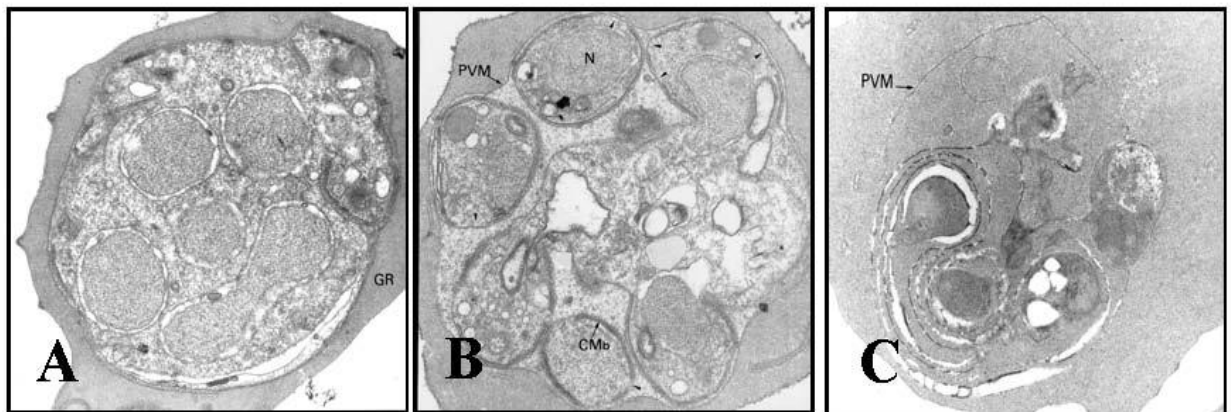


Figura 12: Efeitos da rottlerin na morfogênese de merozoítos. Ultra-estrutura de esquizontes tratados com 1 μM de rottlerin por microscopia eletrônica de transmissão. **A.** Tratamento antiparasitário no tempo 0 do tratamento. **B.** Parasitos tratados por 4 horas. **C.** Parasitos tratados por 8 horas. Lise seletiva do parasito (C) ocorre após o início da formação de merozoítos (B), sem prejuízo aparente para a membrana do vacúolo parasitóforo (PVM) (Grellier, 2005, dados não publicados).

Concluindo que a aplicação da rottlerin na cultura de *P. falciparum* no estágio esquizonte não maduro (merozoítos em que não foram individualizadas), causa uma lise celular “espetacular” do parasito durante a maturação dos merozoítos, entre 42 e 48 horas do ciclo biológico (Fig. 13). Morfologicamente, esta morte celular parece uma autofagia.

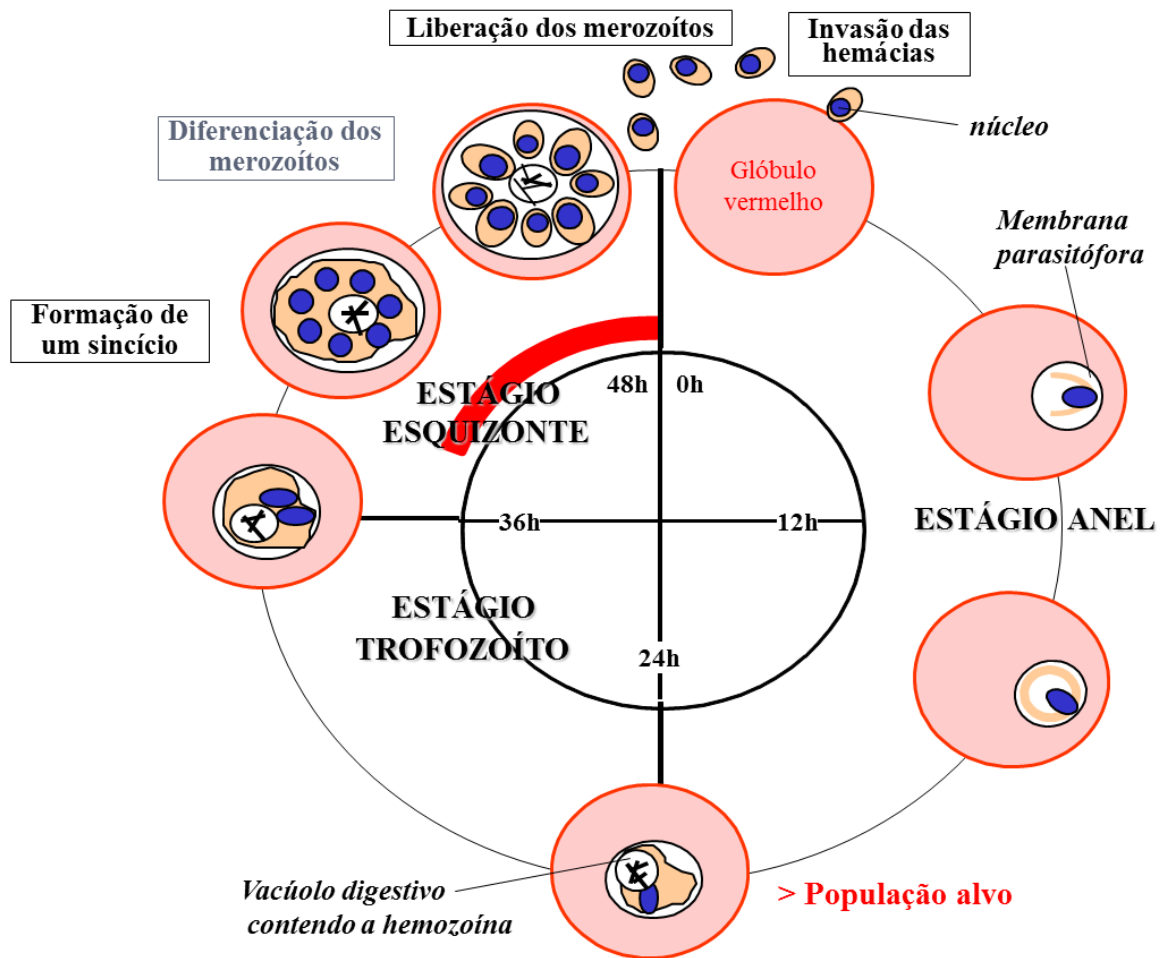


Figura 13: Ciclo eritrocitário do *P. falciparum* em que a rottlerin age na faixa entre 42 - 48 h (adaptação de CHARNEAU, 2005).

Totino e colaboradores (2007), também utilizaram a Microscopia Eletrônica de Transmissão para observar a morfologia da morte celular induzida por um inibidor de proteína quinase (mais específico da PKA), a estaurosporina, da cloroquina ou S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). Como mostra a figura 14, estes estímulos não são específicos do estágio esquizonte, mas a morfologia da morte celular é semelhante ao que foi observado com o tratamento com a rottlerin, ou seja, ocorre uma desorganização das estruturas celulares, dificultando a identificação das mesmas. Além disso, acontece a formação de vesículas intracelulares e sem a fragmentação do DNA aparente. Por estes motivos, a morte celular causada por estas moléculas foi descrita como potencialmente uma autofagia (TOTINO *et al.*, 2008).

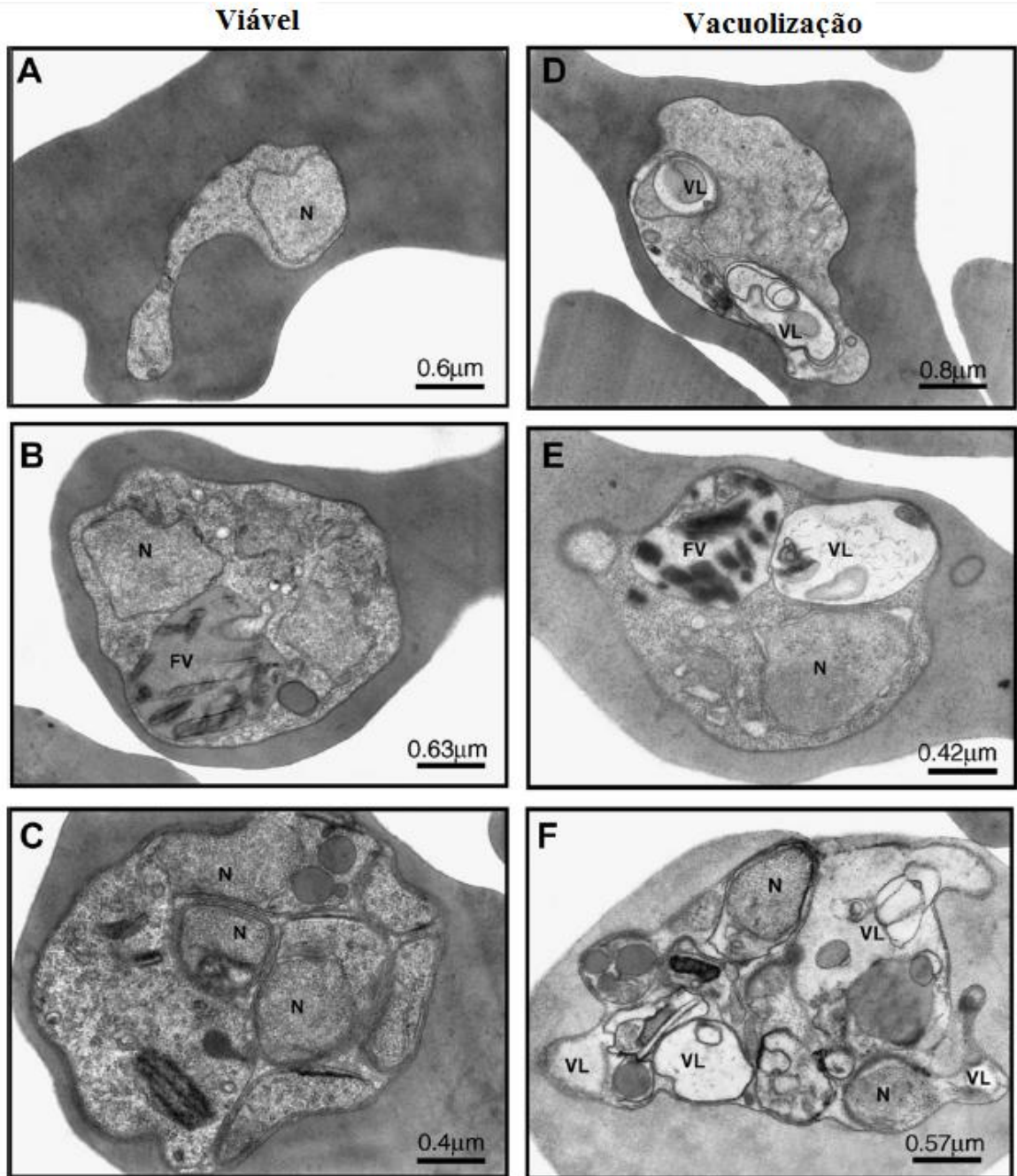


Figura 14: Eletromicrografias de *P. falciparum* mostrando a morfologia da morte celular parecida ao processo de autofagia na presença de estaurosporina, SNAP ou cloroquina. (A-C) parasitos viáveis observados nas culturas não tratadas: **A.** trofozóito jovem, **B.** trofozóito maduro e **C.** esquizontes. (D-F) processo de vacuolização sem condensação da cromatina (E e F) em parasitos tratados em cultura. FV: vacúolo digestivo; N: núcleo; VL: vacuolização (TOTINO *et al.*, 2008).

Embora reconhecendo as limitações da técnica de *microarray* de cDNA para *Plasmodium*, no passado o grupo utilizou esta metodologia para identificar genes cuja expressão é modulada por essa molécula nas últimas horas do ciclo intra-eritrocitário, na expectativa de entender melhor o mecanismo de ação da rottlerin e os eventos moleculares associados com a fase de diferenciação dos merozoítos após 1h30 e 3 h de tratamento.

Algumas proteínas moduladas pela rottlerin ao nível transcricional experimentalmente são relacionadas com os processos de transdução de sinal celular: fosfatase quinase, ou proteína fosfolipase D com domínio de interação com quinases. Este conjunto de proteínas pode estar envolvido 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.

Ademais, como a rottlerin é um inibidor de proteínas quinases, conseqüentemente é tentador considerar uma desregulação do fenômeno de fosforilação/defosforilação.

A fosforilação/defosforilação 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 implicada 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%) estão sujeitas aos processos de fosforilação/defosforilação (COHEN, 1992; LECHWARD *et al.*, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Devido ao rápido surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado, em conjunto com o desinteresse de indústrias farmacêuticas em desenvolver novos medicamentos contra a doença (BRASIL, 2008a; FRANÇA, SANTOS E FIGUEROA-VILLAR, 2008), dá-se a importância da realização de estudos que busquem novas alternativas terapêuticas contra a malária, além de elucidar os mecanismos de ação de substâncias com comprovada ação antiplasmodial, como por exemplo, a rottlerin.

Os produtos naturais desempenham um papel crucial na busca por moléculas com atividades antimaláricas, visto que a maior parte dos agentes quimioterápicos utilizados no tratamento da malária é proveniente de moléculas isoladas a partir de produtos naturais (BIRKHOLTZ *et al.*, 2008). O Brasil possui biomas de repercussão internacional, tendo a Floresta Amazônica (maior floresta tropical do mundo) como a principal, com uma incrível biodiversidade, seguida pelo Cerrado, um bioma ameaçado e ainda pouco explorado, que possui a flora mais rica de todas as savanas mundiais, podendo constituir um reservatório potencial de moléculas com atividade terapêutica (EMBRAPA, 2008).

Estudos da biodiversidade do Cerrado podem contribuir para a descoberta de moléculas e/ou compostos para o tratamento de doenças parasitárias tropicais como a malária, assim como aumentar o conhecimento da biodiversidade que é essencial para a conservação deste bioma e o desenvolvimento sustentável (ESPINDOLA-DARVENNE, 2007). Somando-se, ao conhecimento mais detalhado sobre a biologia do *P. falciparum* em nível molecular, torna-se possível o desenvolvimento consistente de novas alternativas terapêuticas contra a malária (LE ROCH *et al.*, 2004; PAOLINI *et al.*, 2006; SAWYER, 2006; BIRKHOLTZ *et al.*, 2008).

Proteínas quinases desempenham um papel essencial em muitas funções celulares, o que as torna alvos muito atraentes para o desenvolvimento de novas drogas. Foi demonstrado que o efeito da rottlerin, inibidor de proteína quinase C, causa a morte rápida de *P. falciparum* *in vitro*, ao ser aplicada nas horas finais do ciclo intra-eritrocitário, durante a diferenciação dos merozoítos (Dados obtidos pelo Prof. Philippe Grellier, MNHN, França). Sendo esta fase crucial para a propagação do *Plasmodium*, o entendimento da sequência ordenada dos eventos relacionado à morte celular induzida pela rottlerin, 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.

Nesse contexto, a implantação de uma linha de pesquisa sobre a malária na região Centro-Oeste do país e mais precisamente no Distrito Federal, para a exploração da biodiversidade brasileira na busca de novos fármacos antimaláricos eficazes bem como de novos alvos plasmódio-específicos, poderá ser um avanço tanto para o estudo da doença por proteômica funcional, bem como para o desenvolvimento da região, carente nesta área, permitindo a descentralização das pesquisas em malária, hoje concentradas na região Sudeste.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi dar prosseguimento ao estudo da diferenciação celular do *P. falciparum* e implementar no Instituto de Biologia da UnB uma metodologia para a avaliação da atividade antimalárica de compostos.

3.2 Objetivos específicos

Seguiram-se duas vertentes principais: (i) avaliação da atividade antiplasmodial de subfrações do extrato de folhas da planta *Qualea grandiflora* através de testes *in vitro* baseados em fluorescência e radioatividade na busca de nova estratégia quimioterapêutica; (ii) observar os efeitos da rottlerin sobre o ciclo biológico do parasito por métodos bioquímicos e citofluorimétricos, e assim, ter subsídios comprovados da ação desta molécula sobre a esquizogonia eritrocitária do *P. falciparum*.

3.3 Etapas metodológicas

Para atingir os objetivos citados acima, as seguintes etapas metodológicas foram realizadas:

- Implementar o teste de atividade antiplasmodial *in vitro*, no laboratório.
- Realizar a prospecção *in vitro* da atividade antiplasmodial de extratos e da planta *Q. grandiflora*, coletada no Cerrado e disponibilizados pelo Professor Fabian Borghetti (Departamento de Botânica/ UnB).
- Determinar o valor de IC₅₀ da rottlerin sobre a cepa cultivada no laboratório.
- Avaliar a hemólise e a citotoxicidade para células de mamíferos das substâncias naturais com atividade antiplasmodial.
- Avaliar os efeitos da rottlerin no ciclo biológico de *P. falciparum* através de análises por citometria de fluxo.
- Analisar a modulação da expressão proteica do parasito e sua dinâmica induzida pela droga, por uma abordagem proteômica comparativa baseada em géis bidimensionais de população de esquizontes tratada e não tratada pela droga.
- Identificar proteínas, cuja expressão é modulada, por espectrometria de massas e busca nos bancos de dados.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Isolados, fornecidos pelo Prof. Dr. Fábio T. M. Costa da UNICAMP, de *P. falciparum* resistentes ou não a cloroquina, respectivamente S20 e 3D7 (cepa de referencia de sequenciamento do genoma) foram mantidos em cultura contínua em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 0,4% de glicose, 0,2% de bicarbonato de sódio, 25 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 0,0005% de hipoxantina, 100 µg/ mL de gentamicina e 0,5% de AlbuMax II® (Gibco BRL, Life Technologies, USA) ou de 8% de soro humano descomplementado como descrito por Trager & Jensen (1976) no Laboratório de Interação Parasito-hospedeiro, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

Os parasitos foram cultivados em eritrócitos humanos (A⁺ e/ou O⁺) com hematócrito final de 2% (v/v). Foram incubados a 37 °C, sob atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) com troca diária de meio (TRAGER E JENSEN, 1976).

Os eritrócitos utilizados foram submetidos, previamente, a três lavagens com meio RPMI 1640 para eliminar os leucócitos. A parasitemia foi avaliada diariamente por observação microscópica de esfregaços sanguíneos coradas com o conjunto de corantes panópticos para coloração diferencial rápida em hematologia (Instant Prov, Newprov Produtos para Laboratório LTDA, Brasil).

4.2 Subfrações do extrato de folhas da planta *Qualea grandiflora* a partir do acetato de etila

As subfrações do extrato da planta *Qualea grandiflora* do Cerrado foram fornecidas pelo Professor Fabian Borghetti do departamento Botânico do Instituto de Biologia da UnB.

As extrações foram feita com ultrassom em 3 solventes sucessivos de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila. A extração com hexano e diclorometano foi conduzida por duas vezes por 1 hora cada, com renovação do solvente, já para o acetato de etila, sendo o extrato de interesse, o procedimento foi conduzido três vezes. O material obtido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner, usando papel de filtro e após foi seco em evaporador rotativo.

Coleta foi feita em julho de 2010, o peso seco das folhas foi de 352 g e o rendimento de 3,98 g de extrato a partir de acetato de etila. Este extrato foi subfracionado por cromatografia em coluna de sílica-gel (60 cm altura e 3 cm de diâmetro). Foram utilizados os eluentes acetato de etila: hexano em ordem crescente de polaridade (10 a 100%), acetona e

metanol. A quantidade de solvente aplicado foi determinada pela capacidade de arraste em cada concentração. Foram coletadas subfrações que posteriormente foram agrupadas com base na cromatografia em camada delgada (CCD) de acordo com a semelhança e pureza dos componentes revelados. A cromatografia por camada delgada foi realizada em placas (Alugram Sil G/ UV254) de tamanho 4 x 5 cm, com eluente acetato de etila: hexano, reveladas com Oleum (ácido sulfúrico, água e ácido acético, na proporção 1:4:20) e queimadas a aproximadamente 150 °C. As subfrações foram agrupadas e secas em evaporador rotativo. Gerando 10 subfrações (F1 a F10) com os seguintes pesos F1-42,8 mg; F2-33,3 mg; F3-14,6 mg; F4-8,1 mg; F5-4,3 mg; F6-15,6 mg; F7-7,8 mg; F8-3 mg; F9-1 mg; F10-10,7 mg.

As frações foram subseqüentemente dissolvidas em DMSO (dimetilsulfoxido) e homogeneizadas em banho de ultrassom a uma concentração estoque de 10 mg/mL e estocadas a -20 °C.

4.3 Bioensaios da atividade antimalarial *in vitro*

4.3.1 Ensaio de incorporação de hipoxantina tritiada

O ensaio *in vitro* para a avaliação da susceptibilidade dos parasitos as frações de *Q. grandiflora* foi medida através da incorporação de [³H]-hipoxantina como descrito por Desjardins e colaboradores (1979) e Guillon e colaboradores (2004). Este método baseia-se na avaliação da absorção de um precursor de ácido nucleico (hipoxantina) marcado radioativamente pelo parasita em cultura durante um curto prazo em placas de microtitulação. Desta forma, quando há morte do parasito pelo composto e/ou extrato e /ou droga testada, observa-se uma diminuição da absorção deste precursor.

Para este teste, os parasitos foram previamente cultivados em meio isento de hipoxantina por pelo menos 72 horas.

As frações da planta foram diluídas com um fator de dois, em 100 µL por poço de meio de cultura RPMI suplementado em placas de 96 poços. Após o preparo das placas com os compostos teste e controles, culturas assincronizadas do parasito (100 µL, contendo 1% de parasitemia e 1% de hematócrito final) foram então adicionados a cada poço e incubou-se durante 24 horas a 37 °C, antes da adição de 0,5 µCi [³H]-hipoxantina (GE Healthcare, França, à 1 a 5 Ci • mmol / mL) por poço. Após este segundo período de incubação, as placas foram congeladas a -20 °C e descongeladas para promover a lise das hemácias.

Lisados celulares foram coletados em filtros de fibra de vidro e quantificados em espectrômetro de cintilação em líquido (Microbeta, Wallac, Perkin-Elmer). A inibição do crescimento para cada concentração de extrato foi determinada por comparação da radioatividade incorporada na cultura tratada com a cultura controle não tratada e mantidas na mesma placa. As concentrações que causam 50% e 90% de inibição de crescimento (IC_{50} e IC_{90}) foram determinadas por análise de regressão linear a partir da curva de resposta à concentração da droga. Os resultados foram expressos como as médias dos valores \pm desvios padrão determinadas a partir de três experimentos independentes. A inibição do crescimento a cada concentração de amostra/fração foi determinada por comparação da radioatividade incorporada na cultura tratada com que, na cultura de controle, mantida sobre a mesma plataforma. A concentração mais elevada de DMSO que os parasitos foram expostos foi de 0,4%, e foi demonstrado que não têm efeito mensurável sobre a viabilidade do parasito. A cloroquina (CQ) foi preparada em água purificada de grau Milli-Q e usada como controle de droga antimalarial

4.3.2 Ensaio de fluorescência por SYBR Green I

As subfrações secas foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocados. A partir de uma concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no primeiro poço, os extratos foram diluídos serialmente com o meio de cultura e adicionadas à cultura de parasitos (1% de parasitemia e 2% de hematócrito) em placas de 96 poços. Da mesma forma, os controles positivos e negativos foram diluídos a partir de uma concentração inicial de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO_2 por 48 horas. Em seguida, a placa foi congelada a -80 °C por 12 horas. Após esse período, 100 μL de tampão lise Tris (20 mM, pH 7,5), EDTA (5 mM), saponina (0,008%; p/v) e Triton X-100 (0,08%, v/v) com 0,2 μL de 10.000X SYBR Green I (Invitrogen) /mL de tampão de lise), foi adicionado a cada poço e homogeneizado com pipeta multicanal. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora antes da leitura (SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BAGAVAN *et al.*, 2011).

O valor da fluorescência foi medido no aparelho Spectramax M5, e o software utilizado por este equipamento é o Softmax Pro, com bandas de excitação e emissão de comprimento de onda centrado em 497 e 520 nm (cutoff 515 nm), respectivamente. A concentração da droga que causa 50% de inibição (IC_{50}) foi determinada pela análise da curva dose-resposta dos valores da média da triplicata para cada extrato testado (SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BAGAVAN *et al.*, 2011).

4.4 Teste de Hemólise

Os extratos foram serialmente diluídos com o meio de cultura (RPMI + 8% de soro humano) em placa de 96 poços (volume final de 100 μ L). Cem microlitros de eritrócitos humanos ressuspendidos no mesmo meio foram adicionados a cada poço para obter 1% de hematócrito final. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂. As placas foram centrifugadas e 100 μ L do sobrenadante foram coletados. A porcentagem de hemólise de eritrócitos foi definida por medida da absorbância da hemoglobina a 540 nm. A lise de 0% foi definida como a absorbância medida em cultura de eritrócitos na ausência de extratos. A lise de 100% foi definida como a absorbância medida em cultura de eritrócitos totalmente lisados por congelamento/descongelamento. As concentrações finais dos extratos foram dentro de uma gama de 100 a 0,1 μ g/mL (DE MESQUITA *et al.*, 2005).

4.5 Ensaio de Citotoxicidade

5×10^3 células L-6 derivadas de mioblasto foram adicionadas por poço em placas de 96 poços com 200 μ L de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. Estas células, após formar a monocamada, foram mantidas com diferentes concentrações do extrato por 5 dias a 37 °C sob uma atmosfera de 5% de CO₂. A citotoxicidade foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico MTT (MOSMANN, 1983), que consiste na avaliação da viabilidade celular a partir da medida do dano induzido pelo composto e/ou extrato e/ou droga no metabolismo celular de glicídeos. O princípio deste ensaio baseia-se na quantificação da redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) em formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água), usualmente, pela atividade de desidrogenases mitocondriais (Fig. 15).

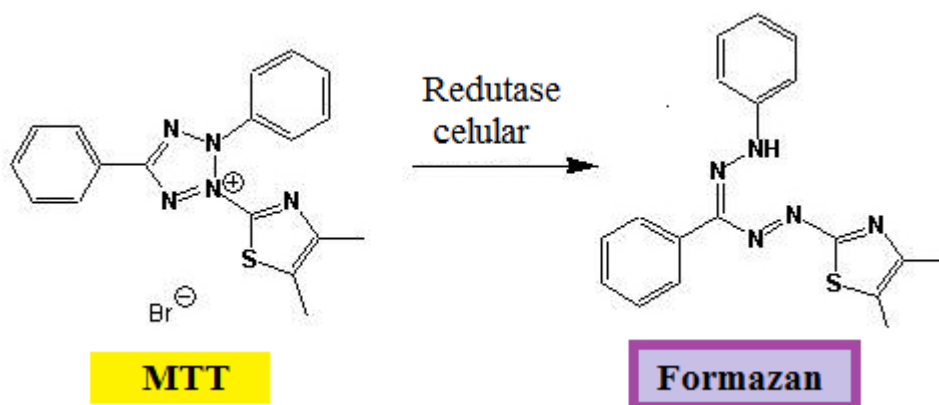


Figura 15: Redução de MTT em formazan nas células vivas por redutases mitocondriais (Adaptado BRESCIA E BANKS, 2009).

As porcentagens de redução da absorbância a 540 nm para as culturas tratadas e controles não tratadas foram obtidas e comparadas. Os valores IC_{50} para o crescimento celular foram determinados a partir das curvas de concentração dos extratos. O índice de seletividade (SI), definido como a taxa de citotoxicidade pela atividade antiplasmodial, foi determinado pela divisão dos valores de IC_{50} obtidos para L-6 pelos valores de IC_{50} obtidos para *P. falciparum*.

Os resultados foram expressos como a média dos valores \pm o desvio padrão determinadas a partir de 3 experimentos independentes.

4.6 Fluxograma dos bioensaios

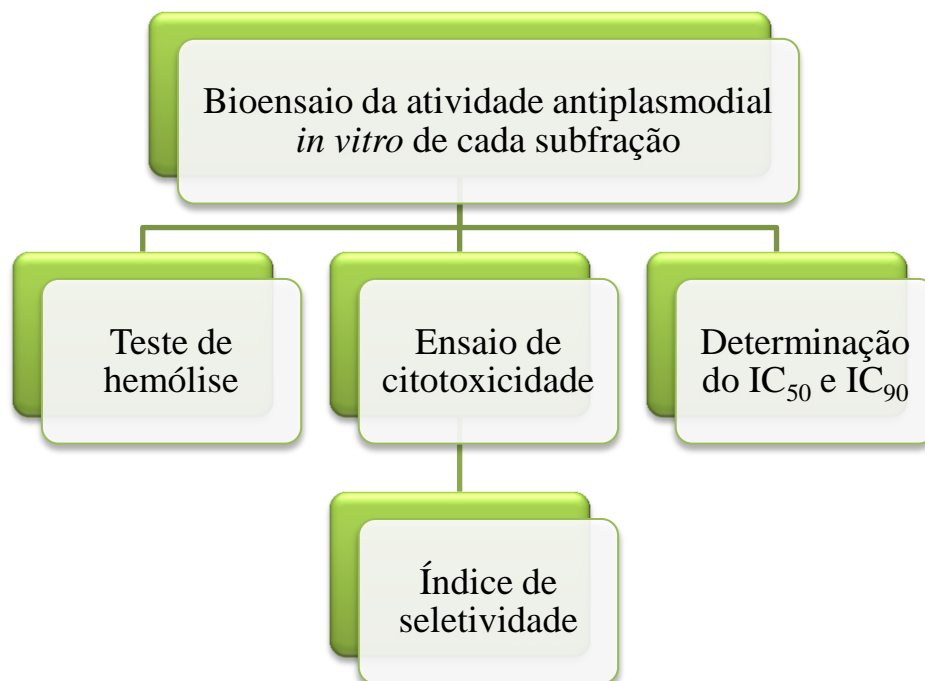


Figura 16: Fluxograma da avaliação da atividade antiplasmodial, citotóxica e hemolítica.

4.5 Avaliação dos efeitos da rottlerin no ciclo biológico de *P. falciparum* por citometria de fluxo

4.5.1 Sincronização dos parasitos

Para obter um predomínio de formas jovens na cultura (anel) foi utilizado o protocolo de sincronização utilizando D-sorbitol (Sigma) (LAMBROS E VANDERBERG, 1979). Inicialmente, foram confeccionados esfregaços sanguíneos dos frascos de cultura para se

determinar o estágio de amadurecimento dos parasitos. A cultura foi selecionada quando havia predomínio de formas jovens (anéis).

A cultura foi transferida para um tubo tipo Falcon e centrifugada a $400 \times g$, por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensionado em solução de D-sorbitol a 5% em H₂O pura estéril e incubado a 37°C por 10 - 12 minutos. Passado esse tempo, a suspensão de hemácias com o D-sorbitol foi centrifugada a $400 \times g$, por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante desprezado e as hemácias ressuspensionadas com o meio RPMI com AlbuMax II[®]. O hematócrito foi ajustado para 2% com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas.

4.5.2 Tratamento com a Rottlerin

A rottlerin foi diluída DMSO, um solvente aprótico e polar. Logo após a sincronização das culturas, no estágio de 0- 4 horas após invasão foram tratadas com rottlerin 1 μ M (IC50) e 2 μ M (IC90), e DMSO (um volume equivalente ao de rottlerin) e, então, o ciclo foi monitorado de 8 em 8 horas até completar as 48 horas do ciclo, para verificar o efeito da rottlerin no ciclo biológico do parasito.

4.5.3 Citometria de Fluxo

Para a análise por citometria de fluxo foi utilizado o protocolo descrito por Bei e colaboradores (2010) com alterações. 200 μ L de cultura contendo pelo menos 1% de parasitemia em 4% hematócrito foi centrifugada a 1200 rpm, por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. Então, seguiu-se para as etapas (2 vezes) de lavagem com 100 μ L de tampão fosfato salina (PBS).

Para a padronização da técnica foram utilizadas culturas não sincronizadas, e um *gating* inicial foi realizado com eritrócitos não infectados não marcados, a fim de verificar se havia autofluorescência de eritrócitos. Após esta primeira padronização, uma segunda padronização foi realizada para verificar a quantidade de células ideal para a análise e verificação da marcação com SYBR[®] Green I (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

SYBR Green I é um marcador de DNA e foi usado apenas para confirmar que os eventos detectados eram de fato hemácias infectadas. Este marcador foi adicionado diretamente na cultura de *P. falciparum*, após as lavagens com PBS para retirar o meio de cultura RPMI suplementado com soro que, contém fenol e que poderia ocasionar uma fluorescência inespecífica, gerando picos falso-positivos. Um etapa de otimização para

identificar a melhor quantidade de células (diluição) bem como a concentração do corante foi realizada (dados não mostrados). Os resultados satisfatórios foram alcançados utilizando aproximadamente 107 células/ mL e uma concentração de 1:1000 de SYBR Green I.

Para a marcação, as células foram incubadas com 4 μ L de 1:10.000 SYBR Green I (Molecular Probes) que foi diluído em 36 μ L de PBS por 20 a 30 minutos a 37 °C. Depois da incubação, as células foram ressuspensas em um volume final de 1 mL com PBS. A amostra marcada foi adquirida no citômetro de fluxo, e a porcentagem de células positivas com SYBR green (FITC-A fluorescência) foi determinada.

Outro *gating* foi realizado com uma cultura sincronizada, em uma janela de 6 a 8 horas, para identificar os picos referentes a cada forma de vida do parasito, ou seja, foram marcados apenas anéis, trofozoítos e esquizontes, para avaliar como seria o perfil de intensidade de fluorescência de cada um destes estágios.

Por fim, foi realizada a aquisição de 300 mil eventos por amostra (tratado e não tratado), em tempos estratégicos para monitorar o ciclo biológico do parasito, e assim, avaliar o efeito da rottlerin no ciclo de vida do *P. falciparum* (IZUMIYAMA *et al.*, 2009; KARL *et al.*, 2009; BEI *et al.*, 2010; THERON *et al.*, 2010; MALLERET *et al.*, 2011; PHILIPP *et al.*, 2012).

4.5.4 Fluxograma

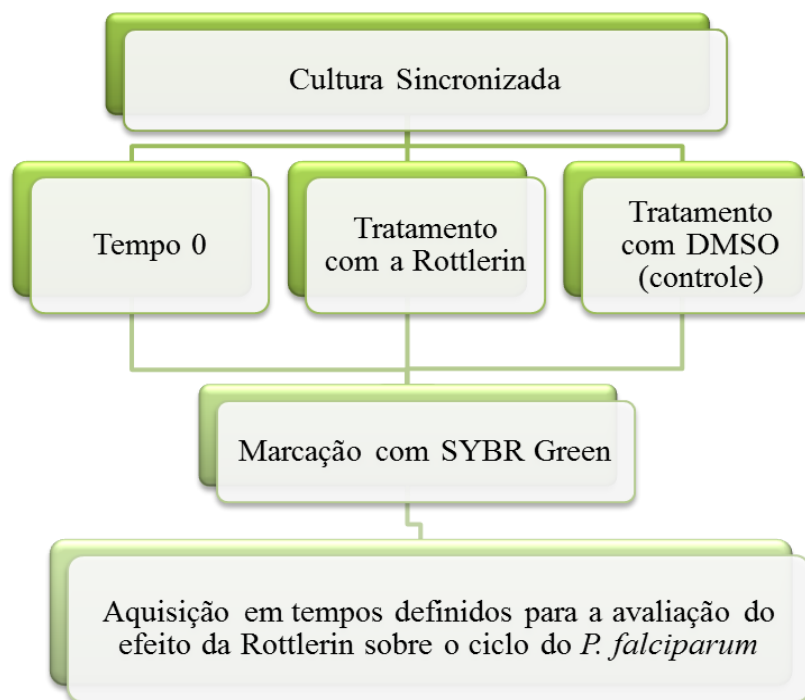


Figura 17: Fluxograma da avaliação dos efeitos da rottlerin por citometria de fluxo.

4.6 Proteômica dos efeitos da rottlerin na morfogênese dos merozoítos

4.6.1 Sincronização

Estes procedimentos foram realizados conforme descritos no item 4.5.1.

4.6.2 Tratamento com a rottlerin

Após a sincronização, quando a cultura parasitária tinha o predomínio de formas esquizontes referente a 40 – 44 horas após invasão do ciclo intra-eritrocitário, a cultura foi dividida em 3 populações: uma população no tempo 0, sem tratamento e sem tempo de incubação, sendo levada imediatamente a etapa de extração parasitária; uma população tratada com 1 μM (IC_{50}) de rottlerin e uma população controle tratada com DMSO (o volume equivalente ao de rottlerin). As 2 populações tratadas foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO_2 , por 1 hora e 30 minutos.

4.6.3 Extração parasitária por lise eritrocitária seletiva

A extração parasitária foi baseada na composição diferencial em colesterol das membranas das hemácias, dos parasitos e da membrana do vacúolo parasitóforo, utilizando-se a saponina (Sigma), pois este detergente interage preferencialmente com as membranas ricas em colesterol, ou seja, causa principalmente uma hemólise.

A cultura foi sedimentada por centrifugação $600 \times g$, 5 minutos, em tubo tipo Falcon (15 mL). O sobrenadante foi descartado e lavado 1 vez em grande volume de PBS.

Após nova centrifugação a $600 \times g$, 5 minutos, temperatura ambiente, o sedimento de células foi ressuspensionado em 10 vezes seu volume em solução gelada de 0,15% (p/v) saponina em PBS estéril e incubado por 5 minutos no gelo.

Em seguida, o sedimento parasitário foi lavado por centrifugação ($10.000 \times g$, 10 minutos, 4 °C) no mínimo 3 vezes e ressuspensionado em grande volume de PBS gelado até que o sobrenadante da lavagem fosse claro. Então, mais uma lavagem foi realizada em 1 mL de PBS gelado após a transferência do sedimento para um microtubo de 1,5 mL e foi centrifugado novamente ($10.000 \times g$, por 10 minutos, 4 °C).

Por fim, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se ureia 8M acrescido de coquetel inibidores de proteases sem EDTA (Roche).

4.6.4 Determinação da quantidade de proteínas de cada amostra

As amostras proteicas a partir da extração parasitária foram precipitadas com o método de 15% TCA seguido de lavagens por acetona 100%, com o objetivo de concentrar, purificar e dessalinizar as amostras.

Para determinar a concentração de proteínas, foi utilizado o 2-D Quant Kit (GE - Healthcare Life Sciences), e seguiu-se o protocolo indicado pelo fabricante.

4.6.5 Eletroforese bidimensional

As amostras precipitadas foram solubilizadas em 350 μ L de solução 2D (7 M Ureia, 2 M tiouréia, 85 mM DTT, 2,5% CHAPS, 2% anfólitos pH 3-10, 10% de isopropanol e coquetel de inibidores de proteases sem EDTA(Roche) durante 1 h à temperatura ambiente (CHARNEAU *et al.*, 2007).

Após centrifugação (5 min a $14.000 \times g$), os sobrenadantes foram submetidos à isoeletrofocalização em tiras de gel de gradiente de pH imobilizado - IPG (GE Healthcare) com o maior gradiente de pH (3 a 10) para que a grande maioria das proteínas sejam separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) (CHARNEAU *et al.*, 2007).

	Quantidade	Concentração Final
Amostra (165 μ g)	271,3 μ L	8 M Ureia, 2M tioureia
Amfólitos pH 3-10	1,75 μ L	0,5% (v/v)
DTT	0,0047 g	85 mM
Água grau Milli-Q	41,95 μ L	q.s.p
Isopropanol	35 μ L	10% (v/v)
CHAPS	0,007 g	2% (m/v)
Azul bromofenol	pitada	
TOTAL	350 μL (Vol final para IPG strip de 18 cm)	

O programa utilizado para a focalização isoelétrica está descrito abaixo:

1- Reidratação	6 h	sem voltagem
2- Reidratação 30 V	6 h	180 Vh
3- 500 V step and hold	1 h	500 Vh
4- 1000 V step and hold	1 h	1000 Vh
5- 8000 V step and hold	4 h	32000 Vh
TOTAL	18 h	33680 Vh

Antes da realização da 2ª dimensão, as proteínas foram equilibradas seguindo os seguintes passos:

- a) **Redução:** Incubação do IPG strip, por 40 minutos, em 3 mL de tampão de equilíbrio (tabela 3) acrescido de 125 mM de DTT (0,0578 g / 3 mL) à temperatura ambiente.

Tabela 3: Tampão de equilíbrio.

Componente	Concentração
Tris 1,5 M pH 8,8	50 mM
Uréia	6 M
Glicerol	30%
SDS 10% (ou 2g de SDS)	4%
H ₂ O MQ	q.s.p

- b) **Alquilação:** Incubação do IPG strip, por no mínimo 20 minutos, em 3 mL de tampão de equilíbrio (tabela 3) acrescido de 300 mM de acrilamida (0,0639 g / 3 mL) à temperatura ambiente.
- c) **Lavagem:** Enxaguar o IPG strip no tampão de corrida de SDS-PAGE por 1 minuto.

A 2ª dimensão foi realizada a partir de um SDS- PAGE 12% foi e a corrida foi de no máximo 30 mA por gel à 18-20 °C ou *overnight* com 7 mA por gel.

Para a observação das proteínas separadas pela 2D, os géis foram corados por Azul de Coomassie coloidal G-250. O protocolo de coloração seguiu-se as seguintes etapas: Primeiro, o gel é colocado em solução de fixação por pelo menos 3 horas em etanol 50% (v/v) e etanol ácido fosfórico 3% (m/v) e em seguida lavou-se três vezes por 20 minutos com água grau Milli-Q. Após pré-incubação durante 1 hora em metanol 34% (v/v), ácido fosfórico 3% (m/v) e sulfato de amônio 17% (m/v), adicionou-se 0,07 g de *Coomassie Brilliant Blue G-250* para cada 200 mL de solução de pré-incubação. O gel ficou incubado durante 4-5 dias nesta solução e posteriormente, foi lavado com água grau Milli-Q para a remover o *background* da coloração (Anderson *et al.*, 1991).

4.6.6 Seleção dos *spots* de interesse

Inicialmente, uma inspeção visual dos géis foi realizada para detectar *spots* proteicos observados em uma condição (população de esquizontes tratados e não tratado com rottlerin) e não observados na outra. No intuito de confirmar a expressão diferencial observada pela inspeção visual, as imagens adquiridas pela digitalização dos géis utilizando-se o *scanner*

modelo 53 Image Scan UMAX (GE Healthcare) foram analisadas computacionalmente pelo *software Image Master Platinum* versão 5 e versão 6 (GE Healthcare).

4.6.7 Digestão in gel

Os *spots* proteicos selecionados (diferencialmente expressos) obtidos pela eletroforese 2D foram excisados e submetidos à digestão no gel *in gel*, conforme protocolo da literatura com pequenas modificações (SHEVCHENKO *et al.*, 1996; ZHANG, ROGOWSKA-WRZESINSKA E ROEPSTORFF, 2008).

Primeiramente, os *spots* foram descorados com solução contendo 50% de acetonitrila e, em seguida, foram submetidos a 3 ciclos de lavagem em solução 100 mmol/ L de bicarbonato de amônia (NH₄HCO₃) por 5 min e 100% de acetonitrila por 5 min.

Os *spots* foram, por fim, macerados após a última lavagem e secos em SpeedVac.

Os *spots* secos foram, então, hidratados com 10 µL de solução gelada de tripsina (12,5 ng/ µL) em tampão de digestão (50 mM NH₄HCO₃ e 2,5 mM CaCl₂) durante 45 minutos no gelo. Após esse tempo, foi retirado o excesso de solução e 5-10 µL do tampão de digestão sem a enzima, em quantidade suficiente que possa cobrir o gel, sendo incubado a 37 °C *overnight* (12 e 18 h).

Após incubação, a solução foi acidificada pela adição de 1 µL de 1% TFA e 1 µL dessa amostra acidificada foi aplicada à placa Anchorchip™. Após seco foi adicionada 1 µL de matriz (DHB 5 mg/ml em 30% ACN/0.1% TFA).

4.6.8 Espectrometria de massas

Para a obtenção dos espectros referentes aos peptídeos extraídos, foi utilizado o espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF-TOF, modelo *Autoflex II* (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). O equipamento foi operado no modo positivo e refletor e a faixa de leitura foi de 700 a 3500 (m/z). O *software Flex Analysis* foi usado para o tratamento manual dos espectros e as massas experimentais dos peptídeos trópticos foram exportados e utilizados para identificação pelo método de *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) usando o usando o programa *Mascot* (www.matrixscience.com) para realizar a busca contra banco de dados não-redundantes NCBI (*National Center for Biotechnology*) de proteínas do *Plasmodium falciparum*. Os parâmetros foram: tolerância de desvio de massa dos peptídeos entre 100 a 300 ppm, 1 clivagem tróptica perdida, propionamidação de cisteínas como modificação fixa, oxidação de metionina e acetilação da região N-terminal como modificações variáveis.

4.6.9 Fluxograma

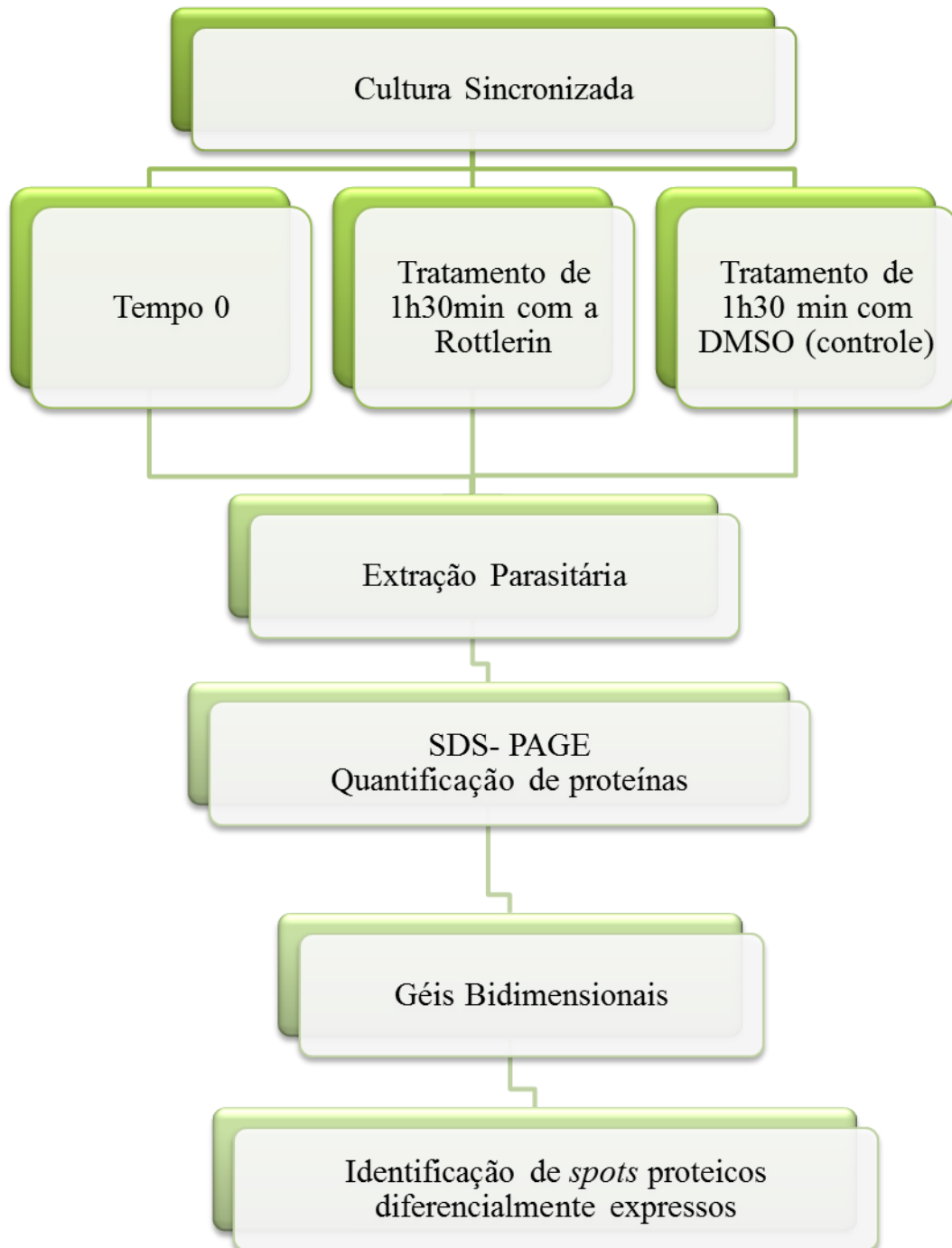


Figura 18: Fluxograma da análise comparativa proteômica baseada em géis 2D.

4.7 Delineamento experimental

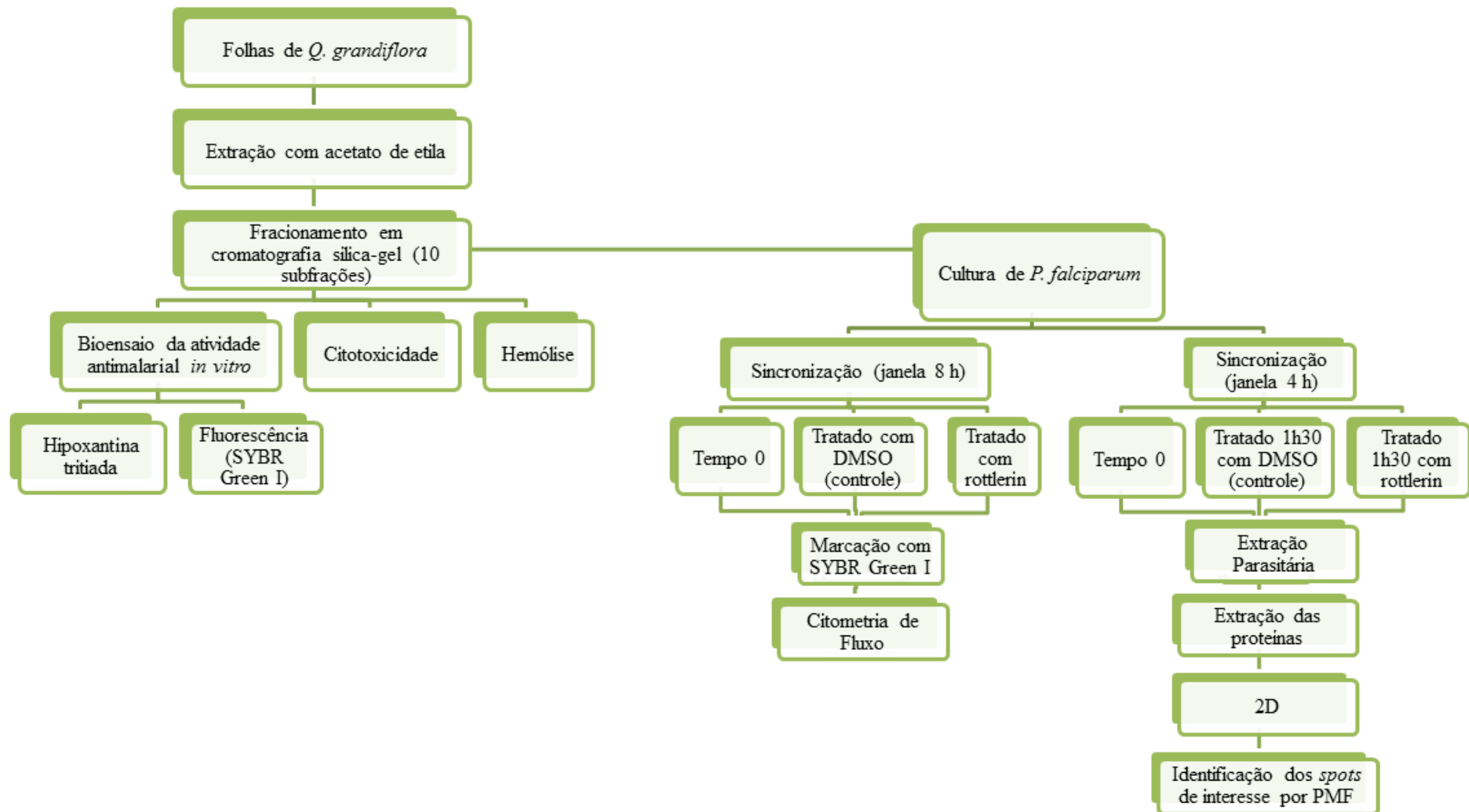


Figura 19: Fluxograma geral mostrando todas as etapas metodológicas utilizadas neste estudo.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização do bioensaio de atividade antiplasmodial *in vitro* baseado em fluorescência com SYBR Green I

Testes preliminares, com uma cepa sensível a cloroquina – 3D7 de *P. falciparum*, foram realizados para avaliar a aplicabilidade do bioensaio baseado em fluorescência com a molécula SYBR Green I[®] (Molecular Probes, Inc., Life Technologies).

SYBR Green I é um composto orgânico fluorescente assimétrico de cianina (fluoróforo), utilizado para a marcação de ácidos nucleicos. SYBR Green I[®] se liga preferencialmente a pequena cavidade do DNA de cadeia dupla, mas vai marcar DNA de fita simples ou RNA com desempenho bem inferior. O complexo resultante, fluoróforo – DNA, possui a propriedade de absorver a luz azul (comprimento de onda máximo em 497 nm) e emite luz verde (comprimento de onda máximo em 520 nm).

Na literatura, os testes antiplasmodiais com uso do SYBR Green I não são todos padronizados, principalmente no que diz respeito a quantidade de células (SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BAGAVAN *et al.*, 2011).

A validação do teste de atividade em placas de 96 poços foi realizada pela avaliação do efeito da cloroquina (diluída em série a partir de uma concentração inicial de 1.000 ng/mL no primeiro poço). Duas quantidades de hemácias (hematócrito de 2% ou 4%) e diferentes concentrações do fluoróforo (1x, 2x, e 5x) foram testadas em duplicata para cada hematócrito e isso nas mesmas condições e em paralelo. A parasitemia foi fixada a 1%, por consequência havia mais parasitos quando maior o hematócrito (Fig. 20).

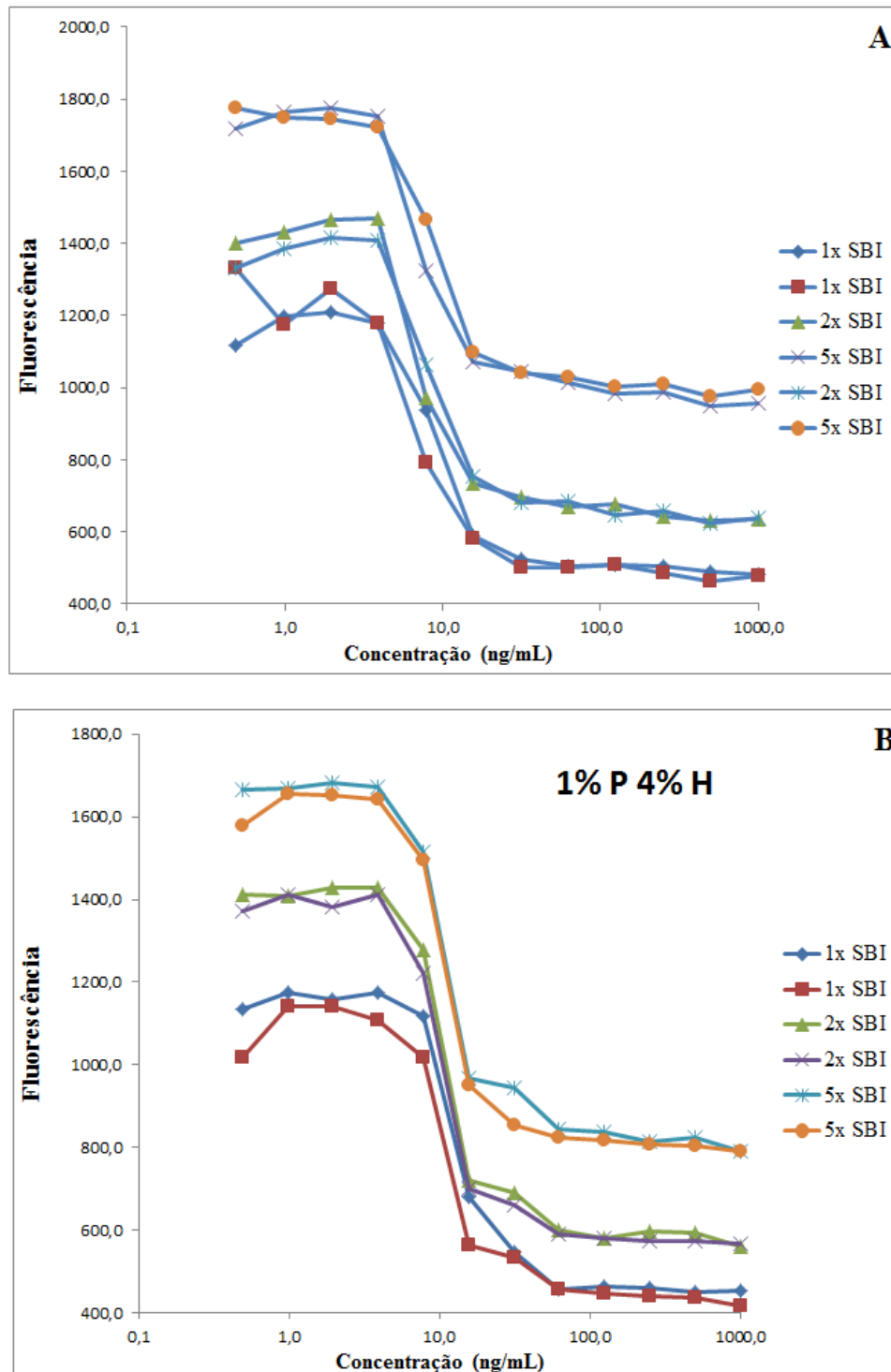


Figura 20: Curvas de dose-resposta não normalizadas das diferentes condições testadas no ensaio de atividade antiplasmodial *in vitro* baseado em fluorescência com uso da cloroquina como droga controle. Avaliação foi realizada a partir de quantidade de células diferentes, A) 1% parasitemia e 2% hematócrito, B) 1% parasitemia e 4% hematócrito, e com 3 concentrações do marcador fluorescente SYBR Green I diferentes (SB1x, SB2x, SB5x) para A) e B). P: parasitemia; H: hematócrito; SBI: SYBR Green I. Eixos da abscissa: Quantidade de CQ em ng/mL e ordenada: intensidade da emissão à 530 nm.

Pode-se observar que não há diferenças com relação ao hematócrito.

A fim de comparar melhor entre as 3 concentrações de SYBR Green I testadas, fizemos uma normalização das curvas respostas (Fig. 21).

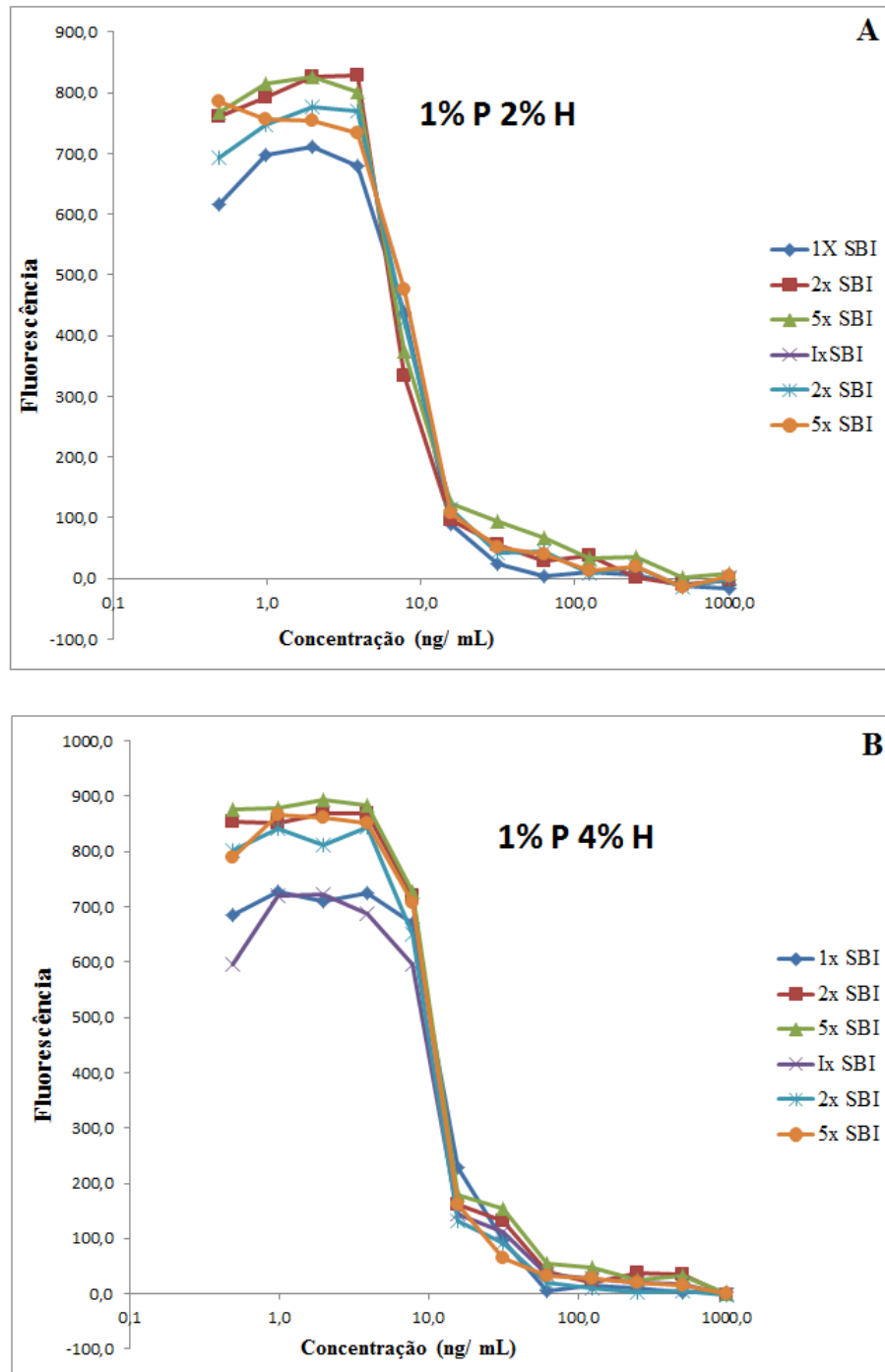


Figura 21: Curvas de dose-resposta normalizadas das diferentes condições testadas no ensaio de atividade antiplasmodial *in vitro* baseado em fluorescência com uso da cloroquina como droga controle. Avaliação foi realizada a partir de quantidade de células diferentes. **A.** 1% parasitemia e 2% hematócrito. **B.** 1% parasitemia e 4% hematócrito, e com 3 concentrações diferentes do marcador fluorescente SYBR Green I (SB1x, SB2x, SB5x) para A) e B). P: parasitemia; H: hematócrito; SBI: SYBR Green I. Eixos da abscissa: Quantidade de CQ em ng/mL e ordenada: intensidade da emissão à 530 nm.

Pode-se observar que a intensidade de emissão do SYBR Green I 1x estava inferior a 2x e 5x. No entanto, não havia diferenças entre as concentrações de SYBR Green I 2x e 5x. Desta forma, foi padronizado a concentração de 2x de SYBR Green I (1:10.000 v/v), por produzir um sinal intermediário.

Os valores de IC₅₀ e o IC₉₀ experimentais da cloroquina em todas essas condições foram bastante conservados de 8,3-13,1 ng/mL e 14,9-19,7 ng/mL, respectivamente. Isso demonstra a reprodutibilidade do experimento. Observou-se também, durante os testes de otimização que uma etapa de congelamento antes da adição do tampão de lise com o SYBR Green I auxiliou no processo de lise das células como relatado por Smilkstein e colaboradores (2004).

5.2 Atividade antiplasmodial das subfrações de *Qualea grandiflora*

Foram realizados os testes de atividade antiplasmodial de 10 subfrações de folhas de *Q. grandiflora* obtidas após a extração com o solvente acetato de etila, e subfracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando os eluentes acetato de etila: hexano em ordem crescente de polaridade (10 a 100%), acetona e metanol.

Os valores de IC₅₀ e IC₉₀ para cada subfração das folhas da planta *Q. grandiflora* estão relacionados na tabela 4. Para o teste de radioatividade foi utilizada a cepa resistente à cloroquina, K1 no laboratório UMR 7245 CNRS - *Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes do Muséum National d'Histoire Naturelle*, e para os testes de fluorescência, foi utilizada a cepa sensível a cloroquina 3D7, no departamento de Biologia Celular da UnB.

Embora tenha sido encontrada algumas pequenas diferenças entre os valores encontrados em cada método por cepas diferentes, o método de teste de atividade antiplasmodial por SYBR Green I pode ser utilizado com confiança, corroborando com os dados da literatura (SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BAGAVAN *et al.*, 2011).

As subfrações 1, 2 e 5 da extração com o solvente mais polar utilizado (acetato de etila) foram as que apresentaram a maior atividade antiplasmodial (tabela 4). Nenhuma subfração apresentou citotoxicidade (tabela 4) e hemólise (dados não mostrados) relevantes. De acordo com o que tem sido descrito na literatura, substâncias presentes em *Q. grandiflora* e que contenham caráter mais polar possuem atividade mais evidente (AYRES *et al.*, 2008; DE MOURA, DO NASCIMENTO E GAROFALO, 2012). Entretanto, as subfrações 1,2 e 5 estão entre as menos polares das 10.

Tabela 4: Ensaios antiplasmodiais e de citotoxicidade das subfrações das folhas de *Qualea grandiflora*.

Número da subfração de <i>Qualea grandiflora</i> ^a	Atividade Antiplasmodial (µg/mL)				Citotoxicidade contra células L6 (µg/mL)	Índice de Citotoxicidade ^b	
	³ H]-hipoxantina (cepa K1)		SYBR Green I (cepa 3D7)			TC ₅₀ /IC ₅₀ (K1)	TC ₅₀ /IC ₅₀ (3D7)
	IC ₅₀ ±DP	IC ₉₀ ±DP	IC ₅₀ ±DP	IC ₉₀ ±DP	TC ₅₀ ±DP		
1	55,25±7,75	117,13±45,57	61,44±10,08	130,92±33,74	>100	>1,81	>1,63
2	49,45±14,74	85,26±28,00	54,63±12,62	98,93±19,56	>100	>2,06	>1,83
3	74,98±12,03	125,74±20,08	91,21±4,59	202,49±18,59	>100	>1,33	>1,09
4	89,77±2,49	149,29±7,19	86,94±1,95	171,72±20,37	>100	>1,11	>1,15
5	53,70±6,72	94,12±11,31	78,99±4,13	154,23±12,50	>100	>1,86	>1,26
6	69,29±10,32	125,41±17,75	80,92±2,50	167,08±13,90	>100	>1,44	>1,24
7	>100		>100		>100		
8	80,43±10,14	146,75±14,57	74,03±2,35	146,71±14,17	>100	>1,24	>1,35
9	60,74±6,66	112,22±10,52	88,78±10,21	174,16±10,89	>100	>1,64	>1,26
10	66,76±1,62	123,52±2,51	90,74±9,45	195,59±27,51	>100	>1,50	>1,10
Cloroquina	24±0,5 nM	45±1,3 nM	17,3 ng/mL	31 ng/mL	>100		

Valores de IC₅₀ e IC₉₀ são representados pela média das três replicatas ± desvio padrão (DP). NI: sem inibição.

^a Nome botânico da espécie da planta do Cerrado Brasileiro.

^b O índice de citotoxicidade foi definido pela razão do valor de IC₅₀ determinado para as células de mamíferos da linhagem L6 pelo valor de IC₅₀ determinado para *P. falciparum*.

5.3 Bioensaio de atividade antiplasmodial da rottlerin *in vitro*

Para determinar a concentração de rottlerin que seria utilizada para o tratamento das culturas de *P. falciparum* para os experimentos de citometria de fluxo e de proteômica, os valores de IC₅₀ e IC₉₀ desta molécula foram previamente verificados pelo bioensaio com radioatividade contra a cepa resistente à cloroquina, K1, e bioensaio com fluorescência contra a cepa sensível à cloroquina, 3D7. A rottlerin foi diluída no DMSO, portanto este solvente foi utilizado com controle negativo e não apresentou efeito inibidor significativo até uma concentração de 2% (v/v). A cloroquina foi utilizada como controle positivo (tabela 5).

Tabela 5: Bioensaio *in vitro* da atividade antiplasmodial da rottlerin.

Molécula	Atividade Antiplasmodial (μM)			
	³ H]-hipoxantina (cepa K1)		SYBR Green I (cepa 3D7)	
	IC ₅₀ ±DP	IC ₉₀ ±DP	IC ₅₀	IC ₉₀
Rottlerin	1,17±0,17	2,09±0,21	0,336	0,574
Cloroquina	0,023±0,009	0,047±0,012	0,009	0,012

Valores de IC₅₀ e IC₉₀ estão representados pela média das três replicatas ± desvio padrão (DP).

Com base nos valores de IC₅₀ e IC₉₀ da rottlerin confirmados de ±1 μM e ±2 μM, respectivamente (bioensaio com radioatividade), essas concentrações foram utilizadas para tratar a cultura do parasito.

5.4 Efeitos da rottlerin sobre o ciclo biológico de *Plasmodium falciparum* por citometria de fluxo

5.4.1 Padronização da marcação com SYBR Green I

A análise inicial foi realizada pela distribuição característica em gráficos de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC), em que 300.000 eventos totais foram analisados. Por causa das características morfológicas das hemácias, pequenas células (7-8 μm de diâmetro) em forma de disco bicôncavo (devido à perda do núcleo durante sua formação), não foi possível separar as populações de hemácias infectadas e não infectadas por estes parâmetros através da citometria de fluxo. Desta forma, utilizou-se a detecção de intensidade de fluorescência a partir da marcação com SYBR Green I para distinguir as diferentes populações.

Com o objetivo de determinar um limite de positividade da intensidade de fluorescência, foram analisados por citometria de fluxo amostras contendo eritrócitos não

infectados e infectados com ou sem incubação com SYBR Green I. Este limite de positividade foi estabelecido pela análise dos gráficos (Fig. 22), representados pelos *gates* P4, para o canal de FITC.

Como mostrado na figura 22D, foi possível detectar um aumento progressivo do número de hemácias fluorescentes em função da quantidade de DNA parasitário presente nas células. O *background* de fluorescência da população que continha eritrócitos infectados e marcados (22D) foi igual aos da população de eritrócitos não infectados (22A e 22B) e ao de eritrócitos infectados e não marcados (22C).

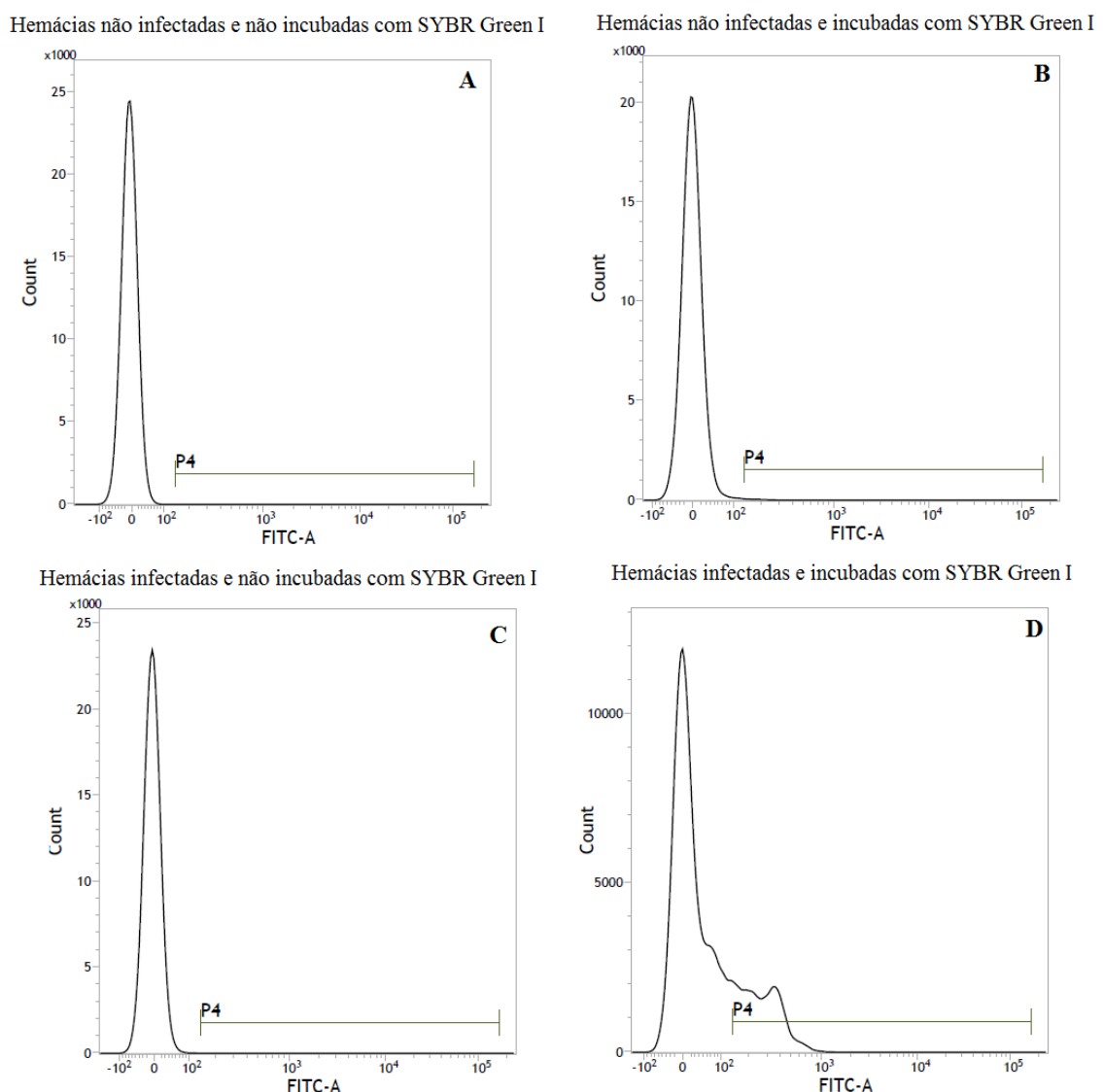


Figura 22: Distribuição da fluorescência para o canal FITC dos controles negativos (eritrócitos não infectados e infectados sem marcação) e controle positivo (eritrócitos infectados e marcados) obtidos por citometria de fluxo. **A.** Histograma da população de hemácias não infectadas e não incubadas com SYBR Green I. **B.** Histograma da população de hemácias não infectadas e incubadas com SYBR Green I. **C.** Histograma da população de hemácias infectadas e não incubadas com SYBR Green I. **D.** Histograma da população de hemácias infectadas e não incubadas com SYBR Green I.

Como pode ser observado (Fig. 23), não há fluorescência para o canal de PE (máximo de emissão: 496 -565 nm; emissão linear: 488 nm e; máximo de excitação: 575 nm), como esperado, já que o marcador possui comprimento de onda de excitação (497 nm) e emissão (520 nm) referente apenas ao canal de FITC (máximo de emissão: 493 nm; emissão linear: 488 nm e; máximo de excitação: 525 nm).

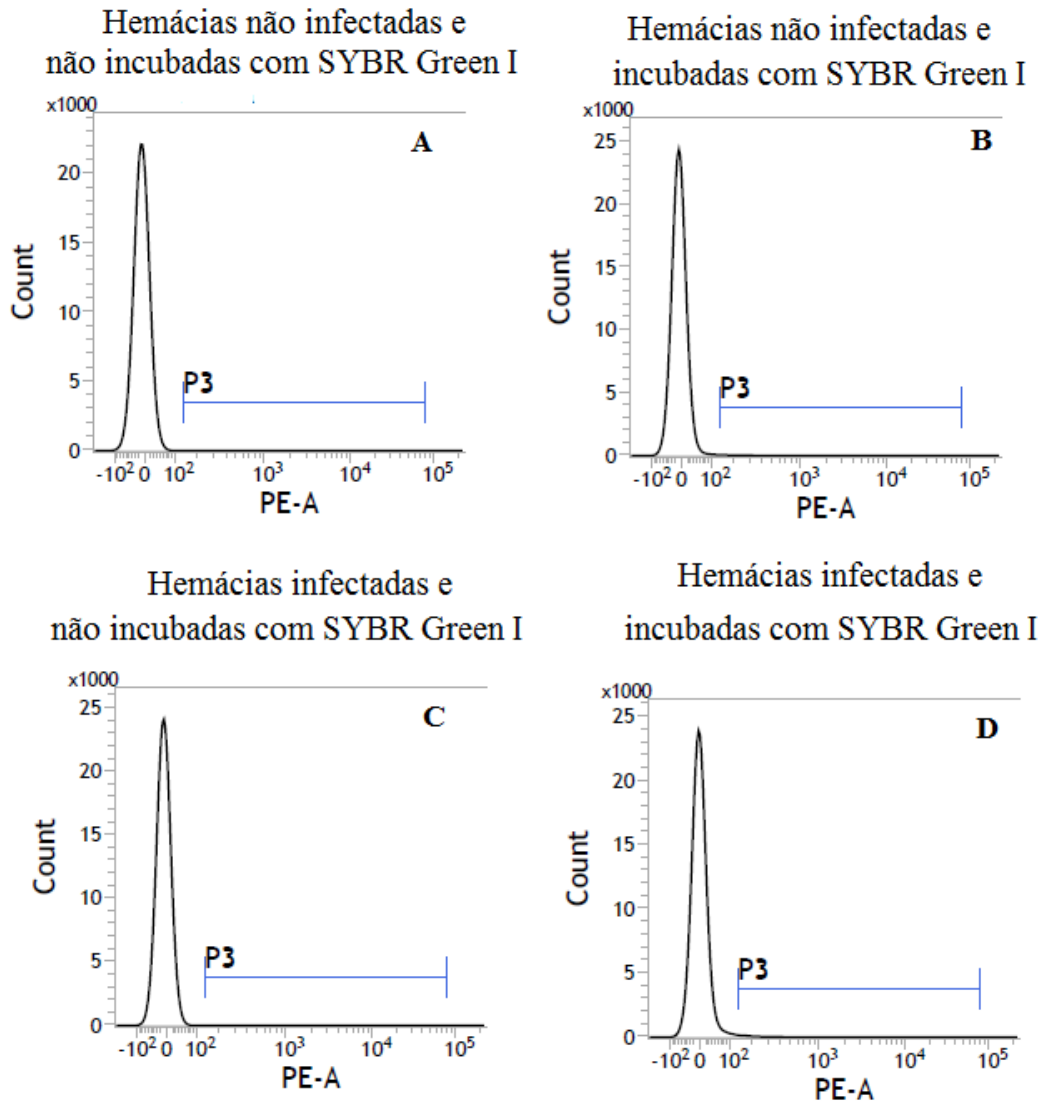


Figura 23: Distribuição da fluorescência para o canal PE dos controles negativos (eritrócitos não infectados e infectados sem marcação) e controle positivo (eritrócitos infectados e marcados) obtidos por citometria de fluxo. **A.** Histograma da população de hemácias não infectadas e não incubadas com SYBR Green I. **B.** Histograma da população de hemácias não infectadas e incubadas com SYBR Green I. **C.** Histograma da população de hemácias infectadas e não incubadas com SYBR Green I. **D.** Histograma da população de hemácias infectadas e não incubadas com SYBR Green I.

Os resultados foram expressos como porcentagem de hemácias fluorescentes para cada amostra, através do estabelecimento de um limiar de positividade o qual permitiu a separação dos agrupamentos de hemácias positivas e negativas em função da intensidade de

fluorescência. Para cada ensaio foram incluídos controles negativo (hemácias não parasitadas). Com o objetivo de se determinar reprodutibilidade do ensaio, cada amostra foi analisada em duplicata.

5.4.2 Efeitos da rottlerin na esquizogonia eritrocitária

Para determinar se o acúmulo de fluorescência verde refletia diferenças entre os estágios de vida do parasito, uma cultura sincronizada em uma janela de 8 horas foi acompanhada em intervalos de tempos definidos (0, 12, 24, 36 e 48 horas do ciclo intra-eritrocitário) por citometria de fluxo, como mostra a figura 24. Estes dados foram comparados aos existentes na literatura. Desta forma, a população representada por P5, pico com menor intensidade de fluorescência (média de fluorescência de $10^1 - 10^2$) é referente às hemácias infectadas pelas formas de anéis, que não se separam completamente das hemácias não infectadas, população representada por P2, e por vezes, ocorre uma sobreposição das fluorescências referentes às estas duas populações (P2 e P5). A população representada por P6, pico com intensidade de fluorescência intermediária (média de fluorescência de 10^3) é referente às hemácias infectadas pelas formas de trofozoítos jovens e maduros e esquizontes jovens, e por fim, a população representada por P7, pico com maior intensidade (média de fluorescência de 10^4) é referente às hemácias infectadas por esquizontes maduros, população alvo do estudo.

Quando a mesma cultura, em paralelo, foi tratada com rottlerin $1 \mu\text{M}$ (IC_{50}) ou $2 \mu\text{M}$ (IC_{90}), observa-se uma manutenção das populações de hemácias infectadas pelas formas de anéis e trofozoítos, representadas por P5 e P6. No entanto, quando a cultura deveria ter hemácias infectadas pelas formas de esquizontes (P7), nos tempo 36, 40 e 48 horas do ciclo intra-eritrocitário, esta população praticamente desaparece, (Figs. 25 e 26). Observa-se ainda, uma diminuição da população de formas jovens (representada por P5) no momento em que deveria ocorrer a reinvasão após a ruptura de hemácias infectadas por esquizontes maduros nas culturas tratadas com rottlerin (Fig. 25F e 26F), mostrando que a rottlerin interrompe o ciclo eritrocitário de *P. falciparum* na fase de esquizogonia.

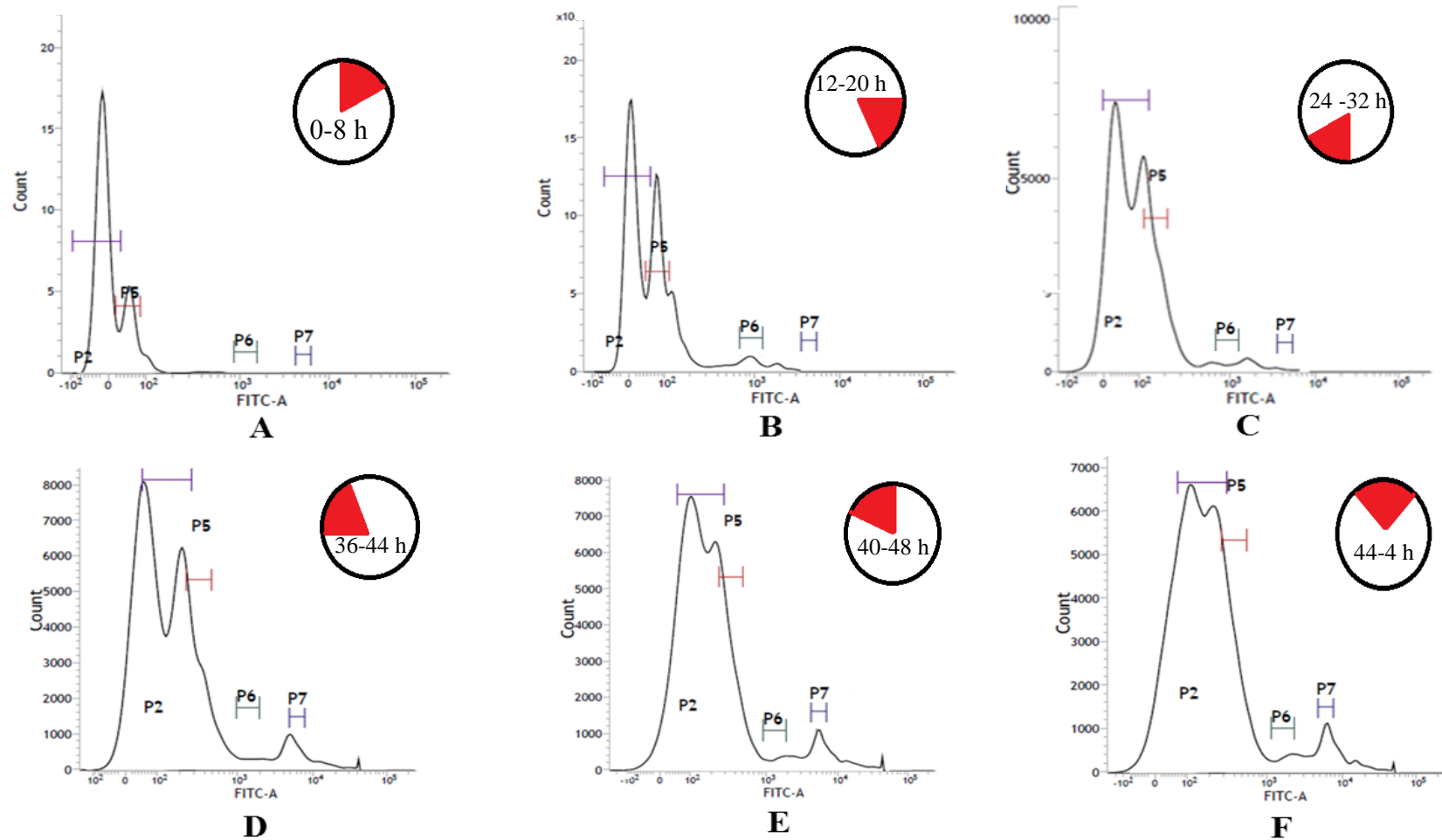


Figura 24: Avaliação do ciclo biológico da população controle de *P. falciparum* em presença de DMSO por citometria de fluxo. **A.** Tempo 0. **B.** 12-20 horas do ciclo intra-eritrocitário. **C.** 24-32 horas do ciclo. **D.** 36-44 horas do ciclo. **E.** 40-48 horas do ciclo. **F.** 44 horas e reinvasão (0-4 h do ciclo). P2: população de hemácias não infectadas. P5: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio de anel. P6: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio trofozoítos jovens e maduros e esquizontes. P7: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio de esquizonte maduro.

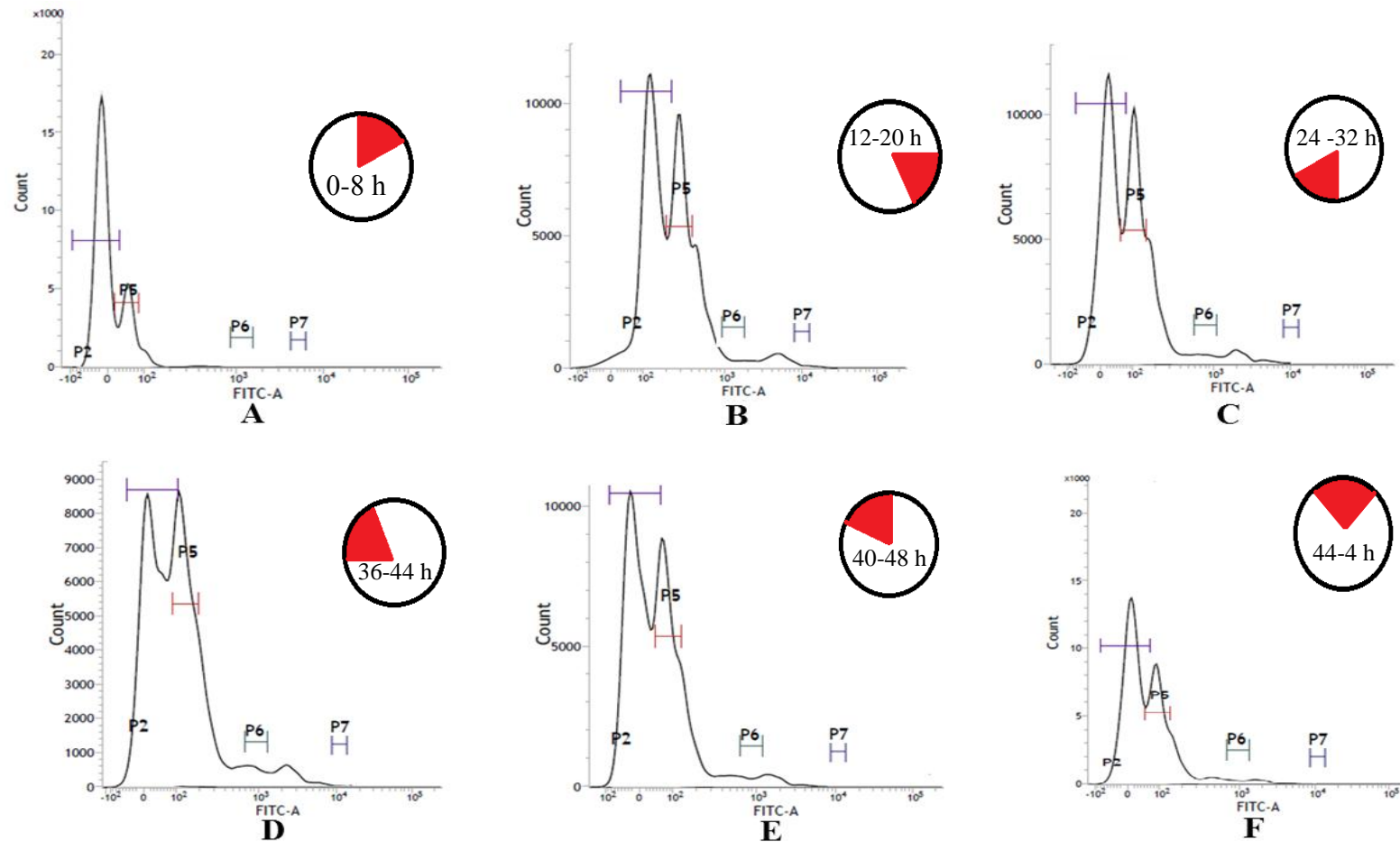


Figura 25: Avaliação do efeito da rottlerin $1 \mu\text{M}$ sobre ciclo biológico de *P. falciparum* por citometria de fluxo. **A.** Tempo 0 (sem o tratamento com a rottlerin). **B.** 12-20 horas do ciclo intra-eritrocitário. **C.** 24-32 horas do ciclo. **D.** 36-44 horas do ciclo. **E.** 40-48 horas do ciclo. **F.** 44 horas e reinvasão (0-4 h do ciclo). P2: população de hemácias não infectadas. P5: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio de anel. P6: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio trofozoítos jovens e maduros e esquizontes. P7: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio de esquizonte maduro.

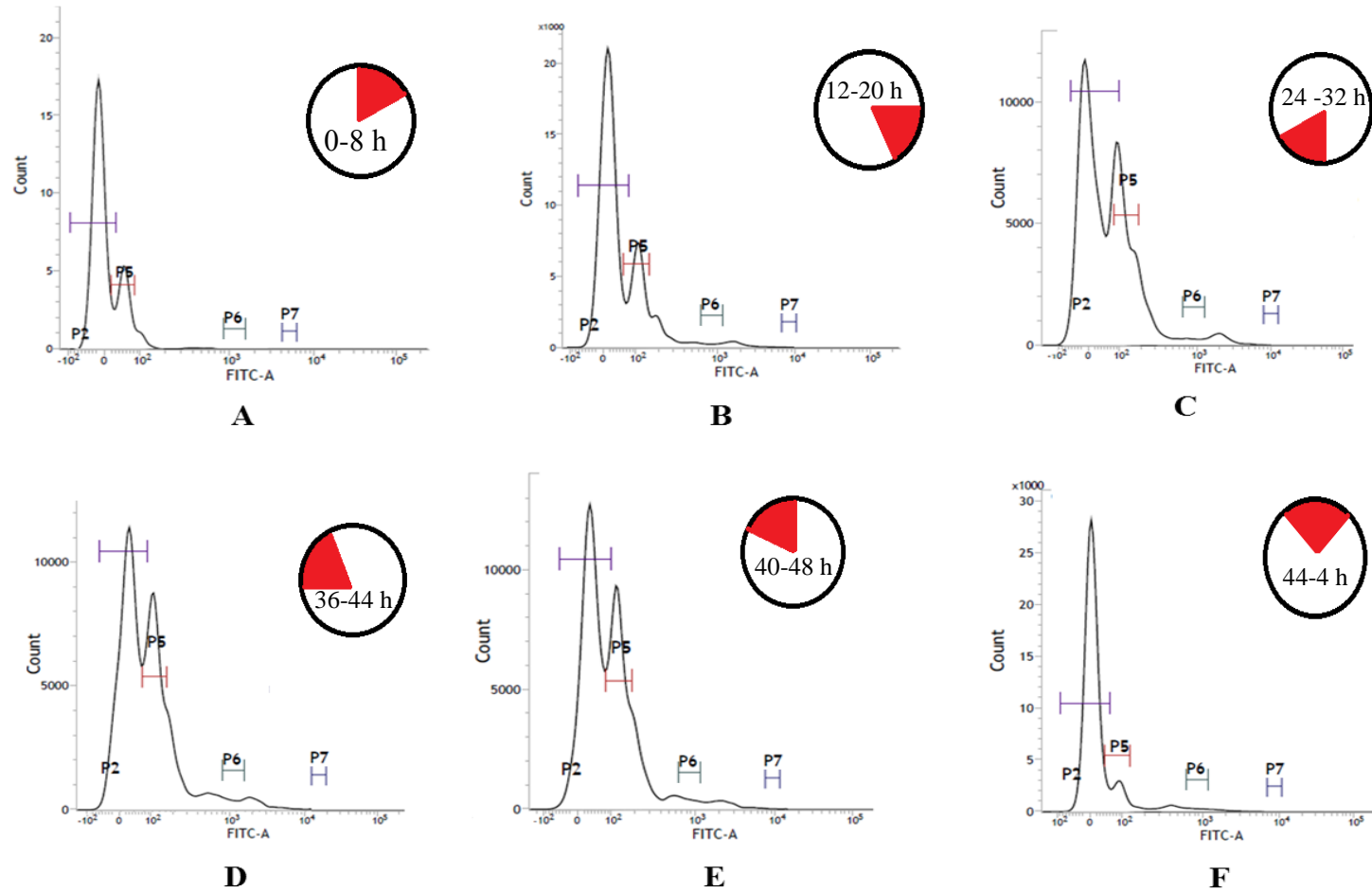


Figura 26: Avaliação do efeito da rottlerin 2 μ M sobre ciclo biológico de *P. falciparum* por citometria de fluxo. **A.** Tempo 0 (sem o tratamento com a rottlerin). **B.** 12-20 horas do ciclo intra-eritrocitário. **C.** 24-32 horas do ciclo. **D.** 36-44 horas do ciclo. **E.** 40-48 horas do ciclo. **F.** 44 horas e reinvasão (0-4 h do ciclo). P2: população de hemácias não infectadas. P5: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio de anel. P6: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio trofozoítos jovens e maduros e esquizontes. P7: população de hemácias infectadas com *P. falciparum* no estágio de esquizonte maduro.

Comparando as populações tratadas e não tratada pela rottlerin na fase de esquizogonia eritrocitária do parasito, entre 32 - 40 horas do ciclo intra-eritrocitário, observa-se uma redução de 37,1% e 48,40% da população de esquizonte, na cultura tratada com 1 μM e 2 μM de rottlerin, respectivamente, quando comparado com a cultura controle (incubada com DMSO) para cada tempo. Em 36 - 44 horas do ciclo, esta taxa de redução aumenta drasticamente para 70,42% e 71,83%, e por fim, em 48 horas do ciclo ocorre uma redução de 75,75% e 100%. A não detecção das formas de esquizontes maduros tratadas pela rottlerin é particularmente relevante, uma vez que a porcentagem dos esquizontes da população não tratada se mantém superior a 0,6% (Fig. 27), uma vez que a parasitemia quantificada por esfregaços sanguíneos foi de 0,8%.

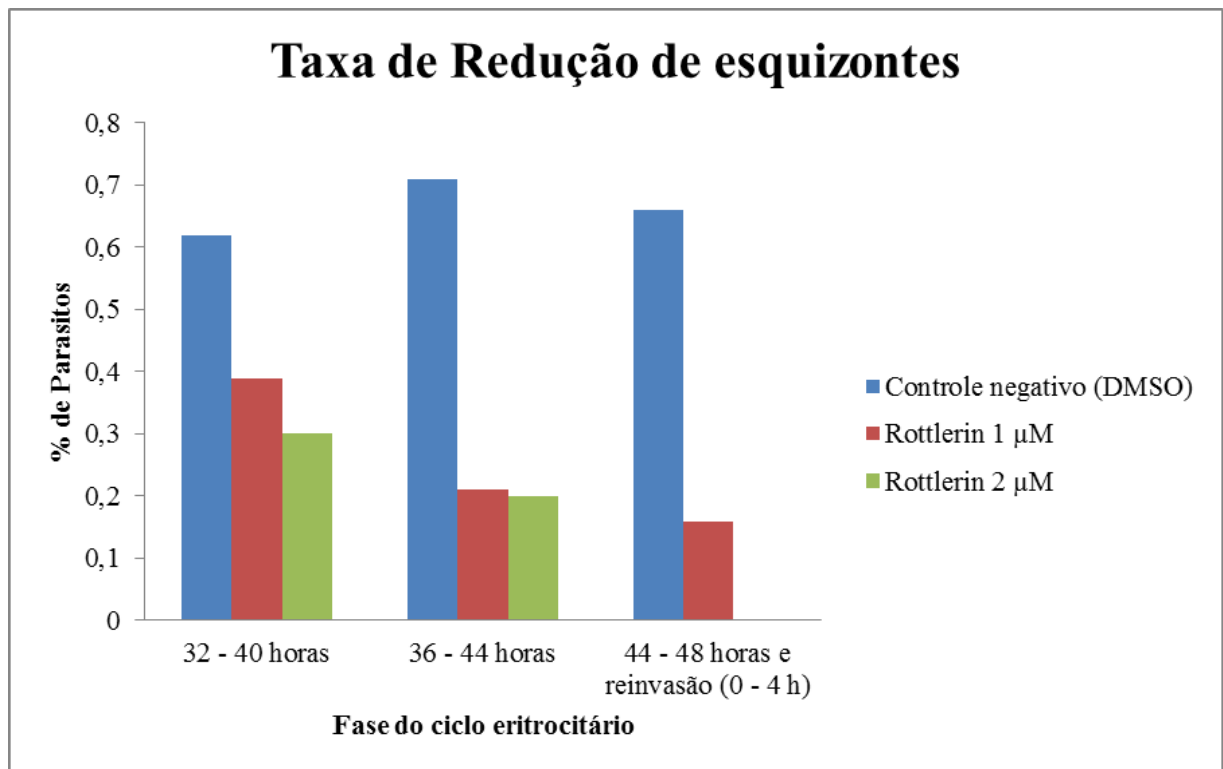


Figura 27: Parasitemia das culturas tratadas com rottlerin (1 μM e 2 μM) e não tratada durante a esquizogonia eritrocitária, nos intervalos 32-40 h, 36-44 h, e 44-4 h pós-invasão, determinada por citometria de fluxo pela medida das unidades de fluorescência relativa utilizando SYBR Green I.

5.5 Efeitos da rottlerin sobre a expressão proteica durante a esquizogonia eritrocitária de *P. falciparum* por proteômica comparativa

5.5.1 Obtenção dos parasitos no estágio esquizonte tratados e não tratados pela rottlerin

Uma cultura enriquecida de esquizontes sincronizada (numa janela de 40-44 h pós-invasão) foi dividida em 3 populações, denominadas tempo 0 (T0), rottlerin e DMSO. Os parasitos do T0 foram imediatamente submetidos a extração parasitária por lise eritrocitária com saponina e o sedimentado parasitário ressuspendido em 8 M ureia com coquetel de inibidores de proteases congelado à -80 °C. As populações rottlerin e DMSO foram respectivamente tratado por rottlerin 1 µM em DMSO e o mesmo volume de DMSO como controle. Após 1h30 em cultura, os parasitos (41h½ - 45h½ após invasão) destas duas populações foram também extraídos e congelado da mesma forma.

A figura 28 são imagens representativas dos esfregaços sanguíneos obtidos das culturas no tempo 0 (Fig. 28A – sem tratamento e tempo de incubação) e após 1h30 de incubação com e sem a droga (Figs. 28B e 28C). Pode-se observa que o tratamento ocorreu no estágio esquizonte, e após o tempo de tratamento (1h30) ainda havia parasitos viáveis (Fig. 28C), uma vez que se já estivesse ocorrido à lise destes não seria possível identificar a expressão diferencial de proteínas, uma vez que todo o sistema biológico estaria alterado.

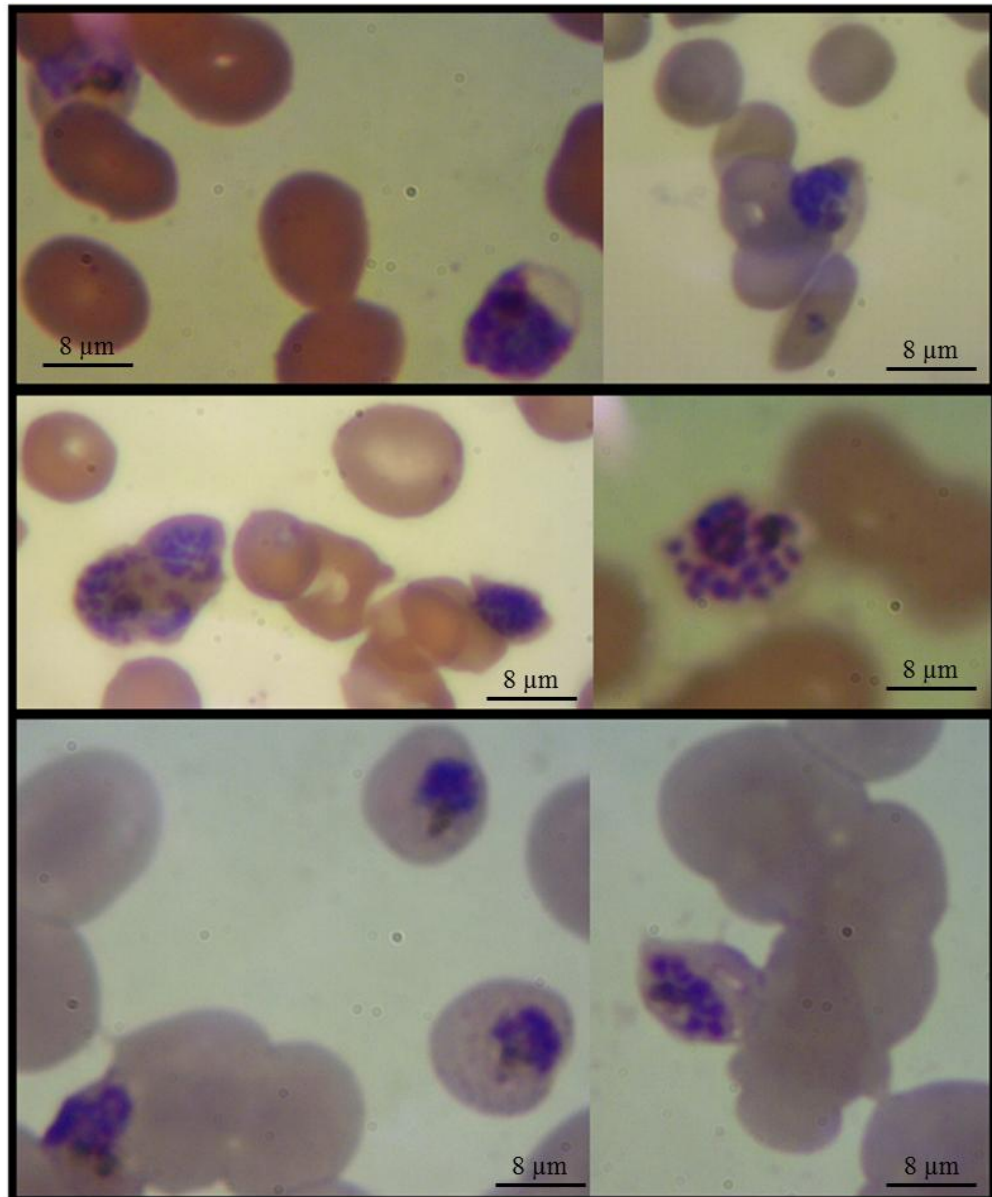


Figura 28: Efeitos da rottlerin na morfologia de esquizontes (40 - 44h após invasão) por visualização dos esfregaços por microscopia óptica (x100). **A.** Eritrócitos infectados no momento de tratamento com a droga (tempo 0). **B.** Eritrócitos infectados após 1 h e 30 min de incubação com DMSO (controle negativo). **C.** Eritrócitos infectados após 1 h e 30 min de incubação com rottlerin 1 μ M. As barras = 8 μ m

Para verificar a qualidade da extração parasitária, a integridade das proteínas parasitárias e a não contaminação por proteínas eritrocitárias, os extratos proteicos das três populações ressuspendidos em tampão de corrida *Laemmli* foram submetidos a SDS-PAGE 12%. Como observado na figura 29, não há degradação do material ou sinais de contaminação com substâncias interferentes como hemoglobina ou hemozoína, pois são visíveis bandas proteicas bem definidas, inclusive de alta massa molecular.

Desta forma, a concentração de saponina 0,15% (m/v) foi a melhor escolha, como sugerido por Sessler e colaboradores (2012), pois ocorre a hemólise completa, uma vez que bandas referentes a hemoglobina não são visualizadas. Além disso, não houve a lise da membrana dos parasitos e, assim, não houve a degradação ou perda das proteínas dos mesmos.

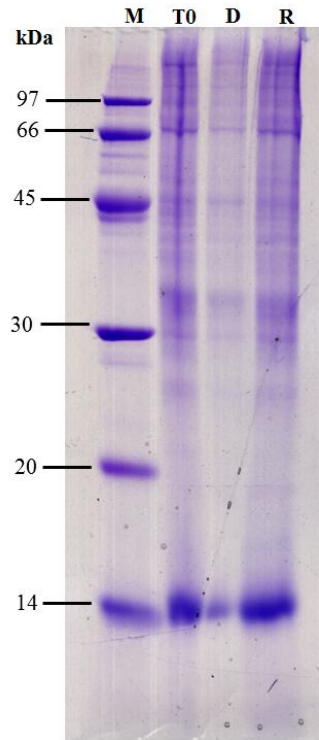


Figura 29: Perfil eletroforético de extrato total de *Plasmodium falciparum* em SDS-PAGE 12% corado com coomassie R-350. M: Marcador. T0: Tempo 0 (momento de tratamento com a rottlerin). D: controle (tratado 1h30 com DMSO). R: tratado 1h30 com rottlerin.

5.6 Proteômica comparativa por eletroforese bidimensional de esquizontes tratados e não tratados pela rottlerin

5.6.1 Padronização de eletroforese bidimensional para extrato parasitário de *P. falciparum*

A fim de alcançar uma análise proteômica comparativa entre os extratos das populações tratadas e não tratadas com rottlerin, inicialmente uma etapa de padronização da eletroforese 2D foi realizada, a partir do protocolo otimizado descrito por Charneau e colaboradores (2007) com uma modificação. Isso foi necessário, pois o preparo de amostras possui características específicas e tem efeito direto na qualidade das separações, podendo

prejudicar a análise dos *spots*. A modificação realizada foi a substituição de Triton X-100 por CHAPS no tampão 2D de solubilização, como tem sido sugerido na literatura (NIRMALAN, SIMS E HYDE, 2004; BRIOLANT *et al.*, 2010; SMIT *et al.*, 2010).

Desta forma foi obtido o primeiro gel 2D, corado com nitrato de prata, de extrato de *P. falciparum* (Fig. 30). Apesar da grande maioria dos *spots* serem bem definidos, algumas estrias verticais ligadas a determinados *spots* proteicos, na região alcalina e estrias horizontais entre as massas moleculares de 45 a 30 kDa serem visíveis.

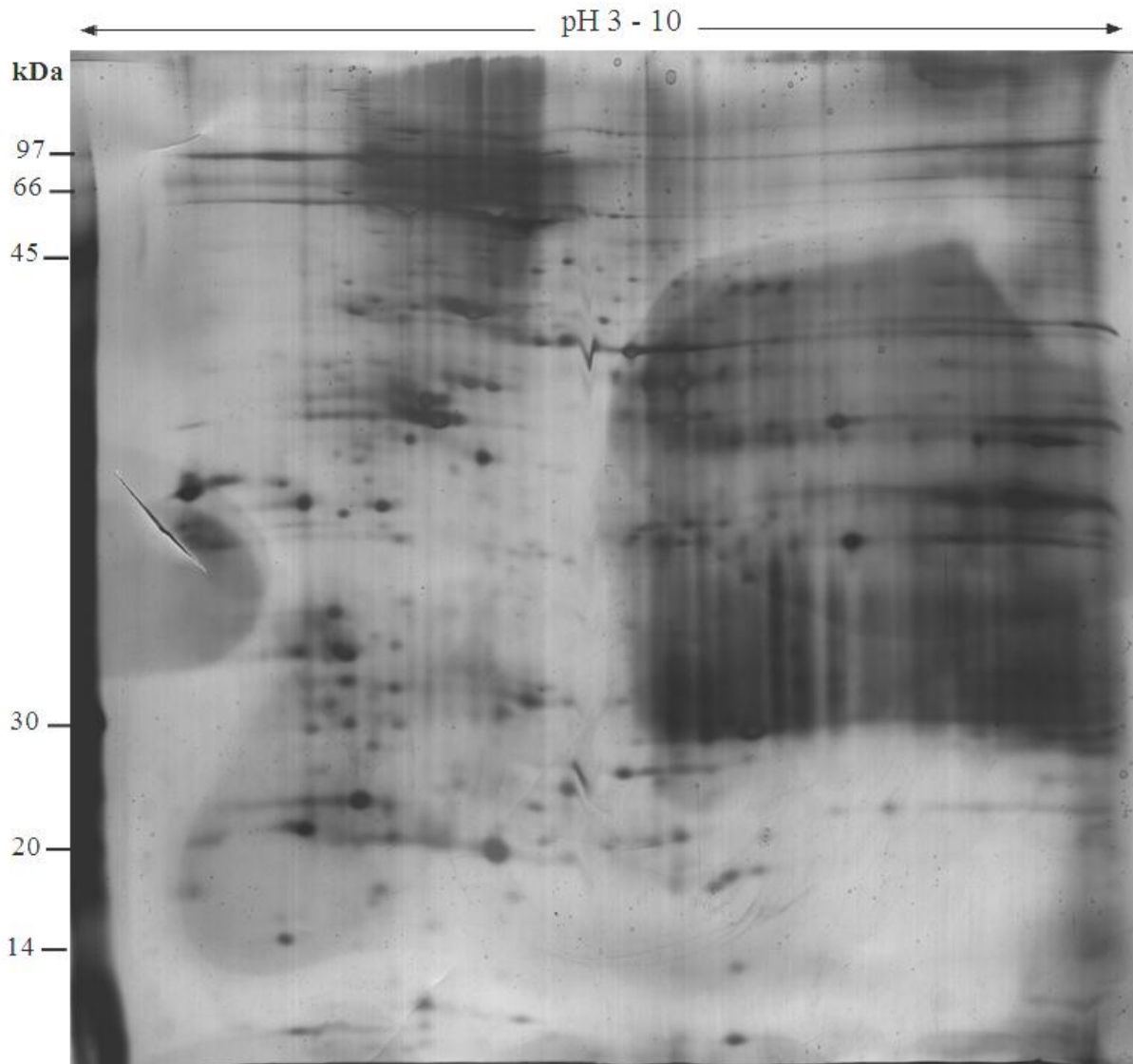


Figura 30: Perfil 2DE de extrato de esquizonte de *P. falciparum* corado com nitrato de prata. A focalização isoeletrica foi realizada a partir de 70 μ g de proteínas e em uma janela de pH linear de 3-10 e a segunda dimensão em SDS-PAGE 12%.

5.7 Comparação preliminar dos perfis eletroforético 2D de esquizontes tratados e não tratados pela a rottlerin

Após a otimização das condições de extração e separação, foram feitos os géis 2D analíticos, empregando fitas de 18 cm com intervalo de pH de 3 a 10. A figura 31, mostra os perfis de extratos parasitários da cepa S20 de *Plasmodium falciparum* obtidos a partir de cultura tratada pela rottlerin (1 μ M) por 1h30 e não tratada (DMSO).

Tendo em vista que o objetivo foi avaliar as diferenças de expressão proteica, é importante a escolha correta do método de coloração dos géis. Portanto, os géis foram corados com azul de *Coomassie Brilliant Blue G-250* coloidal, pois possui as seguintes vantagens: o baixo custo, a boa detecção e reprodutibilidade, ligação quantitativa do corante às proteínas (WESTERMEIER E MAROUGA, 2005), e a compatibilidade com a espectrometria de massas do tipo MALDI, somado ao fato de que cada *spot* corado possui a quantidade ideal de proteína necessária para a sua identificação por essa metodologia (MILLER, CRAWFORD E GIANAZZA, 2006).

Os géis 2D apresentaram resolução satisfatória, pois os *spots* mostraram-se bem resolvidos na faixa de pH 3-8, como observado nos trabalhos de Smit e colaboradores (2010).

Embora tenha sido feito apenas uma replicada destes géis, pôde-se observar que os perfis eletroforéticos estão bem semelhantes. Com relação à distribuição das proteínas no gel, existe um maior número e intensidade de *spots* na faixa ácida, que deixa supor que existe uma maior quantidade de amostra na condição não tratada (DMSO) em comparação com a amostra da condição tratada pela rottlerin que foi aplicada nos géis 2D.

Em uma análise preliminar, foram detectados 3 *spots* que estão presentes na condição não tratada e que não são observados na condição tratada, destacados na figura 31.

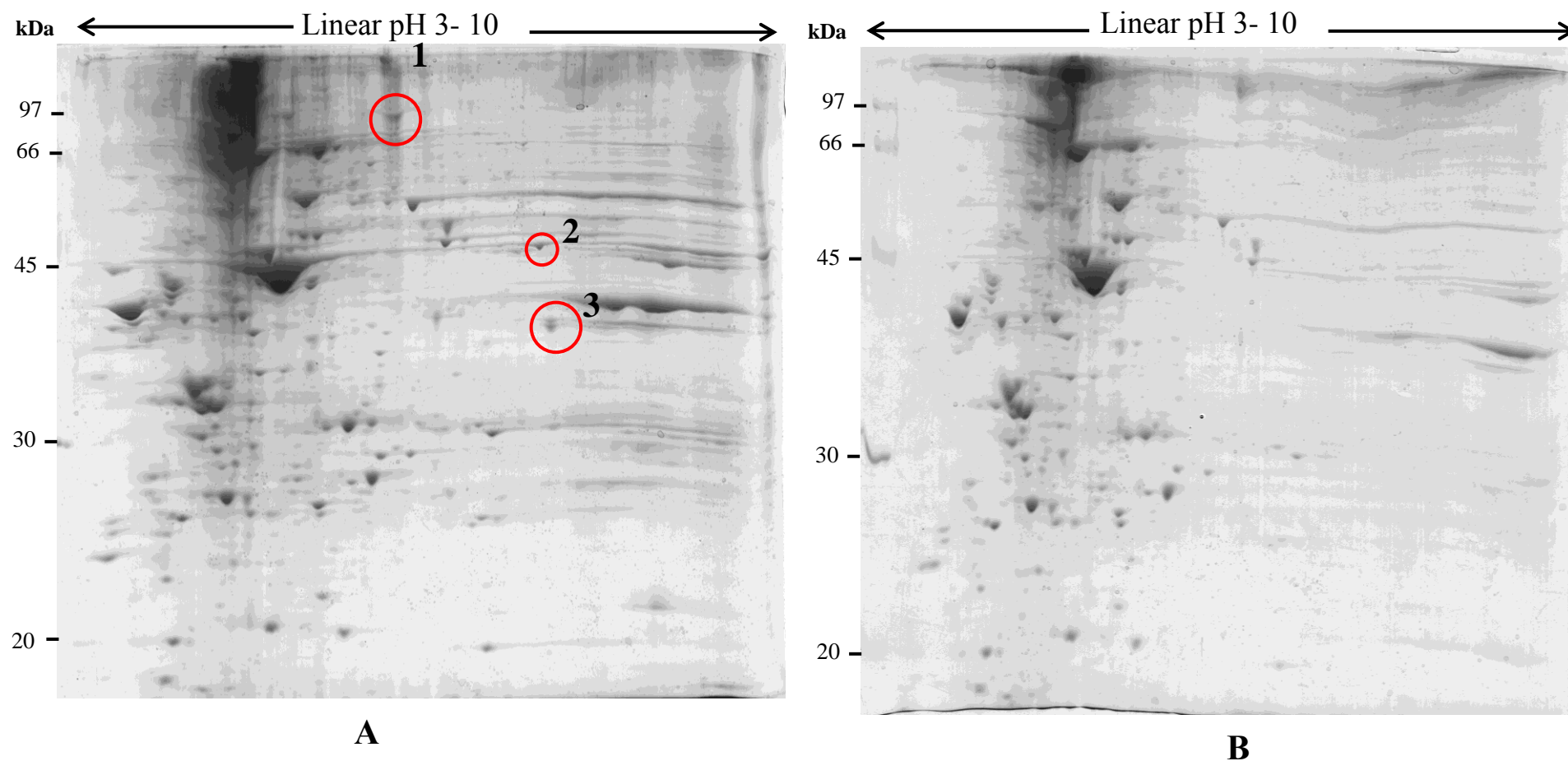


Figura 31: Perfis eletroforético 2D de extratos proteicos obtidos a partir da extração parasitária de culturas de esquizonte não tratadas (A) e tratadas (B) com rottlerin por 1h30, corado com azul de Coomassie coloidal. A focalização isoeletrica foi realizada em paralelo a partir de 165 µg de proteínas para cada uma das populações em uma janela de pH linear de 3-10 e a segunda dimensão em SDS-PAGE 12%.

5.8 Identificação por *Peptide Mass Fingerprinting* dos 3 spots superexpressos em esquizontes não tratados pela rottlerin

Os digestos trípticos dos três *spots* somente presentes no gel 2D de esquizontes não tratados pela rottlerin foram analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF. Por *Peptide Mass Fingerprinting*, 3 proteínas de *P. falciparum* foram identificadas estatisticamente significativas, e com *pI* e massas moleculares teóricos similares aos experimentais (tabela 6). As pequenas diferenças de *pI* e massas moleculares são provavelmente devido às modificações pós-traducionais. Por exemplo, um grupo fosfato ligado a um resíduo de aminoácido de uma proteína adiciona uma carga negativa a proteína. Uma única fosforilação diminui o valor do *pI* de 0,1 e aumenta a massa de 80 Da (CHARNEAU *et al.*, 2011). Por outro lado, *N*- e *O*-glicosilações aumentam radicalmente a massa molecular de proteínas.

As proteínas de *P. falciparum* identificadas são: proteína de choque térmico 90 (pHSP90) com uma região histidina quinase, 3-fosfoglicerato quinase (Pf3-PGK), e a lactato desidrogenase (PFLDH).

Estas proteínas estão envolvidas no processo de enovelamento proteico (chaperona) e no metabolismo de glicose. Ademais, estas proteínas têm em comum o fato de serem potenciais alvos de drogas antimaláricas e de pertencer à classe de proteínas quinases ou possuem um domínio de interação com quinase.

Tabela 6: Identificação dos *spots* proteicos selecionados de *P. falciparum* por *peptide mass fingerprinting* (PMF).

Número do <i>spot</i> ^a	Identidade <i>P. falciparum</i> ^b	Número de acesso (NCBI) ^c	Pontuação ^d	Cobertura ^e (%)	Massa experimental e teórica (kDa) ^f	pI experimental e teórico ^g
1	Proteína de choque térmico 90 com uma região histidina quinase	gi 510182	73 > 56	11	91 / 86,57	6,25 / 4,94
2	3- Fosfoglicerato quinase	gi 343197194	58 > 56	16	47 / 45,76	7,75 / 7,26
3	Lactato desidrogenase	gi 371444767	111 > 56	45	39 / 20,16	7,84 / 9,10

^a Números dos *spots* segundo a figura 31;

^b Resultados obtidos com buscas no banco de dados NCBI^{nr} utilizando a ferramenta MASCOT (Matrix Science);

^c Números de acesso a informações sobre as proteínas no banco de dados NCBI;

^d Do inglês '*score*', resultado da análise com o algoritmo da ferramenta MASCOT que avalia a possibilidade do conjunto de peptídeos submetidos à busca serem os mesmos encontrados no banco de dados originados de uma digestão *in silico* de uma proteína conhecida. Os números apresentados após o símbolo de ">" representam a pontuação mínima necessária, segundo o algoritmo utilizado, para que a correspondência da proteína da busca com a proteína encontrada seja estatisticamente significativa ($p < 0,05$);

^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativa ao tamanho total da proteína encontrada;

^f Massas moleculares, em kDa, encontradas nos géis 2DE (experimental) e presentes na descrição da proteína no banco de dados (teórica) representadas respectivamente;

^g Pontos isoelétricos das proteínas encontradas nos géis 2DE (experimental) e presentes na descrição da proteína no banco de dados (teórico) representados respectivamente.

6. DISCUSSÃO

6.1. Implementação dos testes de atividade antiplasmodial por SYBR Green I

O rápido surgimento de cepas resistentes às drogas antimaláricas tornou-se um dos maiores desafios para o controle da malária (WHO, 2005). Este cenário revela a importância da realização de estudos que busquem novas alternativas terapêuticas contra a malária, bem como ensaios que sejam eficientes para processo de triagem de novas drogas.

Durante décadas, os métodos de rotina (padronizados) para avaliar a atividade antiplasmodial de uma droga *in vivo* eram através da determinação da parasitemia por microscopia ótica (SANCHEZ, 2007) e *in vitro*, principalmente, pelo robusto método de incorporação de [³H]-hipoxantina (DESJARDINS *et al.*, 1979; ELABBADI, ANCELIN E VIAL, 1992).

A contagem da parasitemia pela microscopia ótica, apesar de específica e sensível, é uma técnica muito laboriosa, demanda muito tempo e está sujeita a vários fatores que prejudicam a sua precisão e reprodutibilidade, tais como uma boa preparação do esfregaço sanguíneo e da habilidade técnica do microscopista (Payne, 1988), principalmente quando um grande número de compostos está sendo avaliado, tornando o uso desta técnica limitada (SANCHEZ, 2007). A grande vantagem é de ver o parasito e por consequência observar a sua morfologia.

Em contrapartida, o método semi-automatizado baseado na incorporação de hipoxantina tritiada possui as vantagens de permitir avaliar a atividade de um grande número de compostos, de forma precisa e confiável. Mas apresenta a desvantagem de ser um método radioativo: radioisótopos relativamente caros (dificuldades na compra e na importação de materiais radioativos para Brasília), regras de segurança especiais para o manuseio e geração de resíduos radioativos (SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BAGAVAN *et al.*, 2011).

Existem outros métodos não radioativos que foram desenvolvidos, denominados métodos colorimétricos, com a finalidade de substituir o método convencional de incorporação de hipoxantina tritiada. Esses métodos colorimétricos apresentam algumas vantagens em relação ao método de Desjardins e colaboradores (1979), pois não necessitam de um marcador radioativo. Porém o alto custo das técnicas, associado à presença de reações falso-positivas, limitam os testes para a triagem de rotina de antimaláricos e obrigam a validação por observação de esfregaços. Dentre estes métodos, os mais utilizados são: teste de atividade enzimática do pLDH, imunodeteção de uma proteína rica em histidina do parasito HRP2 e DELI, por anticorpos monoclonais (NOGUEIRA E DO ROSÁRIO; BASCO *et al.*,

1995; DRUILHE *et al.*, 2001; NOEDL *et al.*, 2003; NOEDL *et al.*, 2004; SANCHEZ, 2007; TOTINO *et al.*, 2008).

Desta forma, buscando implementar um processo de triagem de drogas que envolvesse um ensaio simples, com economia de custos, robusto, reprodutivo, semi-automatizado e comparável aos ensaios com radioisótopo, o ensaio de atividade antiplasmoidal baseado em fluorescência foi padronizado.

Este teste se baseia no contraste entre as células do hospedeiro e o parasito, já que as hemácias não possuem DNA e RNA. Portanto, os parasitos são facilmente detectados através das moléculas intercalantes de DNA que possuem propriedade de fluorescer (fluoróforos) quando ligados a ácidos nucleicos (NOGUEIRA E DO ROSÁRIO; SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BAGAVAN *et al.*, 2011). O fluoróforo de escolha foi o SYBR Green I (Life Technologies).

A determinação de IC_{50} através dos resultados gerados por este método requer apenas uma comparação da quantidade de ácido nucleico detectada por fluorescência em função das concentrações decrescentes da droga, plotando estes dados em um gráfico do tipo dose-resposta. Não havendo a necessidade de técnicas que envolvam várias etapas para obter uma verdadeira quantificação de DNA ou de controles precisos necessários para a comparação dos níveis de crescimento absoluto entre os diferentes experimentos (SMILKSTEIN *et al.*, 2004).

Este método apresenta uma série de vantagens quando comparado ao método convencional. Destacando-se a simplicidade e alto rendimento, uma vez que não há necessidade da utilização de radioisótopos, da transferência do conteúdo testado para filtros de fibra de vidro e preparação do filtro de isótopo por contagem de cintilação, eliminando, assim, procedimentos complicados. A manipulação é segura e não há preocupação na eliminação de lixo radioativo. Consequentemente, há uma otimização do tempo, pois é uma técnica em que a adição de reagente, mistura, e incubação pode ser realizada numa única etapa, sem qualquer transferência de amostra (SMILKSTEIN *et al.*, 2004).

As limitações deste método estão relacionadas com as características dos compostos que serão testados, pois se estes possuem autofluorescência com excitação e emissão ao longo do intervalo de fluorescência do SYBR Green I, poderá gerar dificuldade na interpretação dos dados. Uma segunda limitação teórica, embora esta possibilidade pareça remota, dada a afinidade extraordinária de SYBR Green I para os ácidos nucleicos, envolve drogas que interagem com os ácidos nucleicos e, assim, podem competir com a ligação de SYBR Green I (SMILKSTEIN *et al.*, 2004).

Uma etapa de validação do método baseado em fluorescência utilizando o SYBR Green I foi realizada para avaliar várias condições que poderiam interferir no sucesso do ensaio. Em um primeiro momento, foi selecionada a cloroquina como referência, uma vez que são conhecidos os IC₅₀ e IC₉₀ da ordem de dezenas de nanogramas de acordo com as cepas. Assim foram testadas diferentes concentrações de hematócrito, e por consequência, de parasito, bem como a quantidade de intercalante (1x, 2x, 5x no tampão de lise). A quantidade de células (hematócrito de 2% ou 4%) pode influenciar, pois o volume de meio de cultura adicionado em cada poço é limitado a 100 µL, podendo estas células morrerem devido um estresse metabólico, gerando resultados falso-positivos. Já a concentração do intercalante está relacionada com a qualidade do sinal de fluorescência detectado, uma vez que quantidades insuficientes não vão gerar sinais suficientemente detectáveis pelo espectrofluorímetro, por outro lado, quantidades excessivas podem gerar sinais que ultrapassam o limite máximo de detecção do equipamento.

Os valores experimentais de IC₅₀ e o IC₉₀ detectados para cloroquina em todas essas condições foram semelhantes (9-11 ng/mL de 16-19 ng /mL), mostrando que todas as condições testadas podem ser utilizadas para o ensaio, além de demonstrar que o método é reprodutivo. Desta forma, a quantidade de células (hemácias e parasitos) e a concentração de SYBR Green I padronizadas foram: 2% de hematócrito e 1% de parasitemia e 2x (0,2 µL de SYBR Green I 10.000X por mL de tampão lise), uma vez que estes parâmetros foram suficientes para determinar o IC₅₀ da cloroquina de forma adequada.

Observou-se também durante os testes de otimização que uma etapa de congelamento antes da adição do tampão com SYBR Green I auxiliou no processo de lise das hemácias.

Assim, o método baseado no SYBR Green I, padronizado pelo grupo, é uma ferramenta valiosa para contribuir na criação do centro de pesquisa em descoberta quimioterapêutica contra a malária no Distrito Federal.

A descoberta de duas importantes drogas de origem vegetal que tiveram um sucesso terapêutico contra a malária: quinina e artemisinina (CORBETT *et al.*, 2004; SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BAGAVAN *et al.*, 2011), tem inspirado o desenvolvimento de novas pesquisas na busca de novos agentes antimaláricos a partir de plantas. O Brasil possui biomas de repercussão internacional. O Cerrado, segundo maior bioma brasileiro, possui a flora mais rica de todas as savanas mundiais (EMBRAPA, 2008). Consequentemente, a natureza brasileira oferece uma biodiversidade quase inesgotável.

Assim numa segunda etapa, realizamos testes antiplasmodias com o método de incorporação de [H³]-hipoxantina realizado no laboratório do Prof. Grellier do *Muséum*

National d'Histoire Naturelle e o método de detecção do SYBR Green I no departamento de Biologia Celular da UnB utilizando extratos da planta *Qualea grandiflora* Mart. típica dos cerrados da Amazônia, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul.

Neste estudo, os resultados da atividade antiplasmodial das subfrações cromatográficas do extrato com o solvente polar acetato de etila das folhas de *Q. grandiflora* testado pelos dois métodos foram comparados. Esses dados reforçam que o método de detecção do SYBR Green I é relevante, uma vez que não havia grandes diferenças entre os IC₅₀ e IC₉₀ obtidos a partir de cada método.

Com a exceção das subfrações 1, 2 e 5 que apresentaram uma atividade moderada, as outras não apresentaram atividade antiplasmodial significativa, assim como nenhuma subfração apresentou atividade citotóxica e hemolítica aparente. As subfrações 1, 2 e 5 são das menos polares eluídas do extrato com o solvente polar acetato de etila.

Q. grandiflora vem sendo utilizada na medicina popular com vários desígnios, principalmente para doenças de pele e em processos inflamatórios. Estudos recentes com extratos das partes desta planta têm demonstrado atividade contra alguns microrganismos, principalmente as bactérias Gram-positivas, especialmente para a espécie *Staphylococcus aureus* (ALVES *et al.*, 2000; DA SILVA JÚNIOR E DOS SANTOS, 2005; AYRES *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008; DE MOURA, DO NASCIMENTO E GAROFALO, 2012).

Estudos realizados com os extratos etanólicos das folhas desta planta demonstraram atividade inibitória sobre cepas de bactérias Gram-positivas, apresentando eficácia tanto para as cepas sensíveis quanto aos microrganismos resistentes, tais como as cepas de *S. aureus* (MRSA) e *S. epidermidis* (MRSE) resistentes à meticilina e resistentes aos antimicrobianos existentes. No entanto não havia atividade significativa em Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (AYRES *et al.*, 2008; DE MOURA, DO NASCIMENTO E GAROFALO, 2012).

E em estudos utilizando extratos metanólicos, etanólicos e hidroalcólicos da casca de *Q. grandiflora* demonstraram atividade inibitória sobre as cepas *S. aureus* e *P. aeruginosa* (ALVES *et al.*, 2000; DE MOURA, DO NASCIMENTO E GAROFALO, 2012).

Análises fitoquímicas realizadas com extratos etanólicos da casca de *Qualea grandiflora* revelaram a presença de saponinas, triterpenos, esteroides, taninos, compostos fenólicos, catequina - um fitonutriente da família dos polifenóis que tem uma ação antioxidante (COSTA *et al.*, 2008). Sabe-se que os taninos e triterpenos possuem atividade de inibição microbiana, o que corrobora com os achados das pesquisas realizadas com extratos desta planta (AYRES *et al.*, 2008). Estes resultados indicam que os constituintes químicos

com caráter mais polar da casca de *Q. grandiflora* são importantes, pois apresentam potencial antibacteriano, principalmente frente bactérias Gram-positivas.

Um estudo realizado com a fração lipofílica desta planta, através de uma extração hexânica da casca, não demonstrou, em nenhuma das concentrações testadas, atividade inibitória aos microrganismos utilizados, inclusive contra as bactérias Gram-positivas (DE MOURA, DO NASCIMENTO E GAROFALO, 2012).

Desta forma, uma análise fitoquímica das subfrações 1, 2 e 5 do extrato com acetato de etila das folhas desta planta seria interessante, para identificar quais são os compostos e moléculas presentes neste caso que podem possuir atividade antimalárica.

De forma geral, os IC₅₀ e IC₉₀ obtidos, tanto para as subfrações da planta quanto para moléculas com atividade conhecida (cloroquina e rottlerin), pelo método baseado em fluorescência utilizando o SYBR Green I foram semelhantes aos obtidos pelo método baseado na incorporação de hipoxantina tritiada (método de referência). As pequenas diferenças entre estes valores são previstas, e também está relatado na literatura (SMILKSTEIN *et al.*, 2004), corroborando com dados da literatura (SMILKSTEIN *et al.*, 2004; BAGAVAN *et al.*, 2011), demonstrando a viabilidade daquele ensaio em triagens de compostos com atividade antimalárica.

No entanto a realização de estudos adicionais para um melhor entendimento das limitações e interferentes deste teste é necessária para determinar, com segurança, se este método baseado em fluorescência será um adjuvante ou um substituto para os testes baseados em radioatividade. A partir destes resultados é necessário traçar estratégias e buscar otimizações para assegurar a reprodutibilidade e a precisão deste ensaio.

6.2. Efeitos da rottlerin sobre o ciclo biológico de *P. falciparum*

Para entender os efeitos da rottlerin sobre o ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum*, foi necessário escolher uma metodologia que fosse suficientemente eficiente para detectar a viabilidade dos parasitos, distinguindo hemácias não infectadas e infectadas, e mais ainda, identificar os diferentes estágios de vida do parasito, para mostrar com segurança em qual momento deste ciclo a droga tem efeito.

Uma poderosa ferramenta para a separação e quantificação de células é a citometria de fluxo e tem sido uma metodologia utilizada há mais de 30 anos para a detecção e contagem de parasitos da malária (HOWARD, BATTYE E MITCHELL, 1979). Mais recentemente, estudos estão sendo publicados mostrando que esta técnica é útil para a análise dos diferentes

estágios sanguíneos do protozoário (TOTINO *et al.*, 2008; IZUMIYAMA *et al.*, 2009; BEI *et al.*, 2010; KAUSHANSKY *et al.*, 2012; KUSS *et al.*, 2012; PHILIPP *et al.*, 2012).

Desta forma, esta técnica foi escolhida para observar a ocorrência da morte do parasito em função do tratamento com a rottlerin e verificar se esta morte é específica em alguma fase do ciclo intra-eritrocitário do *P. falciparum*.

Os resultados mostram que não foi possível fazer uma distinção entre hemácias infectadas e não infectadas pelo parâmetro de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) em escala linear, pois não havia distribuição característica entre as diferentes populações nestes gráficos. No entanto, em estudos que utilizaram a representação gráfica de FSC *versus* SSC em escala logarítmica conseguiram separar as populações de eritrócitos não infectados e eritrócitos infectados por diferentes estágios de vida (SANCHEZ, 2007; TONTINO *et al.*, 2008). A apresentação de dados em uma escala logarítmica pode ser útil quando as populações analisado por citometria de fluxo ficam muito dispersas na representação do *Dot Plot*, uma vez que o logaritmo reduz a representação a uma escala mais fácil de ser visualizada e manejada (RODRIGUES, 2012).

Em um estudo publicado utilizando esta mesma técnica também revelou esta dificuldade de separação de populações utilizando estes parâmetros, sendo necessária a marcação de estruturas parasitárias para diferenciar tanto hemácias não infectadas e infectadas, quando os estágios de vida do parasito (PHILIPP *et al.*, 2012)

Na literatura existem vários tipos de marcação para *P. falciparum* no ciclo intra-eritrocitário, sendo que os principais são baseados em intercalantes de DNA, tais como SYTO-16, laranja tiazolo, hidroetidina, YOYO – 1, rodamina DNA, DRAQ-5, Vybrant[®] DyeCycle[™] Violet e SYBR[®] Green I. O princípio da utilização destes intercalantes está fundamentado no fato dos eritrócitos serem células anucleares, desta forma os eritrócitos infectados pelo protozoário podem ser detectados e distinguidos de eritrócitos não infectados, (NYAKERIGA *et al.*, 2006; GRIMBERG *et al.*, 2008; IZUMIYAMA *et al.*, 2009; KARL *et al.*, 2009; BEI *et al.*, 2010; THERON *et al.*, 2010; MALLERET *et al.*, 2011). Além disso, no crescimento normal destes parasitos nas hemácias ocorre um aumento do número de núcleos, tornando, assim, possível identificar os estágios de vida, uma vez que a intensidade de fluorescência é proporcional ao aumento da quantidade de DNA presente na célula (BEI *et al.*, 2010; PHILIPP *et al.*, 2012).

Cada corante tem vantagens e desvantagens. Alguns dos corantes não têm sensibilidade suficiente e/ou exigem procedimentos de preparação complicados, tais como etapas de fixação e permeabilização, às vezes sendo necessária uma etapa de hemólise,

ocasionando a perda de parasitos viáveis, restringindo, assim, seu uso para diferentes estudos de uma única célula em ensaios por abordagem de citometria de fluxo (GRIMBERG *et al.*, 2008; IZUMIYAMA *et al.*, 2009; BEI *et al.*, 2010; PHILIPP *et al.*, 2012).

Outra limitação que as metodologias de marcação de ácidos nucléicos apresentam é o aparecimento de fluorescência inespecífica (QUASHIE, DE KONING E RANFORD-CARTWRIGHT, 2006).

Na tentativa de superar estas limitações, foi selecionado o SYBR Green I. Este intercalante fluorescente de DNA é altamente seletivo, e dispensa etapas de fixação e permeabilização, pois tem propriedade de permear membranas tanto da hemácia quanto do parasito, não sendo necessária a lise eritrocitária, evitando assim, a perda de parasitos viáveis para o teste (BEI *et al.*, 2010; PHILIPP *et al.*, 2012).

Este intercalante, SYBR Green I, emite no canal FL1 de isotiocianato de fluoresceína (FITC), uma vez que possui uma máxima de excitação em 497 nm e emissão em 520 nm. Ele possui uma preferência aproximadamente 11 vezes maior por DNA de fita dupla em comparação com DNA de fita simples (ZIPPER *et al.*, 2004) e tem uma baixa afinidade de ligação para o RNA (BEI *et al.*, 2010). Embora os reticulócitos podem conter RNA, os eritrócitos maduros são desprovidos de DNA e RNA, e são as células hospedeiras para do *P. falciparum*. Desta forma, não há problemas para aplicabilidade deste intercalante neste caso, e assim fluorescências de intensidade consideráveis (definida pela positividade realizada na etapa de padronização da marcação com SYBR Green I) detectadas foram atribuídas ao DNA do parasito (BEI *et al.*, 2010).

Por estas razões, o SYBR Green I tem sido o intercalante de escolha em abordagens por citometria de fluxo em estudos publicados na literatura, mostrando que é possível a detecção de hemácia parasitadas e não parasitadas, e assim determinar a parasitemia (QUASHIE, DE KONING E RANFORD-CARTWRIGHT, 2006; IZUMIYAMA *et al.*, 2009; BEI *et al.*, 2010; THERON *et al.*, 2010). Ademais, permite a observação dos parasitos em distintos estágios de diferenciação do ciclo intra-eritrocitário, de acordo com o conteúdo de DNA (Fig. 24 a 24) (IZUMIYAMA *et al.*, 2009; BEI *et al.*, 2010; PHILIPP *et al.*, 2012).

Como pode ser observado nos gráficos de distribuição de fluorescência obtidos em outros estudos (Fig. 32), o primeiro pico, com intensidade de fluorescência menor refere-se a população de hemácias infectadas por formas jovens, principalmente anéis. Com a transição da cultura de anéis para trofozoítos jovens do parasito, o DNA começa a se replicar formando um segundo pico com intensidade de fluorescência intermediária. O citômetro de fluxo é incapaz de distinguir entre a fluorescência emitida por um eritrócito multiparasitado por 2 ou

3 parasitos que estejam no estágio anel de um único eritrócito infectado por trofozoíto jovem. Por fim, devido às divisões nucleares características do estágio esquizonte, este possui uma quantidade superior de DNA, formando o último pico com maior intensidade de fluorescência (IZUMIYAMA *et al.*, 2009; BEI *et al.*, 2010; PHILIPP *et al.*, 2012)

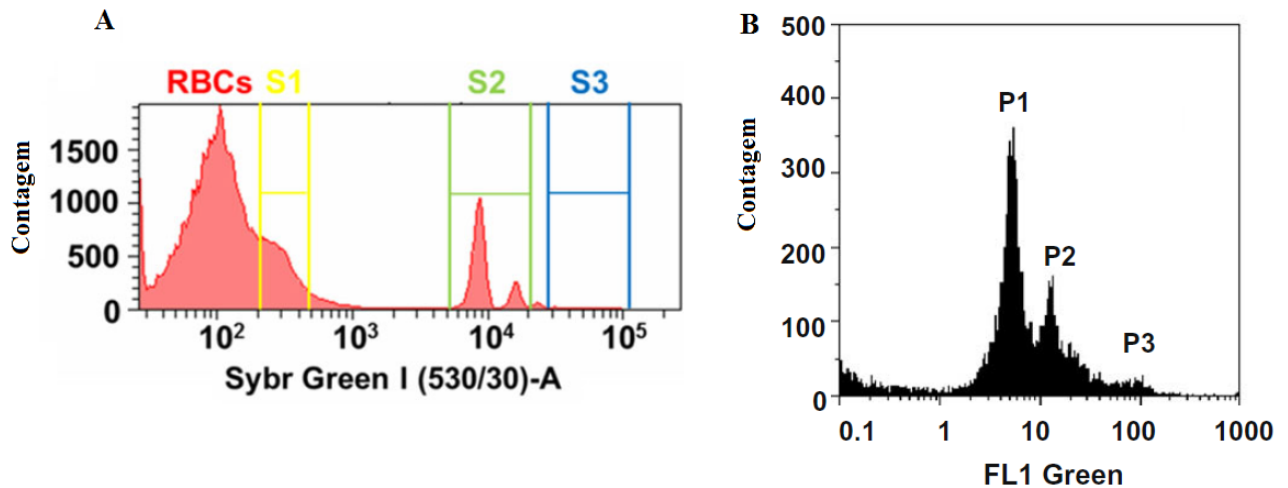


Figura 32: Histograma da distribuição de fluorescência em culturas de *P. falciparum* em outros estudos. **A.** S1 (amarelo) consiste em hemácias somente, S2 (verde) representa uma população rica em estágios de anéis e S3 (azul) uma população rica em estágios tardios (PHILIPP *et al.*, 2012). **B.** P1 são parasitos em estágio de anel ou trofozoítos jovens, P2 são trofozoítos maduros e esquizontes jovens e P3 são esquizontes maduros (IZUMIYAMA *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos aqui demonstram que a proporção de eritrócitos fluorescentes não apresentou diferença em relação à parasitemia determinada pelos esfregaços sanguíneos corados por Giemsa (Figs. 24 a 26 do resultado). Demonstrou-se ainda que eritrócitos não infectados não apresentaram fluorescência inespecífica (autofluorescência) pela técnica de citometria de fluxo, após os ajustes corretos dos parâmetros (Figs. 22), no entanto, quando utilizou-se eritrócito infectados e marcados (Fig. 22D) foi observada uma sobreposição de hemácias não infectadas com hemácias infectadas por formas jovens. A intensidade de fluorescência de SYBR Green I foi proporcional ao número de núcleos e a quantidade de ácido nucléico, ou seja, quanto mais velhas eram as formas (trofozoíto e esquizontes), maior o sinal de fluorescência detectado (Fig. 24 do resultado).

Observou-se uma redução drástica da quantidade de parasitos viáveis na fase do ciclo em que os parasitos estariam predominantemente no estágio esquizonte, mostrando, assim, que os efeitos de morte celular provocados pela droga são específicos desta etapa do ciclo, corroborando com os achados anteriores do grupo (abordagem por Microscopia Eletrônica de Transmissão, dados descritos na introdução).

Um estudo semelhante (TOTINO *et al.*, 2008), também utilizando a citometria de fluxo para avaliar a susceptibilidade das formas eritrocitárias de *P. falciparum* a três inibidores de crescimento do parasito: SNAP, a cloroquina e estaurosporina. Neste caso, o marcador da viabilidade do parasita utilizado foi a rodamina 123, uma vez que os eritrócitos maduros humanos não têm organelas celulares, o acesso exclusivo a alterações na mitocôndria do parasito pode ser realizado sem a lise prévia das células hospedeiras (Fig. 33).

Os resultados que eles obtiveram foi a uma redução da parasitemia de 38%, 68% e 70%, em culturas mantidas com estaurosporina, SNAP ou cloroquina, respectivamente, enquanto que a cultura não tratada apresentou um padrão de crescimento normal parasitemia (Fig. 33), mostrando a capacidade dos três inibidores do crescimento do parasito de reduzir o número de parasitos viáveis (TOTINO *et al.*, 2008).

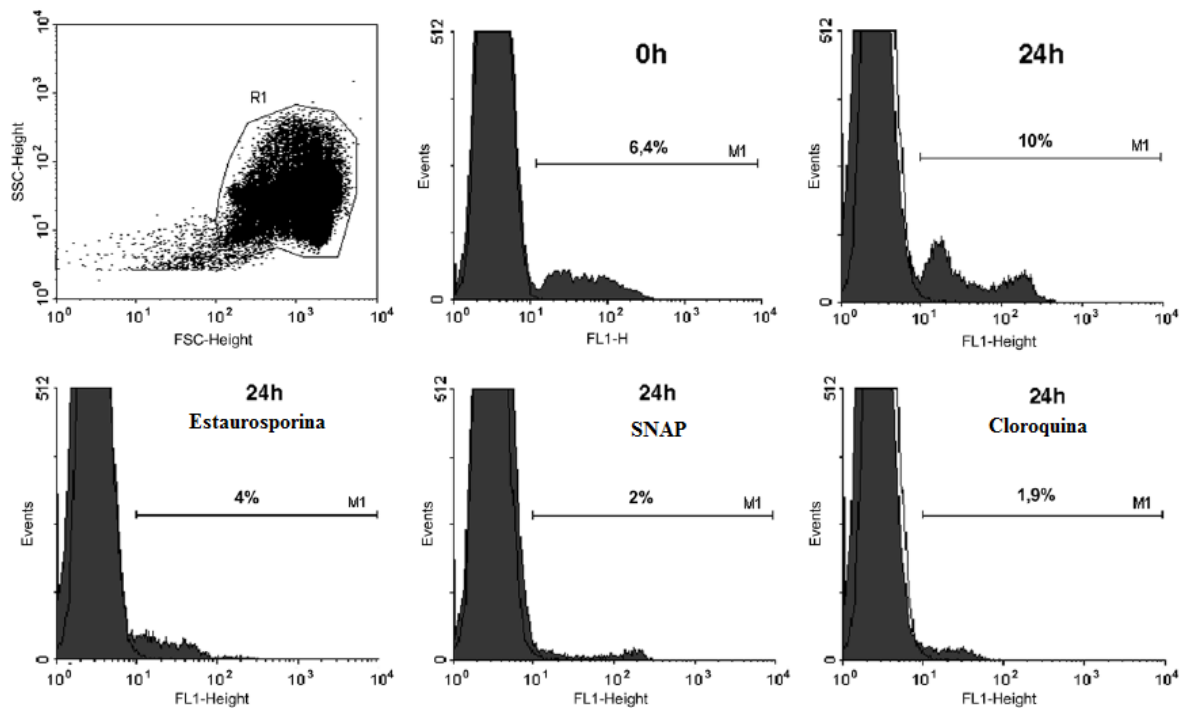


Figura 33: Efeito do SNAP, estaurosporina e cloroquina na viabilidade de *P. falciparum* avaliado por citometria de fluxo. A percentagem eritrócitos apresentando parasitos viáveis (M1) foi medido utilizando a rodamina 123 antes (0 horas) após 24 h de tratamento com SNAP, estaurosporina ou cloroquina. R1: região do gráfico de pontos que representa a população de eritrócitos analisados (TOTINO *et al.*, 2008).

Estes resultados são importantes porque corroboram de duas formas para os resultados obtidos neste estudo: primeiro a morte celular induzida por inibidor de proteína quinase

(estaurosporina), mas, no caso não é específico do estágio esquizonte. Segundo, pela utilização da citometria de fluxo para avaliar a taxa de morte celular em *P. falciparum*.

Foi demonstrado por citometria de fluxo que o efeito inibidor da rottlerin causa a morte rápida de *P. falciparum* em cultura quando é aplicada nas horas finais do ciclo intra-eritrocitário, durante a morfogênese dos merozoítos. Pela análise morfológica obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão (dados não publicados obtidos pelo Prof. Philippe Grellier, MNHN, França) comparado ao estudo citado (TONTINO *et al.*, 2008), a principal hipótese da ação desta droga sobre o *P. falciparum* em nível celular é a indução da autofagia. Como já é sabido, a rottlerin é um inibidor de proteínas quinases, e estas desempenham um papel essencial em muitas funções celulares, o que os torna alvos muito atraentes para o desenvolvimento de novas drogas contra agentes infecciosos eucariotos como o *Plasmodium*.

6.3. Análise proteômica comparativa preliminar por Eletroforese Bidimensional dos efeitos da rottlerin sobre a merogonia de *P. falciparum*

No passado, por uma abordagem transcriptômica dos efeitos da rottlerin nas últimas horas do ciclo intra-eritrocitário, utilizando a técnica de *microarray* de cDNA, foram identificados genes cuja a expressão é modulada por essa molécula. As proteínas encontradas experimentalmente estão envolvidas com os processos de transdução de sinal celular: como proteína fosfatase, proteína quinase, ou proteína fosfolipase D com domínio de interação com proteínas quinases. Poderia ser um conjunto de proteínas envolvidas numa mesma via metabólica (CHARNEAU, 2005).

Com base nestes achados pelo grupo, foi iniciado um estudo de proteômica comparativa, com o objetivo de avaliar a modulação da expressão proteica pela rottlerin. A abordagem utilizada neste estudo foi eletroforese bidimensional, ao qual foi possível detectar algumas diferenças na expressão de proteínas com o tratamento da rottlerin, em que houve o desaparecimento de determinadas proteínas nesta condição, constituindo um resultado relevante.

A proteína identificada a partir do *spot* 1 (Fig. 31 do resultado) foi uma chaperona denominada proteína de choque térmico (HSP) da família HSP90 (HtpG em *E. coli*). Proteínas de choque térmico são sintetizadas em resposta a elevação de temperatura, entretanto, outros estímulos de estresse também podem induzir a expressão deste grupo de proteínas, como a privação de nutrientes, adição de inibidores metabólicos ou análogos de aminoácidos e íons de metais pesados ou hipóxia. São proteínas presentes em todos os

organismos desde arqueobactérias a eubactérias, plantas, leveduras, invertebrados e vertebrados. Elas desempenham um papel fundamental em todas as células, onde atuam como chaperonas moleculares envolvidos na estabilização de proteínas parcialmente dobradas durante a montagem e /ou transporte intracelular (LINDQUIST E CRAIG, 1988; BONNEFOY *et al.*, 1994).

Em parasitos que possuem ciclo de vida em dois hospedeiros distintos, um invertebrado (inseto) e outro vertebrado, como é o caso do *P. falciparum*, a passagem do ambiente poiquilotérmico do inseto vetor para o hospedeiro vertebrado (homeotérmico) é acompanhada por drásticas alterações no ambiente, ao qual o parasito tem que se adaptar. Em particular, a mudança de temperatura em vários parasitos resulta em um aumento na expressão de várias proteínas do tipo HSP (LAWRENCE E ROBERT-GERO, 1985; GLASS, POLVERE E VAN DER PLOEG, 1986). Tem sido relatado também que as HSP podem desempenhar um papel na diferenciação celular e na sobrevivência em *T. brucei*, *L. major* (VAN DER PLOEG, GIANNINI E CANTOR, 1985; LEE, 1998) e *T. gondii* (SILVA *et al.*, 1998).

As proteínas da família HSP90 são as chaperonas mais abundantes de estresse constitutivamente expressas no citoplasma de células e possuem um papel fundamental no enovelamento e, portanto, no funcionamento de um grande número de proteínas, especialmente aquelas que participam da regulação do ciclo celular e transdução de sinal (BONNEFOY *et al.*, 1994; KUMAR, MUSIYENKO E BARIK, 2003; RAMDHAVE *et al.*, 2013). Os membros da família do gene Hsp90 tem se mostrado altamente conservados, mesmo as proteínas de eucariontes mais distantemente relacionados têm identidade de 50% dos resíduos de aminoácidos (LINDQUIST E CRAIG, 1988). A lista das proteínas que pertencem a este grupo é longa, e inclui as proteínas quinases, tais como Raf, Src, Lck, Wee1, MEK, Cdk4, Src e CK2, e fatores de transcrição como receptores de esteróides e p53. Por estas características, as HSP90 têm sido estudadas como um alvo de droga (KUMAR, MUSIYENKO E BARIK, 2003).

A sequência do gene de PfHsp90 foi caracterizada, e a sequência da proteína deduzida revelou sua grande semelhança com HSP90 de outras espécies e alta conservação entre os isolados de *P. falciparum* (KUMAR, MUSIYENKO E BARIK, 2003).

Com relação aos aspectos estruturais e funcionais da HSP90, estas proteínas possuem um domínio de ligação a ATP na extremidade do N-terminal (BONNEFOY *et al.*, 1994; KUMAR, MUSIYENKO E BARIK, 2003), um domínio de ligação de calmodulina, menos conservado (BONNEFOY *et al.*, 1994), e podem também estar associadas com as proteínas tubulina e actina do citoesqueleto (LINDQUIST E CRAIG, 1988; BONNEFOY *et al.*, 1994).

A ligação do ATP a HSP90 é dependente de cátion, ocasionando uma autofosforilação (BONNEFOY *et al.*, 1994) e possuem uma atividade ATPase (NADEAU, DAS E WALSH, 1993).

Em um estudo Busconi, Guan e Denker (2000) utilizaram geldanamicina, um antibiótico natural, para competir com a ligação do ATP no domínio N-terminal. Este antibiótico é considerado um inibidor altamente específico da HSP90. A inibição de HSP90 por este antibiótico ocasionou a supressão no enovelamento de proteínas dependente da HSP90 e direcionou estas proteínas danificadas para um processo de degradação proteolítica mediada pela ubiquitina em células de mamífero (BUSCONI, GUAN E DENKER, 2000).

Recentemente, Samarasinghe e colaboradores (2014) publicaram um estudo mostrando que a inibição de HSP90 pode estar envolvida na indução da autofagia em células cancerígenas, uma vez que, esta proteína inibe o processo de morte celular e coordena a tumorigênese em células cancerígenas (KAPLAN E LI, 2012).

A proteína identificada a partir do *spot 2* (Fig. 31 do resultado) foi a 3- fosfoglicerato quinase (PGK, EC 2.7.2.3). Esta é uma enzima importante envolvida na glicólise, que catalisa um passo importante de fosforilação, conduzindo à produção de ATP através da transferência de um grupo fosfato a partir de 1,3 - bifosfoglicerato e ADP para produzir 3-fosfoglicerato e ATP (DE MORAES BERTUZZI *et al.*, 2009).

O *P. falciparum* depende em grande parte da via glicolítica para o metabolismo energético durante a fase de vida intra-eritrocitária. Consequentemente, Pf3-PGK é um potencial alvo de droga antimalarial (PAL *et al.*, 2004).

3-PGK é considerada uma proteína de “limpeza” (envolvida funcionamento básico de uma célula ou do conjunto de células em um organismo, por fazer parte do metabolismo da glicose – uma das principais vias metabólicas existentes), que é aleatoriamente distribuída no citoplasma da célula. Sua expressão é independente das condições de cultivo de microrganismos, mas é induzida de forma significativa por inanição. Existem dados na literatura da utilização desta proteína como marcador inespecífico de autofagia, em um estudo utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (WELTER, THUMM E KRICK, 2010).

Como no processo de autofagia ocorre o sequestro de porções citoplasmáticas ou organelas inteiras para o autofagossomo (vesícula), a 3-PGK pode se transportada, de forma aleatória, para a degradação na vesícula autofágica. Por conseguinte, o transporte para esta vesícula autofágica e degradação da proteína de fusão de PGK1-GFP pode ser detectado através de microscopia de fluorescência e a liberação de GFP pode ser quantificada no *western blot* (WELTER, THUMM E KRICK, 2010). No caso do *P. falciparum* tratado com

rottlerin, uma possibilidade seria da mesma forma, a Pf3-PGK seria transportada para vesícula autofágica e depois degradada.

Por fim, a proteína identificada a partir do *spot* 3 (Fig. 31 do resultado) foi a lactato desidrogenase de *P. falciparum*. LDH é enzima chave da glicólise anaeróbia, responsável pela reação que catalisa conversão de piruvato em lactato, envolvendo uma concomitante interconversão de NADH em NAD⁺ (OLIVEIRA E FRANÇA, 2011).

Estruturalmente, a LDH possui dois domínios: o maior deles compreende um motivo estrutural característico de proteínas que se ligam a nucleotídeos, denominado *Rossmann fold* (resíduos 20-162 e 248-266). Esse motivo estrutural é referente ao sítio de ligação do cofator NADH (BELLAMACINA, 1996; OLIVEIRA E FRANÇA, 2011). O outro domínio envolve o sítio de ligação do substrato (READ *et al.*, 2001).

Durante o seu ciclo assexuado intra-eritrocitário, a produção de ATP pela glicólise anaeróbica é a principal forma de produção de energia do parasito, e, por conseguinte, a inibição da atividade da PflDH ocasiona a morte do parasito (OLIVEIRA E FRANÇA, 2011). Por este motivo, especificamente, a LDH de *P. falciparum* (PflDH) tem sido alvo de estudo para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas, já que existem importantes diferenças entre a PflDH e a HssLDH (humana) (BROWN *et al.*, 2004; PALPENNA-COUTINHO *et al.*, 2011).

Esta pode ser uma explicação para o fato desta proteína não estar presente na condição de tratamento com a rottlerin, interferindo no metabolismo celular, uma vez que o parasito está em um processo de morte, podendo ser um dos mecanismos de ação desta molécula no processo de morte celular do parasito. Por fim recentemente foi mostrado que a função da LDH pode ser modificada, diferencialmente entre os estados aeróbio e anóxico, através de mecanismo de modificações pós-traducionais, como acetilação e fosforilação. Por consequência, LDH interage com proteína quinase (Xiong e Storey, 2012).

A LDH das diferentes espécies causadoras da malária, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* possuem 90 a 92% de identidade com a LDH de *P. falciparum* (PflDH), sendo que os resíduos catalíticos são idênticos (BROWN *et al.*, 2004).

Um característica interessante da PflDH, que a diferencia da maior parte das LDH de outros organismos (por exemplo, a LDH humana) é que o excesso de substrato (piruvato) ou complexo piruvato-NAD⁺ não inibe a atividade enzimática desta proteína, provavelmente em função do deslocamento de 1,2 Å na posição do cofator em relação as LDHs de diferentes mamíferos. Essa característica da PflDH é função de uma adaptação do parasita para sobreviver nas condições anaeróbicas predominantes nos eritrócitos (READ *et al.*, 1999).

Estas identificações a partir das análises proteômicas comparativas preliminares são alentadoras. Mas, como esta abordagem baseada em gel 2D apresenta limitações de detecção, seria necessária uma abordagem proteômica que permita uma análise comparativa e quantitativa de maior eficiência para identificar com maior sensibilidade estas diferenças na expressão de proteínas.

Neste intuito, uma abordagem proteômica baseado em *gel free*, denominada de *bottom-up* ou *shotgun*, seria uma boa escolha. Outra vantagem desta técnica é a possibilidade de analisar o fosfoproteoma, sendo de muita importância neste caso, uma vez que a rottlerin, por ser um inibidor de quinase, pode estar envolvida na modulação dos eventos de fosforilação e/ou desfosforilação de proteínas (BANTSCHIEFF *et al.*, 2007; BANTSCHIEFF *et al.*, 2012).

Nesta abordagem, as amostras biológicas são inicialmente digeridas por enzimas específicas, como a tripsina (mais utilizada), formando peptídeos, que serão separados por cromatografia líquida de fase reversa e gradualmente eluídos, ionizados e fragmentados via espectrometria de massas/ espectrometria de massas (MS/MS). A informação combinada das massas dos fragmentos e dos íons precursores facilita a identificação dos peptídeos e, com isso, das proteínas usando a busca em banco de dados (WU E MACCOSS, 2002).

A espectrometria de massas tem se tornado uma abordagem cada vez mais sofisticada para a análise e identificação de proteínas de identidade desconhecidas em amostras biológicas, principalmente nesta era pós-genômica, pois os avanços na genômica têm fornecido subsídio de sequências proteicas que são disponibilizadas em bancos de dados, fundamentais para os algoritmos de identificação de proteínas usados na proteômica (KALLI *et al.*, 2013).

Como a espectrometria de massas não é, por si só, uma técnica quantitativa, já que as intensidades de íons observadas são dependentes de vários parâmetros, tais como a eficiência de desorção e ionização e o desempenho da cromatografia líquida, por exemplo, alguns procedimentos foram desenvolvidos para permitir a quantificação relativa de peptídeos em amostras diferentes. Desta forma, o emprego de marcação química com isótopos estáveis é, atualmente, a técnica mais utilizada com este objetivo (BANTSCHIEFF *et al.*, 2007).

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este trabalho permitiu a implementação do teste de atividade antiplasmodial baseado em fluorescência utilizando um intercalante de DNA, SYBR Green I. Assim, foram testadas subfrações de extrato da planta do Cerrado *Qualea grandiflora* e identificou-se um IC₅₀ contra *P. falciparum* moderado para 3 das 10 subfrações, sem citotoxicidade e atividade hemolítica aparentes.

Ademais, a implementação desta metodologia poderá permitir a avaliação de atividade antiplasmodial de diversas outras de moléculas e/ou compostos, uma vez que o grupo de pesquisa em malária molecular implementado no Departamento de Biologia Celular da UnB tem como objetivo a caracterização de alvos de drogas e a descoberta de moléculas com atividade antimalárica a partir de produtos naturais da biodiversidade brasileira. Podemos esperar que a investigação de plantas do Cerrado irá contribuir para a conservação deste bioma, que é considerado uma das regiões mais ameaçadas da Terra.

A rottlerin foi uma ferramenta de escolha para abordar os mecanismos moleculares que controlam a morfogênese dos merozoítos e pode ser importante para a descrição do processo de autofagia. Com os resultados obtidos até agora com a utilização desta molécula, a principal hipótese da ação deste inibidor de proteína quinase em *P. falciparum* é a indução da autofagia, cujo efeito biológico observado por citometria de fluxo foi a inibição da diferenciação dos merozoítos deste parasito, que ocorre nas últimas horas do ciclo intra-eritrocitário. A análise proteômica comparativa preliminar permitiu a identificação de 3 proteínas superexpressas em esquizontes não tratado pela rottlerin, que pertencem a classe de proteínas quinase ou são alvo de fosforilação por proteína quinase. Estas proteínas, proteína de choque térmico 90 (PfHSP90) com uma região histidina quinase, 3-fosfoglicerato quinase (Pf3-PGK) e a lactato desidrogenase (PfLDH), são descritas como potenciais alvos de drogas antimaláricas. Ademais o desaparecimento delas pode estar relacionado a autofagia.

Apesar da existência de publicações recentes sobre o processo de autofagia em *P. falciparum*, ainda não se sabe muito sobre as proteínas envolvidas neste processo no parasito, bem como a sua função (GRIVICICH, REGNER E ROCHA, 2007; BRENNAND *et al.*, 2011; TOMLINS *et al.*, 2013; CERVANTES *et al.*, 2014). Por este motivo, dá-se a importância de estudos proteômicos da autofagia.

Desta forma, no intuito de comprovar a indução da autofagia em esquizontes de *P. falciparum* pela rottlerin, ao entender melhor os efeitos desta droga sobre o parasito, e assim, estudar a biologia da merogonia eritrocitária e identificar os alvos desta droga, como perspectivas podemos citar:

- Determinar se o efeito celular da rottlerin sobre a merogonia eritrocitária é a morte celular do tipo autofagia por citometria de fluxo utilizando anticorpos comerciais dirigidos contra marcadores codificados por genes da família de autofagia (atg).

- Confirmar e ampliar as identificações das proteínas moduladas pela rottlerin por uma abordagem qualitativa mais sensível e abrangente baseado em *gel free* e quantitativa mais robusta por marcação isotópica. Além disso, esta metodologia, por uma etapa de enriquecimento de fosfopeptídeos, permitirá observar a modulação da fosforilação devido o tratamento pela rottlerin que é descrita como um inibidor de proteínas quinase C.

- Realizar uma análise funcional de candidatos cuja expressão é modulada pela rottlerin através do estudo da expressão proteica e citolocalização com anticorpos específicos, o estudo das parceiras destes candidatos por técnicas de interatoma: identificação de complexos proteicos por gel em condição não desnaturante *Blue Native PAGE*, ou *crosslinking in vivo*, seguido de espectrometria de massas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-OLAYAN, E. M.; WILLIAMS, G. T.; HURD, H. Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 9, p. 1133-43, Aug 2002. ISSN 0020-7519.

ALVES, T. M. D. A. *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000. ISSN 0074-0276.

AMEISEN, J. C. [The origin of programmed cell death in the flow of evolution and its role in host-pathogen interactions]. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 192, n. 6, p. 1095-8, 1998. ISSN 0037-9026.

ANDERSON, N. L. *et al.* A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies. **Electrophoresis**, v. 12, n. 11, p. 907-913, 1991. ISSN 1522-2683.

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.

AYRES, M. C. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de Copernicia prunifera. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 90-97, 2008.

BAGAVAN, A. *et al.* In vitro antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Res**, v. 108, n. 1, p. 15-22, Jan 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.

BANIECKI, M. L.; WIRTH, D. F.; CLARDY, J. High-throughput *Plasmodium falciparum* growth assay for malaria drug discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 716-723, 2007. ISSN 0066-4804.

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.

BANNISTER, L. H.; MITCHELL, G. H. The malaria merozoite, forty years on. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1435-44, Oct 2009. ISSN 1469-8161.

BANTSCHIEFF, M. *et al.* Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. **Anal Bioanal Chem**, v. 404, n. 4, p. 939-65, Sep 2012. ISSN 1618-2650.

_____. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, n. 4, p. 1017-31, Oct 2007. ISSN 1618-2642.

BASCO, L. K. *et al.* *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: lactate dehydrogenase activity and its application for in vitro drug susceptibility assay. **Exp Parasitol**, v. 80, n. 2, p. 260-71, Mar 1995. ISSN 0014-4894.

BATISTA, R.; DE JESUS SILVA JÚNIOR, A.; DE OLIVEIRA, A. B. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. **Molecules**, v. 14, n. 8, p. 3037-3072, 2009.

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.

BELLAMACINA, C. The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 11, p. 1257-1269, 1996. ISSN 0892-6638.

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.; ORGANIZATION, W. H. **Drug Resistance in Malaria**. World Health Organization Geneva, 2001.

BONNEFOY, S. *et al.* Molecular characterization of the heat shock protein 90 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 67, n. 1, p. 157-70, Sep 1994. ISSN 0166-6851.

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

_____. **Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde**. 2008a

_____. **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. 2008b.

_____. **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.

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.

BRESCIA, P.; BANKS, P. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. BioTek Instruments. **Inc. USA**, p. 1-3, 2009.

BRIOLANT, S. *et al.* *Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment. **Malar J**, v. 9, p. 141, 2010. ISSN 1475-2875.

BROWN, W. M. *et al.* Comparative structural analysis and kinetic properties of lactate dehydrogenases from the four species of human malarial parasites. **Biochemistry**, v. 43, n. 20, p. 6219-6229, 2004. ISSN 0006-2960.

BUSCONI, L.; GUAN, J.; DENKER, B. M. Degradation of heterotrimeric Gαo subunits via the proteasome pathway is induced by the hsp90-specific compound geldanamycin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1565-1569, 2000. ISSN 0021-9258.

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.

CHAGAS, E. C. D. S. *et al.* Impact of malaria during pregnancy in the Amazon region. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n. 3, p. 203-208, 2009. ISSN 1020-4989.

CHARNEAU, S. O. **Abordagens moleculares dos mecanismos envolvidos ao final da esquizogonia intraeritrocitária de *Plasmodium falciparum* (agente da Malária) por Hibridação substrativa supressiva e DNA micro-array.** 2005. (Doutorado). Biologia Molecular e Celular dos Protozoários, Museu Nacional de História Natural de Paris

CHULAY, J. D.; HAYNES, J. D.; DIGGS, C. L. *Plasmodium falciparum*: Assessment of *in vitro* growth by [³H] hypoxanthine incorporation. **Experimental Parasitology**, v. 55, n. 1, p. 138-146, 1983. ISSN 0014-4894.

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.

CORBETT, Y. *et al.* A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 2, p. 119-24, Feb 2004. ISSN 0002-9637.

COSTA, E. S. *et al.* Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytother Res**, v. 22, n. 5, p. 705-7, May 2008. ISSN 1099-1573.

CRANE, G. Anemia da esplenomegalia malárica hiperreativa. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 25, n. 1, p. 1-5, 1992. ISSN 0037-8682.

DA SILVA JÚNIOR, M. C.; DOS SANTOS, G. C. **100 árvores do cerrado: guia de campo.** Redede Sementes do Cerrado, 2005. ISBN 8572381589.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004. ISSN 0092-8674.

DE MESQUITA, M. L. *et al.* New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. **Bioorg Med Chem**, v. 13, n. 14, p. 4499-506, Jul 15 2005. ISSN 0968-0896.

DE MORAES BERTUZZI, R. C. *et al.* Metabolismo do lactato: uma revisão sobre a bioenergética ea fadiga muscular. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 2, p. 226-234, 2009.

DE MOURA, C. O.; DO NASCIMENTO, G. P. V.; GAROFALO, C. R. Atividade Antibacteriana de *Qualea grandiflora* Mart.(VOCHYSIACEAE). **Rev de Biologia e Farmácia**, v. 08, n.02, p. 34-42, 2012. ISSN 1983-4209.

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.

DOSREIS, G. A.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. **Adv Parasitol**, v. 49, p. 133-61, 2001. ISSN 0065-308X.

DRUILHE, P. *et al.* A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Med Hyg**, v. 64, n. 5-6, p. 233-41, 2001 May-Jun 2001. ISSN 0002-9637.

ELABBADI, N.; ANCELIN, M. L.; VIAL, H. J. Use of radioactive ethanolamine incorporation into phospholipids to assess in vitro antimalarial activity by the semiautomated microdilution technique. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 1, p. 50-5, Jan 1992. ISSN 0066-4804.

EMBRAPA. **Cerrado: Ecologia e Flora**. 1. 2008.

ESPINDOLA-DARVENNE, L. S. Cerrado: fonte de descoberta de novos medicamentos; The Cerrado: source of discovery of new medicines. **Brasília Méd**, v. 44, n. 3, p. 193-198, 2007. ISSN 0524-2053.

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.

GLASS, D.; POLVERE, R.; VAN DER PLOEG, L. Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 12, p. 4657-4666, 1986. ISSN 0270-7306.

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.

GRIMBERG, B. T. *et al.* Monitoring *Plasmodium falciparum* growth and development by UV flow cytometry using an optimized Hoechst-thiazole orange staining strategy. **Cytometry A**, v. 73, n. 6, p. 546-54, Jun 2008. ISSN 1552-4930.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, n. 3, p. 335-43, 2007.

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.

GUHA, M. *et al.* Overexpression, purification and localization of apoptosis related protein from *Plasmodium falciparum*. **Protein Expression and Purification**, v. 52, n. 2, p. 363-372, 2007. ISSN 1046-5928.

HASTINGS, I. M.; PAGET-MCNICOL, S.; SAUL, A. Can mutation and selection explain virulence in human *P. falciparum* infections? **Malar J**, v. 3, p. 2, Mar 2004. ISSN 1475-2875.

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.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000. ISSN 0028-0836.

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.

HOPKINS, H. *et al.* Comparison of HRP2- and pLDH-based rapid diagnostic tests for malaria with longitudinal follow-up in Kampala, Uganda. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 6, p. 1092-7, Jun 2007. ISSN 0002-9637.

HOWARD, R. J.; BATTYE, F. L.; MITCHELL, G. F. *Plasmodium*-infected blood cells analyzed and sorted by flow fluorimetry with the deoxyribonucleic acid binding dye 33258 Hoechst. **J Histochem Cytochem**, v. 27, n. 4, p. 803-13, Apr 1979. ISSN 0022-1554.

INFECCIOSAS, D. Parasitárias: Guia de Bolso. **Volume II, 3ª edição**, 2008.

IZUMIYAMA, S. *et al.* *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. **Exp Parasitol**, v. 121, n. 2, p. 144-50, Feb 2009. ISSN 1090-2449.

JOHNSON, J. D. *et al.* Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1926-1933, 2007. ISSN 0066-4804.

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.

KALLI, A. *et al.* Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. **J Proteome Res**, v. 12, n. 7, p. 3071-86, Jul 2013. ISSN 1535-3907.

KAPLAN, K. B.; LI, R. A prescription for 'stress'—the role of Hsp90 in genome stability and cellular adaptation. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 11, p. 576-583, 2012. ISSN 0962-8924.

KARL, S. *et al.* A comparative study of a flow-cytometry-based assessment of in vitro *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **Malar J**, v. 8, p. 294, 2009. ISSN 1475-2875.

KAUSHANSKY, A. *et al.* Development of a quantitative flow cytometry-based assay to assess infection by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **Mol Biochem Parasitol**, v. 183, n. 1, p. 100-3, May 2012. ISSN 1872-9428.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920.

KUMAR, R.; MUSIYENKO, A.; BARIK, S. The heat shock protein 90 of *Plasmodium falciparum* and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin. **Malar J**, v. 2, p. 30, Sep 2003. ISSN 1475-2875.

KUSS, C. *et al.* Quantitative proteomics reveals new insights into erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, n. 2, p. M111.010645, Feb 2012. ISSN 1535-9484.

LACERDA, M. V. G. D.; OLIVEIRA, S. L. D.; ALECRIM, M. D. G. C. Splenic hematoma in a patient with *Plasmodium vivax* malaria. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 96-97, 2007. ISSN 0037-8682.

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.

LANGRETH, S. G. *et al.* Fine Structure of Human Malaria In Vitro*†. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 443-452, 1978. ISSN 1550-7408.

LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 13, p. 4414-4417, 1985. ISSN 0027-8424.

LE CHAT, L.; SINDEN, R. E.; DESSENS, J. T. The role of metacaspase 1 in *Plasmodium berghei* development and apoptosis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 153, n. 1, p. 41-7, May 2007. ISSN 0166-6851.

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.

LEE, M. G.-S. The 3' untranslated region of the hsp 70 genes maintains the level of steady state mRNA in *Trypanosoma brucei* upon heat shock. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 17, p. 4025-4033, 1998. ISSN 0305-1048.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, n. 1, p. 631-677, 1988. ISSN 0066-4197.

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.

MAIOLI, E. *et al.* 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.

MALLERET, B. *et al.* A rapid and robust tri-color flow cytometry assay for monitoring malaria parasite development. **Sci Rep**, v. 1, p. 118, 2011. ISSN 2045-2322.

MARSDEN, P. D. Chronic malaria and Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 193-196, 1990. ISSN 0037-8682.

MESLIN, B. *et al.* Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. **J Infect Dis**, v. 195, n. 12, p. 1852-9, Jun 2007. ISSN 0022-1899.

MILLER, I.; CRAWFORD, J.; GIANAZZA, E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5385-5408, 2006. ISSN 1615-9861.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. ISSN 0022-1759.

MUTAI, B. K.; WAITUMBI, J. N. Apoptosis stalks *Plasmodium falciparum* maintained in continuous culture condition. **Malar J**, v. 9 Suppl 3, p. S6, 2010. ISSN 1475-2875.

MÜLLER, O. Malaria in Africa. **Challenges for Control and Elimination in the 21st Century**. Frankfurt: Peter Lang, 2011.

NADEAU, K.; DAS, A.; WALSH, C. T. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 2, p. 1479-1487, 1993. ISSN 0021-9258.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 12^a. 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.

NOEDL, H. *et al.* A histidine-rich protein 2-based malaria drug sensitivity assay for field use. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 6, p. 711-4, Dec 2004. ISSN 0002-9637.

_____. Malaria drug-susceptibility testing. HRP2-based assays: current data, future perspectives. **Wien Klin Wochenschr**, v. 115 Suppl 3, p. 23-7, 2003. ISSN 0043-5325.

NOGUEIRA, F.; DO ROSÁRIO, V. E. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Patologia**, v. 4, n. 5, p. 6,

_____. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Patologia**, v. 4, n. 5, p. 6, 2010.

NYAKERIGA, A. M. *et al.* Drug-induced death of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* occurs without typical signs of apoptosis. **Microbes Infect**, v. 8, n. 6, p. 1560-8, May 2006. ISSN 1286-4579.

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.

OLIVEIRA, A. A.; FRANÇA, T. C. C. Lactato desidrogenase como alvo molecular para quimioterapia antimalarial. **Ciência e Tecnologia**, p. 24, 2011.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malar J**, v. 9, p. 115, 2010. ISSN 1475-2875.

Orwa C, Mutua A , Kindt R , Jamnadass R, Simons A. 2009. Agroforestry Database:a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>).

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.

PAGET-MCNICOL, S.; SAUL, A. Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, v. 122, n. Pt 5, p. 497-505, May 2001. ISSN 0031-1820.

PAL, B. *et al.* Biochemical characterization and crystallization of recombinant 3-phosphoglycerate kinase of *Plasmodium falciparum*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1699, n. 1-2, p. 277-80, Jun 2004. ISSN 0006-3002.

PAOLINI, G. V. *et al.* Global mapping of pharmacological space. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 7, p. 805-15, Jul 2006. ISSN 1087-0156.

PAYNE, D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 66, n. 5, p. 621, 1988.

PENNA-COUTINHO, J. *et al.* Antimalarial activity of potential inhibitors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase enzyme selected by docking studies. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21237, 2011. ISSN 1932-6203.

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.

PHILIPP, S. *et al.* Isolation of erythrocytes infected with viable early stages of *Plasmodium falciparum* by flow cytometry. **Cytometry A**, v. 81, n. 12, p. 1048-54, Dec 2012. ISSN 1552-4930.

PICOT, S. *et al.* Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 91, n. 5, p. 590-1, 1997 Sep-Oct 1997. ISSN 0035-9203.

PRATT-RICCIO, L. R. *et al.* Use of a colorimetric (DELI) test for the evaluation of chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* to commonly used anti-plasmodial drugs in the Brazilian Amazon. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 281, 2013. ISSN 1475-2875.

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.

QUASHIE, N. B.; DE KONING, H. P.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. An improved and highly sensitive microfluorimetric method for assessing susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in vitro. **Malar J**, v. 5, p. 95, 2006. ISSN 1475-2875.

RAJ, D. K. *et al.* Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. **J Biol Chem**, v. 284, n. 12, p. 7687-96, Mar 2009. ISSN 0021-9258.

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.

READ, J. *et al.* Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 43, n. 2, p. 175-185, 2001. ISSN 1097-0134.

READ, J. A. *et al.* Chloroquine Binds in the Cofactor Binding Site of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10213-10218, 1999. ISSN 0021-9258.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3ª. 2011. ISBN 9788527715805.

ROBERT, A. *et al.* From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1173-1188, 2001. ISSN 0033-4545.

RODRIGUES, R. M. F. M. **Antracit: análise e transmissão de dados em citometria de fluxo**. 2012. (Mestrado). Engenharia Eletrotécnica e de Computadores, , Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 680-5, Feb 2002. ISSN 0028-0836.

SAMARASINGHE, B. *et al.* Heat shock factor 1 confers resistance to Hsp90 inhibitors through p62/SQSTM1 expression and promotion of autophagic flux. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 3, p. 445-55, Feb 2014. ISSN 1873-2968.

SANCHEZ, B. A. M. **Plasmódios transfectados com a proteína de fluorescência verde (GFP) para ensaios de quimioterapia experimental**. 2007. Centro de Pesquisas René Rachou

SAWYER, T. K. Smart drug discovery leveraging innovative technologies and predictive knowledge. **Nat Chem Biol**, v. 2, n. 12, p. 646-8, Dec 2006. ISSN 1552-4450.

SHEVCHENKO, A. *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996. ISSN 0003-2700.

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.

SILVA, N. M. *et al.* Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during in vivo conversion of bradyzoites to tachyzoites. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3959-3963, 1998. ISSN 0019-9567.

SINAI, A. P.; ROEPE, P. D. Autophagy in Apicomplexa: a life sustaining death mechanism? **Trends Parasitol**, v. 28, n. 9, p. 358-64, Sep 2012. ISSN 1471-5007.

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.

SMIT, S. *et al.* Proteomic profiling of *Plasmodium falciparum* through improved, semiquantitative two-dimensional gel electrophoresis. **J Proteome Res**, v. 9, n. 5, p. 2170-81, May 2010. ISSN 1535-3907.

THERON, M. *et al.* An adaptable two-color flow cytometric assay to quantitate the invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* parasites. **Cytometry A**, v. 77, n. 11, p. 1067-74, Nov 2010. ISSN 1552-4930.

TOMLINS, A. M. *et al.* *Plasmodium falciparum* ATG8 implicated in both autophagy and apicoplast formation. **Autophagy**, v. 9, n. 10, Aug 2013. ISSN 1554-8635.

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.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-5, Aug 1976. ISSN 0036-8075.

VAN DER PLOEG, L.; GIANNINI, S. H.; CANTOR, C. R. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. **Science**, v. 228, n. 4706, p. 1443-1446, 1985. ISSN 0036-8075.

WANI, M. C. *et al.* Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971. ISSN 0002-7863.

WELTER, E.; THUMM, M.; KRICK, R. Quantification of nonselective bulk autophagy in *S. cerevisiae* using Pgk1-GFP. **Autophagy (Internet-Ausgabe)**, v. 6, n. 6, p. 794-7, 2010.

WERNSDORFER, W.-H.; KOUZNETSOV, R. Drug-resistant malaria--occurrence, control, and surveillance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 3, p. 341, 1980.

WESTERMEIER, R.; MAROUGA, R. Protein detection methods in proteomics research. **Bioscience Reports**, v. 25, p. 19-32, 2005.

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.

WHO. **World malaria report: 2013**. World Health Organization, 2013. ISBN 9241564695.

WICHMANN, O. *et al.* Screening for mutations related to atovaquone/proguanil resistance in treatment failures and other imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. **J Infect Dis**, v. 190, n. 9, p. 1541-6, Nov 2004. ISSN 0022-1899.

WONGSRICHANALAI, C. *et al.* Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 4, p. 209-18, Apr 2002. ISSN 1473-3099.

WU, C. C.; MACCOSS, M. J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Curr Opin Mol Ther**, v. 4, n. 3, p. 242-50, Jun 2002. ISSN 1464-8431.

XIONG, Z. J.; STOREY, K. B. Regulation of liver lactate dehydrogenase by reversible phosphorylation in response to anoxia in a freshwater turtle. **Comparative Biochemistry and**

Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 163, n. 2, p. 221-228, 2012. ISSN 1096-4959.

ZHANG, X.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P. On-target sample preparation of 4-sulfophenyl isothiocyanate-derivatized peptides using AnchorChip Targets. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. 3, p. 346-359, 2008. ISSN 1096-9888.

ZIPPER, H. *et al.* Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 12, p. e103, 2004. ISSN 1362-4962.