



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Thiago Albuquerque Souza Campos

**Análise computacional da estrutura das
dinaminas de *Plasmodium falciparum* e
priorização de potenciais inibidores**

Brasília

2022



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Thiago Albuquerque Souza Campos

Análise computacional da estrutura das dinaminas de *Plasmodium falciparum* e priorização de potenciais inibidores

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília - Instituto de Biologia, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular

Orientador: Sébastien Olivier Charneau

Coorientadora: Izabela Marques Dourado Bastos

Brasília

2022

**Análise computacional da estrutura das dinaminas de
Plasmodium falciparum e priorização de potenciais inibidores**

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Sébastien Olivier Charneau

Membro 1: Bruno Junior Neves

Membro 2: Carla Nunes de Araújo

Suplente: Melina Mottin

Local: Plataforma Teams

Data: 18 de novembro de 2022

Horário: 8h15

**Dedico esse trabalho a minha
família e a todos os cientistas que
ainda desejam e tem esperança
no futuro científico do Brasil.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer nessa parte às pessoas que de uma forma ou de outra ajudaram a tornar a experiência do mestrado em algo muito melhor do que seria e que sem elas não sei dizer se o mestrado seria possível.

Primeiramente eu agradeço imensamente ao meu orientador, **Sébastien Charneau**, que me deu a oportunidade de trabalhar com seu incrível grupo de pesquisa e que sempre me auxiliou quando eu mais precisei, muito obrigado por me ajudar em todo o processo do meu mestrado mesmo quando tivemos que mudar todo ele por conta da pandemia, eu fico muito feliz de ter lhe tido como orientador e conto com você no meu futuro doutorado. E claro, agradeço a minha coorientadora **Izabela Bastos**, que foi uma das principais responsáveis em sugerir o novo tema quando tive que mudar o projeto e me apresentou tantas pessoas ótimas que me ajudaram no trabalho, além de também ter sido uma ótima professora que me ensinou muito durante todo esse mestrado.

Agradeço muito a **Melina Mottin** que me auxiliou durante todo o projeto e foi uma das principais responsáveis pela elaboração desse projeto, seu conhecimento sobre o assunto foi vital para a realização desse projeto e suas aulas foram extremamente importantes para meu aprendizado. Outra pessoa extremamente vital para o projeto foi a aluna de PIBIC **Vanessa Bernardino**, que trabalhou comigo durante todo o projeto e me auxiliou principalmente na parte da PfDYN2, você foi uma ótima companhia e tornou esse projeto muito mais fácil de se lidar. Fico muito feliz e grato por ter conhecido as duas e espero realizar outros grandes trabalhos com vocês.

Agradeço ao grupo de pesquisa Malária Molecular por todo o auxílio e amizade, principalmente durante o período pré pandemia: **Lucas, Farah, Anna, José Miguel, Renan e Carlos**. além dos que já fizeram parte do grupo e que foram igualmente importantes: **Samuel Mandacaru, Marcos Alborghetti, Renata, Lorena e Jhordan**. Um agradecimento especial ao **Samuel Mandacaru** que me introduziu a esse incrível grupo e foi uma das pessoas que me incentivaram a seguir o caminho da ciência desde o meu primeiro PIBIC.

Agradeço a todos os professores do LBQP que sempre foram muito solícitos e amigos de todos os estudantes que passaram pelo laboratório. Em especial gostaria de agradecer ao **Carlos André Ricart e ao Marcelo de Sousa**, que me deram aula de Bioquímica na graduação e desde lá me fizeram adorar a área que eu escolhi me especializar, e a **Consuelo de Lima** que sempre foi uma pessoa incrível e extremamente amiga no LBQP, sempre se preocupando com o bem-estar dos alunos.

Agradeço a todos os alunos e funcionários do LBQP que sempre foram muito amigáveis, companheiros e sempre dispostos a ajudar todos que precisam

Agradeço aos membros da banca examinadora pela sua participação da defesa da dissertação e suas colaborações com o trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília pela oportunidade de realização do mestrado.

Agradeço às agências de fomento, sem às quais, não seria possível a realização da pesquisa. Esse trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que me concederam bolsas de estudos e o apoio financeiro para realização dos estudos, e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), que também forneceu verbas para o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço muito ao apoio de toda minha família, em especial meus pais, **Gisele e Valmir**, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim mesmo nos momentos mais difíceis, me dando todo o apoio que eu precisava para fazer o mestrado com calma. Agradeço muito também ao apoio da minha irmã, **Thiane**, que mesmo tendo um intercâmbio no meio do meu projeto continuou sempre se preocupando com meu trabalho e principalmente com minha saúde mental, com certeza você foi uma incrível psicóloga pessoal para mim quando eu estava muito relutante em procurar ajuda. Obrigado a todos vocês pelo apoio e fico feliz que eu possa parar de atrapalhar os planos de viagem já que estava extremamente enrolado, amo vocês.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram presentes nesses anos e que me ajudaram a tornar esse mestrado uma experiência mais leve e tolerável, graças a todos eles eu consegui me distrair e me divertir mesmo nos momentos mais estressantes.

Agradeço e muito a minha namorada **Lara Lage**, que esteve presente comigo nos momentos mais difíceis do mestrado e me deu um importantíssimo apoio emocional, além de sempre confiar no meu potencial e sempre me fazer acreditar em mim mesmo.

RESUMO

A malária é uma doença endêmica de regiões tropicais e subtropicais e é causada por um protozoário do gênero *Plasmodium spp.* Devido à ausência de uma vacina eficaz, o tratamento por quimioterápicos continua sendo a mais eficiente forma de enfrentar a doença, porém o advento de resistências a esses medicamentos ocasionou uma redução de sua eficácia. O ciclo eritrocitário, que leva a produção das formas infectivas, os merozoítos, é responsável pela sintomatologia da doença. A morfogênese do merozoíto é complexa e exige um tráfego intracelular preciso e intenso e leva a formação de organelas peculiares. Falhas nesses processos celulares podem ocasionar a morte celular. Os membros da família de proteínas dinaminas são conhecidos por estar envolvidos nesses processos e, portanto, podem ser os responsáveis por essa regulação mecanoquímica. O *P. falciparum* possui em seu genoma as sequências codantes de três dinaminas, PfDYN1, PfDYN2 e PfDYN3, que foram preditas como participantes desses processos. Tendo em vista a necessidade de novos alvos para fármacos, o trabalho visou a determinação das estruturas dessas dinaminas e a triagem de possíveis inibidores específicos por modelagem molecular. Utilizando servidores para análise *in silico* determinou-se que são caracterizados como *dynamin-like* e que possuem similaridade sequencial com dinaminas de *Toxoplasma gondii*, portanto, devem possuir funções e estruturas similares. Como não há modelos estruturais dessas proteínas, esse trabalho utilizou servidores que utilizam métodos de homologia ou métodos baseados em *machine learning*. Os modelos foram refinados utilizando o programa GalaxyRefine e suas qualidades foram avaliadas pelo programa MolProbity. O programa considerou os modelos 3D obtidos através do servidor AlphaFold e refinados pelo GalaxyRefine como os melhores e mais robustos. A partir das estruturas 3D de PfDYN1 e PfDYN2, servidores de predição de sítios foram utilizados para a predição de seus sítios de interação molecular, sendo os modelos obtidos pelo FTSite os selecionados para os experimentos de *docking* molecular. Foram selecionadas classes de inibidores conhecidos de dinaminas, *dynasore*, *dyngo-4a*, *dynole*, *iminodyn* e *rhododyn* como a base estrutural para a geração da biblioteca de priorização de compostos por meio da similaridade estrutural, baseado no coeficiente de Tanimoto, na biblioteca comercial ChemBridge. Após o *docking*, doze compostos, que apresentaram melhor afinidade ao sítio ativo, foram selecionados como potenciais inibidores das PfDYN1 e PfDYN2. Futuramente, a inibição de crescimento do parasito por curva de dose-resposta *in vitro*, assim como a inibição enzimática, serão testadas. Espera-se encontrar novas ferramentas de estudo do tráfego intracelular e da formação das organelas de *P. falciparum*, além de novos compostos bioativos antimaláricos.

Palavras-chaves: *Plasmodium falciparum*, malária, dinamina, predição de estrutura 3D, *docking* molecular, inibidores SBDD.

ABSTRACT

Malaria is an endemic disease of tropical and subtropical regions and is caused by a protozoan of the genus *Plasmodium* spp. Due to the absence of an effective vaccine, treatment with chemotherapeutic drugs remains the most efficient way to face the disease, but the advent of resistance to these drugs has caused a reduction in their effectiveness. The erythrocytic cycle, which leads to the production of the infective forms, the merozoites, is responsible for the symptomatology of the disease. The morphogenesis of the merozoite is complex and requires a precise and intense intracellular traffic and leads to the formation of peculiar organelles. Failures in these cellular processes can lead to cell death. Members of the dynamin family of proteins are known to be involved in these processes and therefore may be responsible for this mechanochemical regulation. *P. falciparum* has in its genome the sequences encoding three dynamins, PfDYN1, PfDYN2, and PfDYN3, that have been predicted to participate in these processes. In view of the need for new drug targets, this work aimed at determining the structures of these dynamins and screening for possible specific inhibitors by molecular modeling. Using servers for in silico analysis it was determined that they are characterized as dynamin-like and that they have sequence similarity with *Toxoplasma gondii* dynamins, therefore, they must have similar functions and structures. Since there are no structural models of these proteins, this work utilized servers that use homology or machine learning based methods. The models were refined using the GalaxyRefine program and their qualities were evaluated by the MolProbity program. The program considered the 3D models obtained through the AlphaFold server and refined by GalaxyRefine to be the best and most robust. From the 3D structures of PfDYN1 and PfDYN2, binding site prediction servers were used for the prediction of their molecular interaction sites, and the models obtained by FTSite were the ones selected for the molecular docking experiments. Classes of known dynamin inhibitors, dynasore, dyngo-4a, dynole, iminodyn and rhododyn were selected as the structural basis for generating the compound prioritization library by means of structural similarity, based on Tanimoto's coefficient, in the commercial ChemBridge library. After docking, twelve compounds, which showed better affinity to the active site, were selected as potential inhibitors of PfDYN1 and PfDYN2. In the future, parasite growth inhibition by in vitro dose-response curve as well as enzyme inhibition will be tested. It is hoped to find new tools to study the intracellular traffic and organelle formation of *P. falciparum*, as well as new bioactive antimalarial compounds.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, malaria, *dynamin*, 3D prediction, Proteome, molecular *docking*, Inhibitors, SBDD.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS	20
I. Introdução.....	21
1. Malária.....	21
1.1. A doença	21
1.2. Controle vetorial	22
1.3. Agente etiológico.....	23
1.3.1. As espécies associadas à malária em humanos	24
1.3.2. Ciclo de vida	25
1.3.3. Tráfego celular, controle replicativo e famílias das dinaminas.....	28
1.4. Sintomas da Malária	31
1.5. Malária no Brasil	32
2. Ações de controle da malária.....	34
2.1. Enfrentamento antimalárico.....	34
2.2. Fármacos.....	35
2.3. Vacina	39
3. Desenvolvimento de fármacos.....	41
3.1. Desenvolvimento e planejamento de fármacos auxiliado por computação	41
3.1.1. Predição da estrutura tridimensional	42
3.1.2. Docking molecular	43
II. Justificativa	44
III. Objetivo Geral.....	44
1. Objetivos Específicos	44
2. Desenho experimental.....	44
IV. Metodologia	45
1. Obtenção das sequências primárias das dinaminas de <i>Plasmodium falciparum</i>	45
2. Análise <i>in silico</i> das dinaminas	45
3. Predição das estruturas tridimensionais das PfDYNs	46
4. Visualização e Alinhamento 3D das estruturas	47
5. Predição de sítios de ligação a ligantes	48
6. Seleção de inibidores conhecidos de dinaminas.....	49
7. Seleção de compostos por análise de similaridade estrutural.....	49
8. Preparação dos ligantes.....	50
9. Preparação dos <i>grids</i> para <i>docking</i>	50

10.	Preparação das proteínas	50
11.	Priorização de compostos baseada em <i>docking</i> molecular	50
12.	<i>Docking</i> Molecular.....	51
13.	Análise das Interações Moleculares	51
V.	Resultados.....	51
1.	Análise <i>in silico</i> Das Dinamínas.....	51
2.	Predição das Estruturas Tridimensionais das PfDYNs.....	55
3.	Análise Comparativa das Estruturas Tridimensionais Preditas das PfDYN1 e PfDYN2	57
4.	Predição de Sítios Ligação a ligantes das PfDYN1 e PfDYN2	59
5.	Resultados computacionais da priorização de compostos	62
5.1.	Preparação da biblioteca de compostos.....	62
5.2.	Preparação dos compostos e das proteínas PfDYN1 e PfDYN2	63
6.	Cálculos de <i>Docking</i> Molecular	64
7.	Análises das interações intermoleculares.....	64
8.	Características Estruturais dos compostos priorizados	80
VI.	Discussão	84
1.	Análise <i>in silico</i> das DLPs de <i>P. falciparum</i>	84
2.	Estruturas Tridimensionais e análises comparativas.....	86
3.	Predição dos Sítios de ligação	86
4.	Priorização de compostos para PfDYN1 e PfDYN2	87
5.	Análises das interações moleculares	87
6.	Planejamento de fármaco auxiliado por computador (CADD).....	89
VII.	Conclusão.....	90
VIII.	Referências:.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Bidimensional

3D – Tridimensional

Å – Angstrom

AL – Artemether-lumefantrine

ALA – Alanina

AnAON1 – *Anopheles* alanil aminopeptidase 1

ARG – Arginina

AS-AQ – Artesunate-amodiaquine

AS-MQ – Artesunate-mefloquine

ASN – Asparagina

ASP – Acido aspártico

AS-PY – Artesunate-pyronaridine

BCG – beta-D-glucopiranoose

CADD – Planejamento de fármaco auxiliado por computador

CDD – Banco de dados de Domínios Conservados

CQ – Cloroquina

CSP – Circumsporozoíto

CYS – Cisteína

DDT – Organoclorino diclodifeniltricloroetano

DLP – *Dynamín-like protein*

DNM1 – Dinamina 1 (humana)

DRP – *Dynamín-related protein*

Dyn – Dinamina

ER – Retículo Endoplasmático

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

GCP – *Phosphomethylphosphonic acid guanylate ester*

GDP – Guanosina difosfato

GED – Domínio efetor de GTPase

GLN – Glutamina

GLY – Glicina
GNH – Aminophosphonic acid-guanylate ester
GTS – *Gobal technical strategy for malária*
HIS – Histidina
IA – Inteligência artificial
ILE – Isoleucina
LBDD – Planejamento de fármacos baseadas no ligante
LYS – Lisina
MET – Metionina
P&D – Pesquisa e desenvolvimento
PDB – Protein Data Bank
pfcr1 – *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*
PfDYN – *Plasmodium falciparum dynamin*
pfmdr1 – *Plasmodium falciparum multidrug resistance 1 transporter*
PG4 – tetraetileno glicol
PH – *Pleckstrin-homology*
PHE – Fenilalanina
PIACM – Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
pLDDT – *Per-residue confidence score*
PMIF – Fator inibitório de migração do macrófago de *Plasmodium*
PNCM – Plano Nacional de Controle da Malária
PRD – Domínio rico em prolina
PRO – Prolina
R&D – *Research and development*
SAPN – Nanopartículas de proteínas de automontagem
SBDD – Planejamento de fármacos baseado na estrutura
SER – Serina
TgDRP – *Toxoplasma gondii dynamindynamin-related protein*
THR – Treonina
TM-score – *Template modeling score*
TRP – Triptofano

TYR – tirosina

VAL – Valina

VPS1 – *Dynammin-like* de levedura

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição geográfica dos países acometidos pela malária com dados obtidos no período de 2000-2020. Os países em vermelho tiveram ao menos um caso autóctone, em rosa nenhum caso no período de 2018-2020, em laranja nenhum caso no período de 2019-2020, em azul nenhum caso no período de 2019-2020 e os países verdes são os países livres de malária desde 2000. Os países em branco são os países não endêmicos da doença (Modificado de: WHO (2021). World Malaria Report)	22
Figura 2 Distribuição global dos vetores dominantes ou potencialmente importantes de malária (adaptado de Kiszewski et al. 2004)	23
Figura 3 Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i> O mosquito vetor transmite o parasito <i>Plasmodium spp.</i> em seu estágio de esporozoíto para o hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos então invadem os hepatócitos, onde se replicam e dividem em merozoítos. Os hepatócitos infectados se rompem e liberam os merozoítos na corrente sanguínea, onde invadem hemácias para iniciar o estágio assexuado da reprodução, que é o estágio sintomático da doença. No fim do ciclo reprodutivo, o merozoíto rompe a hemácia e é liberado na corrente sanguínea para re-infectar outras hemácias e continuar a replicação ou se diferenciam em gametócitos masculinos ou femininos. Os gametócitos se concentram nos capilares da pele e são ingeridos pelo vetor no momento do repasto sanguíneo. No estômago do mosquito, cada gametócito masculino produzem oito microgametas depois de três mitoses; o gametócito feminino se modifica em macrogametas. Os gametas masculinos e femininos se fundem, formando um zigoto diploide, que se alonga se transformando em um oocineto, que se movimenta através do epitélio do intestino médio atravessando-o para formar um oocisto abaixo da lâmina basal. Os oocistos passam por ciclos de replicação formando esporozoítos, que ao romper a parede do oocisto, entram na hemolinfa e podem invadir as glândulas salivares, para que possam ser transmitidos para um novo hospedeiro humano quando a fêmea do Anopheles realizar um novo repasto sanguíneo. (Retirado de Phillips et al. 2017).....	27
Figura 4 Estrutura cristalizada da dinamina humana 1 (hDMN1). Em evidencia os domínios que compõem a estrutura das dinaminas clássicas, domínio G (amarelo), domínio médio (azul claro), domínio PH (verde), GED (azul escuro) e PRD (cinza). (imagem adaptada de Faelber et al. 2011)	29
Figura 5 Membros da superfamília das dinaminas em animais e plantas. As dinaminas são subdivididas entre “dinaminas clássicas” e “ <i>dynamin-related</i> ”. As dinaminas clássicas (em vinho) são tipificadas pelas dinaminas envolvidas no processo de formação de brotamentos de vesículas revestidas de clatrina na membrana plasmática, sulcos de clivagem, Golgi e endossomos, mas também em formação de brotamentos não mediado por clatrina nas cavéolas e fagossomos. <i>Dynamin-related</i> ” (DLPs) estão geralmente envolvidas em divisão organelar como as mitocôndrias e peroxissomos. As famílias OPA1 (atrofia ótica 1) e a mitofusina também estão envolvidas na reorganização da mitocôndria, mas provavelmente na fusão mitocondrial e, portanto, antagonizam com as DLPs. Os membros da família MX são induzidos por interferons e conferem resistência contra vírus de RNA. As plantas contém várias dinaminas distintas.	

Algumas delas possuem funções similares às dinaminas humanas, mas outras possuem características únicas às plantas, como a formação do platô celular e a divisão do cloroplasto. (Retirado de (Praefcke and McMahon 2004).	30
Figura 6 Fármacos antimaláricos descobertos entre os anos 1820 e 1980. Algumas ainda estão em uso atualmente e outras se tornaram ineficientes devido ao surgimento de cepas resistentes ou devido aos seus efeitos colaterais. Entre parênteses as datas em que foram reportados cepas resistentes a elas pela primeira vez. (Adaptado de Tse, Korsik, and Todd 2019)	37
Figura 7 Novas combinações de fármacos/formulações que foram aprovadas para uso. Nome da marca do medicamento (em negrito no topo da imagem), são listados na figura a empresa parceira (em itálico) e combinação de fármacos (codificado em cores relacionados com a sua estrutura). (Adaptada de Tse, Korsik, and Todd 2019)	38
Figura 8 Surgimento de resistência aos principais antimaláricos. Cada barra colorida representa uma monoterapia ou uma combinação. Os anos à esquerda da barra representam o ano em que o fármaco foi introduzido e o primeiro caso reportado de resistência. Os círculos abaixo da imagem denotam o período aproximado em que as resistências se espalharam para diferentes regiões do planeta. (Adaptado de Ekland and Fidock 2008).....	39
Figura 9 Esquema ilustrativo do desenho experimental.	45
Figura 10 Organização estrutural das dinaminas de <i>Plasmodium falciparum</i> obtida utilizando o servidor Pfam. A: Esquema das estruturas primárias com os domínios identificados; B: O Posicionamento dos domínios identificados nas sequencias de aminoácidos. GED, <i>GTPase effector domain</i>	52
Figura 11 A árvore filogenética agrupando as proteínas que possuem maiores similaridades na estrutura primária, permitindo assim identificar quais proteínas são mais próximas evolutivamente e, portanto, podem exercer funções similares em seus respectivos organismos, como pode ser observado a PfDYN1 é similar a TgDRPB (quadrado amarelo), PfDYN2 é similar a TgDRPA (quadrado verde) e a PfDYN3 é mais similar a DRPC (quadrado azul).....	54
Figura 12 Alinhamento entre dinaminas homólogas. Resultado obtido do alinhamento realizado no BLASTp utilizando o programa COBALT, regiões coloridas em vermelho são regiões mais conservadas e regiões azuis são regiões menos conservadas. As regiões demonstradas como mais conservadas foram as referentes ao domínio N e o domínio médio, sendo o efetor o mais destoante A: Alinhamento de todas as sequências primárias alinhadas pelo BLAST que foram utilizadas para gerar a árvore filogenética. B: Alinhamento das dinaminas de <i>P. falciparum</i> com a <i>dynamin-like</i> humana DNML1 de código <i>PDB</i> 4BEJ (Fröhlich et al. 2013), proteína humana que possui maior grau de similaridade com as proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i>	54
Figura 13 Estrutura tridimensional das dinaminas de <i>Plasmodium falciparum</i> , A: PfDYN1; B: PfDYN2; C: PfDYN3, preditas utilizando o servidor AlphaFold com refinamento do GalaxyRefine. Visualização gerada pelo programa de PyMol. Vermelho: GTPase; Amarelo: Domínio médio; Magenta: GED; Verde: Região de desordem, baixa complexidade ou superhélices.	57
Figura 14 Alinhamento das estruturas tridimensionais preditas e de dinaminas humanas com estruturas previamente descritas por métodos de cristalografia. A:	

Alinhamento dos modelos das três dinaminas presentes no *P. falciparum* mostrando uma discrepância estrutural da dinamina 3; B: Alinhamento dos modelos das dinaminas 1 e 2 de *P. falciparum*; C: Alinhamento entre os modelos das PfDYN1 e 2 com a estrutura da *dynamamin-like* humana 4BEJ (Fröhlich et al. 2013); D: Alinhamento entre os modelos das PfDYN1 e 2 com a estrutura da DNM1L humana (PDB ID: 3W6N (Kishida and Sugio 2013)) mostrando a região (cor ciano) onde se localiza o sítio ativo da HmDNM1L onde ocorre a GTPase. Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2; Azul escuro: PfDYN3; Magenta: *Dynamamin-like* 4BEJ (Fröhlich et al. 2013); Ciano: HmDNM1L 3W6N (Kishida and Sugio 2013). 58

Figura 15 Predições das dinaminas homodimerizadas e o alinhamento entre elas e o homodímero da *dynamamin-like* 4BEJ (Fröhlich et al. 2013), permitindo uma melhor compreensão da interação da dinamina com ela mesma para permitir seu funcionamento no organismo. A: Predição manual utilizando o PyMol por meio do plugin “*Alignment*” e o Chimera por meio do plugin “*MatchMaker*” que permitiu o alinhamento das estruturas preditas das dinaminas com o homodímero da 4BEJ para prever a estrutura homodimerizada das duas dinaminas; B: Alinhamento da estrutura homodimerizada da PfDYN1 e 2 predita pelo programa do Galaxy (GalaxyHOMOMER); C: Estrutura homodimerizada da PfDYN1 predita pelo Galaxy; Estrutura homodimerizada da PfDYN2 predita pelo Galaxy. Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2; Ciano: *dynamamin-like* humana 4BEJ. 59

Figura 16 Posição dos sítios ativos preditos por cada servidor utilizado, as regiões dos sítios foram marcadas utilizando o programa de visualização PyMol e a região colorida representa um dos três (quatro no caso do PockDrug da PfDYN2) sítios preditos com melhor avaliação segundo os programas utilizados. PfDYN1: DoGSite – rosa P4, vermelho P5, azul P1; FTSite – magenta P1, vermelho P2, azul P3; PockDrug – magenta P3, vermelho P15, azul P41; PrankWeb – vermelho P1, azul P2, magenta P3. PfDYN2: DoGSite – vermelho P3, magenta P5, azul P2; FTSite – vermelho P1, azul P2, magenta P3; PockDrug – magenta P3, azul P7, amarelo P4, vermelho P8; PrankWeb – vermelho P1, magenta P2, azul P3. Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2. 60

Figura 17 Posição dos três melhores sítios em geral determinado tanto pelas avaliações dos servidores como por uma análise comparativa entre cada sítio predito no qual as regiões determinadas por mais de um servidor teoricamente indica uma maior possibilidade de haver um sítio naquela região, com isso os três mais prováveis sítios preditos foram: PfDYN1: P15 da PockDrug (azul), P3 da PockDrug (magenta) e P1 da FTSite (vermelho); PfDYN2: P3 da PockDrug (vermelho), P8 da PockDrug (azul), P3 da FTSite (magenta). Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2. 61

Figura 18 Sítio escolhido para a realização dos testes de *docking* molecular, o sítio foi escolhido baseado na similaridade estrutural entre dinaminas de diferentes espécies graças a conservação do sítio da GTPase entre elas e, portanto, é a área mais provável que inibidores de dinamina atuam. A região cinzenta representa essa região do sítio ativo que é conservada evolutivamente e, portanto, o sítio predito que melhor se posicionava dentro dessa região foi selecionado para o teste de *docking*. A: Sobreposição entre a PfDYN1 com os 3 melhores sítios preditos (Figura 17) e a DNM humana 3W6N (Kishida and Sugio

2013) em laranja com seu sítio ativo destacado em laranja (pontilhado); B: O sítio escolhido para realização de testes de *docking* molecular (P1 da FTSite); C: Sobreposição entre a PfDYN2 com os 3 melhores sítios preditos (Figura 17) e a DNM humana 3W6N (Kishida and Sugio 2013) em laranja com seu sítio ativo destacado em laranja (pontilhado); D: O sítio escolhido para realização de testes de *docking* molecular (P3 da FTSite). Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2..... 62

Figura 19 Representação da estrutura 2D das moléculas inibidoras comerciais selecionadas para serem as bases das pesquisas por moléculas similares. A região marcada em azul representa região central de cada uma dessas moléculas e que determina o grupo ao qual ela pertence. A: *Dynasore*, em azul o grupo formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida; B: *Dynngo-4a*, em azul o grupo formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida; C: *Dynole* (a esquerda), em azul o grupo indole, a direita uma representação das regiões que as compõem e que podem ser modificadas para produzir uma substancia derivada; D: *Rhododyn* (a esquerda), em azul o grupo 4-metilideno-1,3-tiazolidina-2-tiona, a direita uma representação das regiões que as compõem e que podem ser modificadas para produzir uma substancia derivada; E: *Iminodyn*, em azul o grupo N-(3-acetamidopropil)acetamida..... 63

Figura 20 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro , das moléculas similares a *dynasore* 5318676 selecionadas após cálculos de *docking* e as interações que elas realizam com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 68

Figura 21 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, das moléculas similares a *Dynasore* 5321707 selecionadas após cálculos de *docking* e as interações que elas realizam com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 69

Figura 22 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, das moléculas similares a *dyngo-4a* 5367002 selecionadas após cálculos de *docking* e as interações que elas realizam com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 70

Figura 23 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *dyngo-4a* 8806659, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 71

Figura 24 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Dynole* 6009726, selecionada após cálculo de

docking, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. Os aminoácidos LYS 212 da PfDYN1 e GLN 35 da PfDYN2 não estão visíveis pois na visão 2D eles ficaram sobrepostos pela ILE 248 e SER 36 respectivamente.

..... 72

Figura 25 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Dynole* 8880132, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 73

Figura 26 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Iminodyn* 5103008, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 74

Figura 27 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Iminodyn* 5103018, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 75

Figura 28 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Rhododyn* 5668109, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 76

Figura 29 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Rhododyn* 6873032, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 77

Figura 30 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Rhododyn* 7181860, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 78

Figura 31 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Rhododyn* 7377558, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações

hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada. 79

Figura 32 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *dynamin* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, A região em azul contém a formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida, a região não marcada é um anel fenil com duas hidroxilas (também uma característica que aumenta sua potência). A esquerda, no círculo vermelho, no 5318676 possui um grupo fenil e no 5321707 possui um bifenil, ambos no lugar do naftaleno presente na *dynasore*. 80

Figura 33 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *dyngo-4a* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, A região em azul contém a formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida, a região não marcada é um naftaleno. A direita, no círculo vermelho, no 5367002 uma das hidroxilas (o grupo OH ligado ao benzeno) foi substituída por cloro, além de uma mudança na distribuição desses compostos no benzeno, já no 8806659, as hidroxilas presentes no *dyngo-4a* foram substituídas por éter..... 81

Figura 34 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *dynole* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, Ambas moléculas preservaram a região central da dynola (o grupamento indol). Na 6009726, a R3 foi substituída por um etano e a R1 por (Z)-2-etinil-N-(4-metóxi-fenil)but-2-enamida. Já na molécula 8880132, a R1 foi substituída por N-(3-metoxipropil)acetamida e a R2 por 3-(ciclohexilamino)-2-metilideno-but-3-enenitrila. 82

Figura 35 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *iminodyn* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, A região em azul corresponde a N-(3-acetamidopropil)acetamida, que é uma região espelhada, característica das *iminodyn*. A esquerda de ambas possui um 4-hidroxi-2H-cromen-2-ona, já a direita a 5103008 possui um acetato de fenila e a 5103018 possui um tolueno. 83

Figura 36 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *rhododyn* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, As características mantidas, a região azul, contém um grupo caudal pequeno (maior potência), o núcleo da *rhododyn* (4-metilideno-1,3-tiazolidina-2-tiona) e um fenol ligado ao carbono. Nos compostos 7181860 e 7377558 foi substituído a dupla ligação a enxofre (tioformaldeído) e foram substituídos por oxigênio (formaldeído). As principais diferenças além das mencionadas é a presença de cloro ligado ao anel aromático do composto 7181860 e a presença de bromo no anel aromático do composto 7377558.... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Coordenadas dos grids utilizados para o experimento de docking....	50
Tabela 2 Parâmetros estatísticos de qualidade dos modelos gerados das dinaminas, as cores nas colunas são utilizadas pelo servidor MolProbitry para representar a qualidade desses resultados, sendo verde um bom valor, amarelo um valor que exige cautela e vermelho um resultado que exige atenção. Não foi possível gerar um modelo trRosetta do PfDYN3 por limitação de tamanho máximo de uma proteína para poder gerar o modelo (<1000 aminoácidos). Os números em parênteses são os percentis que aquele número representa, sendo que percentis maiores que 66 não considerados bons, entre 66 e 33 o valor exige cautela, e abaixo de 33 é um resultado que exige atenção.....	56
Tabela 3 Compostos priorizados para futuro teste de restrição e suas pontuações de <i>docking score</i> para PfDYN1 e PfDYN2	64

I. Introdução

1. Malária

1.1. A doença

A malária é a doença parasitária de maior impacto global, é causada por um protozoário do gênero *Plasmodium* (Phillips et al. 2017; Moxon et al. 2020). Em 2020 ocorreram cerca de 241 milhões de casos de malária em 85 países endêmicos da doença, um aumento significativo dos casos em relação a 2019, quando foram relatados 227 milhões de casos no mundo. A doença é endêmica de regiões tropicais e subtropicais e afeta especialmente países subdesenvolvidos, principalmente na região africana, onde ocorrem a maioria dos casos relatados. De todos os casos relatados mundialmente em 2020, a doença levou 627 mil pessoas a óbito, em sua maioria, crianças de até 5 anos, um aumento de 12% se comparado com 2019, resultando em uma taxa de mortalidade que a cada 100 mil pessoas em risco, 15 morrem. Esses aumentos dos números de casos e mortes podem estar associados à parada dos serviços contra a malária devido à pandemia da COVID-19 (Global Malaria Programme: WHO Global 2021).

De todos os casos mundiais em 2020, 96% deles foram localizados em apenas 29 países dos 85 endêmicos, sendo que Nigéria (27%), República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%), Moçambique (4%), Angola (3,4%) e Burkina Faso (3,4%) foram responsáveis por 55% do total, sendo que esses mesmos países também foram responsáveis por pouco mais de 50% do total de óbitos mundiais, mostrando que os países africanos são os mais afetados mundialmente pela doença. A região do sudeste asiático foi responsável por 2% dos casos mundiais de malária, sendo a Índia responsável por 83% desses casos. A região teve uma queda de 75% dos casos de 2000 para 2020 passando de 23 milhões de casos por ano para 5 milhões. Na região oriental do mediterrâneo teve um total de 5,7 milhões de casos sendo o Sudão o país com maior número de casos e na região oriental do pacífico houve 1,7 milhões de casos sendo a Papua Nova Guiné o país com maior número de casos e a China sendo certificada como livre de malária. As Américas hoje estão com regressão do número de casos com 0,65 milhão de casos por ano, uma redução de 58% se comparado a 2000 (Global Malaria Programme: WHO Global 2021).

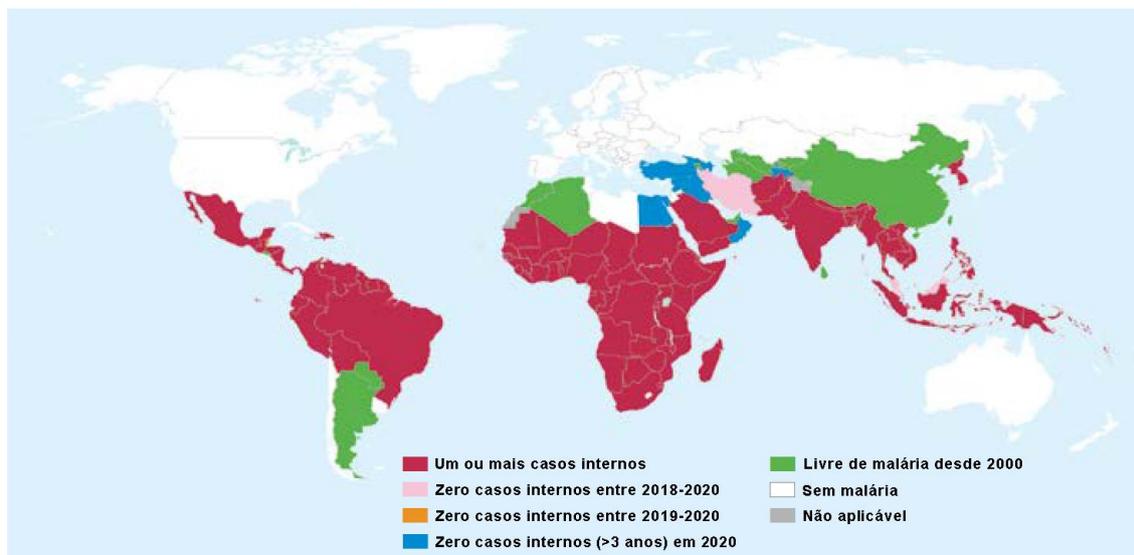


Figura 1 Distribuição geográfica dos países acometidos pela malária com dados obtidos no período de 2000-2020. Os países em vermelho tiveram ao menos um caso autóctone, em rosa nenhum caso no período de 2018-2020, em laranja nenhum caso no período de 2019-2020, em azul nenhum caso no período de 2019-2020 e os países verdes são os países livres de malária desde 2000. Os países em branco são os países não endêmicos da doença (Modificado de: WHO (2021). World Malaria Report)

1.2. Controle vetorial

Existem no mundo aproximadamente 70 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* com capacidade de transmitir malária para humanos, sendo 41 deles considerados mais importantes como vetores, nove nas Américas, sendo o *An. quadrimaculatus* e o *An. albimanus* os mais importantes, seis na Europa e Oriente Médio, sendo *An. atroparvus* e o *An. messeae* os mais importantes, sete na África, sendo o *An. gambiae* e *An. arabiensis* os mais importantes, e 19 na Ásia, sendo *An. farauti* e *An. barbirostris* os mais importantes. Acredita-se que a doença se originou de uma transferência horizontal de gorilas para humanos na África e o parasito foi se adaptando a vários mosquitos do gênero *Anopheles* mesmo aqueles distantes evolutivamente do vetor africano (Molina-cruz et al. 2016; Sinka et al. 2012).

Uma das principais maneiras de enfrentar a malária é pelo enfrentamento do seu vetor, *Anopheles spp.*, e para isso são utilizados principalmente dois métodos que são recomendados pela OMS, a utilização de mosquiteiro tratado com inseticida e a pulverização residual interna com o uso de inseticidas. Dentre outros inseticidas é válido destacar aqueles que são baseados em piretróides, organofosfatos, carbamatos e o organoclorino diclodifeniltricloroetano (DDT), que é listado como um composto poluente orgânico persistente pela Convenção de Estocolmo. Esses são os grupos de inseticidas geralmente utilizados para o controle vetorial (Global Malaria Programme: WHO Global 2021; Berg, Manuweera, and Konradsen 2017).

Porém uma recente preocupação tem surgido com relação aos inseticidas utilizados, uma vez que vem surgindo diversos mosquitos resistentes aos inseticidas. Dos 88 países endêmicos que proveram dados ao OMS de 2010 a

1.3.1. As espécies associadas à malária em humanos

Plasmodium spp. foram identificados no final de 1800, e mais de 30 espécies foram descritas em primatas, incluindo humanos, símios e macacos (Raja et al. 2020). São conhecidos ao todo cinco espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* para os quais os humanos são hospedeiros naturais: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Este último é um parasito da malária símia e foi reportado mais recentemente responsável de casos humanos no sudeste da Ásia nos anos 2000. Dentre eles o *P. falciparum* e o *P. vivax* afetam somente humanos e são os responsáveis pelo maior número de casos, principalmente o *P. falciparum*, que sozinho representa mais de 90% dos casos, cujos 14 % destes se tornarão casos graves de malária (Phillips et al. 2017; Global Malaria Programme: WHO Global 2021). Infecção humana com outros *Plasmodium* que são parasitos de símios, como o *P. cynomolgi* (no sudeste da Ásia), *P. simium* e *P. brasilianum* (na América do sul) podem ocorrer. Porém são considerados eventos infrequentes e os exames de microscopia muitas vezes os confundem com outras espécies mais comuns, havendo também casos de episódios assintomáticos (Ashley, Pyae Phyo, and Woodrow 2018; Ta et al. 2014; Brasil et al. 2017; Imwong et al. 2019; Lalremruata et al. 2015).

O *P. falciparum* por ser o parasito da malária humana mais prevalente e é o mais mortal, provavelmente exerce a maior pressão evolutiva na evolução humana se comparada com qualquer outra doença (Cowman et al. 2016).

Crianças com menos de 5 anos, que, segundo a recomendação da OMS, aquelas que vivem em regiões de contágio consideradas de moderado a alto devem tomar a vacina antimalárica, e mulheres grávidas são as principais vítimas da doença, sendo conhecido por trazer complicações na gravidez e um alto índice de morte infantil, diminuindo o número de mortes em maiores idades devido à imunidade adquirida (Greenwood, Marsh, and Snow 1991; Global Malaria Programme: WHO Global 2021). Os casos severos de malária causados por *P. falciparum* geralmente possuem três formas, anemia severa, malária cerebral e dificuldades respiratórias (Kevin Marsh et al. 1995).

O *P. vivax* é o principal responsável por causar malária nas Américas, em especial na América Central e do Sul, onde a maioria dos casos são causados por esse parasito, sendo o segundo maior causador em outras regiões do mundo (1,9% dos casos mundiais) ficando atrás somente do *P. falciparum*, chegando a ser responsável por mais de um terço dos casos de malária na Índia em 2020 (Global Malaria Programme: WHO Global 2021). *P. vivax* tem a capacidade de parasitar as células do fígado humano por vários anos em sua forma de hipnozoíto, isso confere uma resistência maior desse parasito a diversos fármacos e é responsável pela sua característica de “ressurgência” que pode acontecer depois de meses ou até anos da infecção original (Milner 2018). Outra característica que ajuda a entender sua predominância na região americana é sua preferência de parasitar reticulócitos e o predominante uso do antígeno Duffy para a invasão celular, antígeno esse que muitos africanos não produzem, garantindo uma resistência a esse tipo de malária, mesmo assim alguns casos de malária causada por *P. vivax* foram observados em pessoas que não

possuem esse antígeno, o que indica que existem mecanismos alternativos em algumas cepas do parasito para invasão, o que pode explicar o aumento dos casos desse parasito na África. Essas duas preferências para invasão resultam em um nível de parasitemia menor que o encontrado no *P. falciparum* (Milner 2018; Howes et al. 2015; Moreno-Pérez, Ruíz, and Patarroyo 2013; Mercereau-Puijalon and Ménard 2010; Zimmerman et al. 2013). A malária causada por *P. vivax*, por mais que seja considerada causadora de formas mais leves da doença quando comparada com *P. falciparum*, recebendo assim uma menor ênfase nos estudos, não só possui casos severos como o número de mortes relacionadas a esse parasito é subestimado, principalmente pelos casos “ressurgentes” que estão associados à sua morbidade (Cowman et al. 2016; Ashley, Pyae Phyo, and Woodrow 2018; Naing et al. 2014).

P. knowlesi era inicialmente considerado um parasito exclusivo de primatas não humanos, mas recentemente foi descoberto que não só pode infectar humanos como pode levar a formas graves da doença, como pode ser observado no sudeste asiático em especial na Malásia. Não se sabe ao certo como o parasito começou a infectar humanos, mas possivelmente está relacionado com a invasão do território dos primatas aumentando a proximidade do homem com as espécies *Macaca nemestrina* e o *Macaca fascicularis* já que os humanos precisam ser picados por mosquitos que se alimentaram do sangue dessas espécies uma vez que não há registro de transmissão entre humanos. Casos severos estão relacionados com uma alta densidade parasitária e pode levar a danos agudos nos rins, falha respiratória e choque séptico (Ashley, Pyae Phyo, and Woodrow 2018; Phillips et al. 2017; Milner 2018; Moxon et al. 2020; Singh et al. 2004; Singh and Daneshvar 2013; Cox-Singh et al. 2008).

Outros *Plasmodium* que são capazes de infectar humanos são o *P. malariae* e *P. ovale*, que são pouco prevalente e raramente causam doenças severas são mais encontradas na África e sudeste asiático. Comumente são diagnosticadas erroneamente como sendo *P. vivax* ou mesmo *P. falciparum* uma vez que pessoas doentes com *P. malariae* apresentam sintomas similares a formas não complicadas de malária causada pelas outras espécies e a probabilidade de uma coinfeção é maior que um paciente realmente sintomático para *P. malariae* (Singh and Daneshvar 2013; Milner 2018; Moxon et al. 2020; Cowman et al. 2016; Phillips et al. 2017; Ashley, Pyae Phyo, and Woodrow 2018).

1.3.2. Ciclo de vida

Plasmodium spp. possui um ciclo de vida complexo e com algumas pequenas diferenças dentre as espécies. O ciclo de vida do parasito é dixênico, o hospedeiro definitivo invertebrado, o mosquito fêmea do gênero *Anopheles spp.*, e o hospedeiro intermediário vertebrado, no caso, o ser humano. Dentro do ser humano sua replicação pode ser dividida em três ciclos, o ciclo hepático e o ciclo eritrocitário, que pertencem a etapa conhecida como etapa assexuada, e o ciclo esporogônico, que faz parte da etapa sexuada que termina no retorno do

parasito ao mosquito dando continuidade ao ciclo (Cowman et al. 2016; Phillips et al. 2017) como detalhado na **Error! Reference source not found.**

Durante o repasto sanguíneo, o mosquito fêmea do gênero *Anopheles* contaminado com *Plasmodium* spp. transmite formas esporozoítos do parasito ao hospedeiro humano injetando-os na derme. O destino desses esporozoítos não é bem compreendido, porém eles podem levar de uma a três horas para sair dessa região e invadir a corrente sanguínea. Dentro dos primeiros 30 a 60 minutos após a invasão da corrente sanguínea, os esporozoítos invadem os hepatócitos através das células de Kupffer ou células endoteliais dando início ao ciclo hepático. Ao invadir o hepatócito, forma-se o vacúolo parasitóforo, onde se multiplicam e dividem-se, processo esse chamado de esquizogonia, formando os merozoítos. Dependendo da espécie, podendo haver a formação de até 40 mil merozoítos por hepatócito (Cowman et al. 2016; Phillips et al. 2017).

Ao romper o hepatócito, os merozoítos são liberados na circulação hepática, invadem os eritrócitos de uma maneira rápida e dinâmica, dando início a última etapa do ciclo assexuado, o ciclo intra-eritrocitário. Este ciclo é conhecido como o responsável pelos sintomas da doença, sendo eles a febre, calafrio e sudorese (Cowman et al. 2016; Phillips et al. 2017). Assim que a infecção eritrocitária é estabelecida, em aproximadamente 48 horas, o parasito se desenvolve progressivamente em formas de anel, trofozoíto e esquizonte, onde a divisão celular (esquizogonia) ocorre dando origem à 16 a 32 células filhas, os merozoítos, que rompem a membrana para procurar outros eritrócitos para invadir e continuar a replicação. Não só o rompimento das hemácias é maléfico para o corpo, mas a liberação da hemozoína também. O heme liberado pelo catabolismo da hemoglobina é modificado pelo parasito para produzir o cristal hemozoína, que tem efeitos tóxicos no hospedeiro contribuindo para a sintomatologia da fase aguda da doença (Parroche et al. 2007; Karunaweera et al. 1992; Wijesekera et al. 1996; Vijaykumar, Naik, and Gowda 2001).

Após alguns ciclos de esquizogonia, uma parte dos parasitos inicia um processo de modificação para se desenvolver em gametócitos masculinos e femininos, dando início à etapa sexuada do desenvolvimento do parasito. A transmissão da malária do humano para o mosquito é dependente desse estágio e por mais que não se saiba ao certo os eventos moleculares que levam a essa transição ela ocorre em algum estágio desse ciclo de esquizogonia, e os merozoítos filhos dessa única célula infectada por esquizonte vão se desenvolver em ou gametócitos ou esquizontes assexuados.

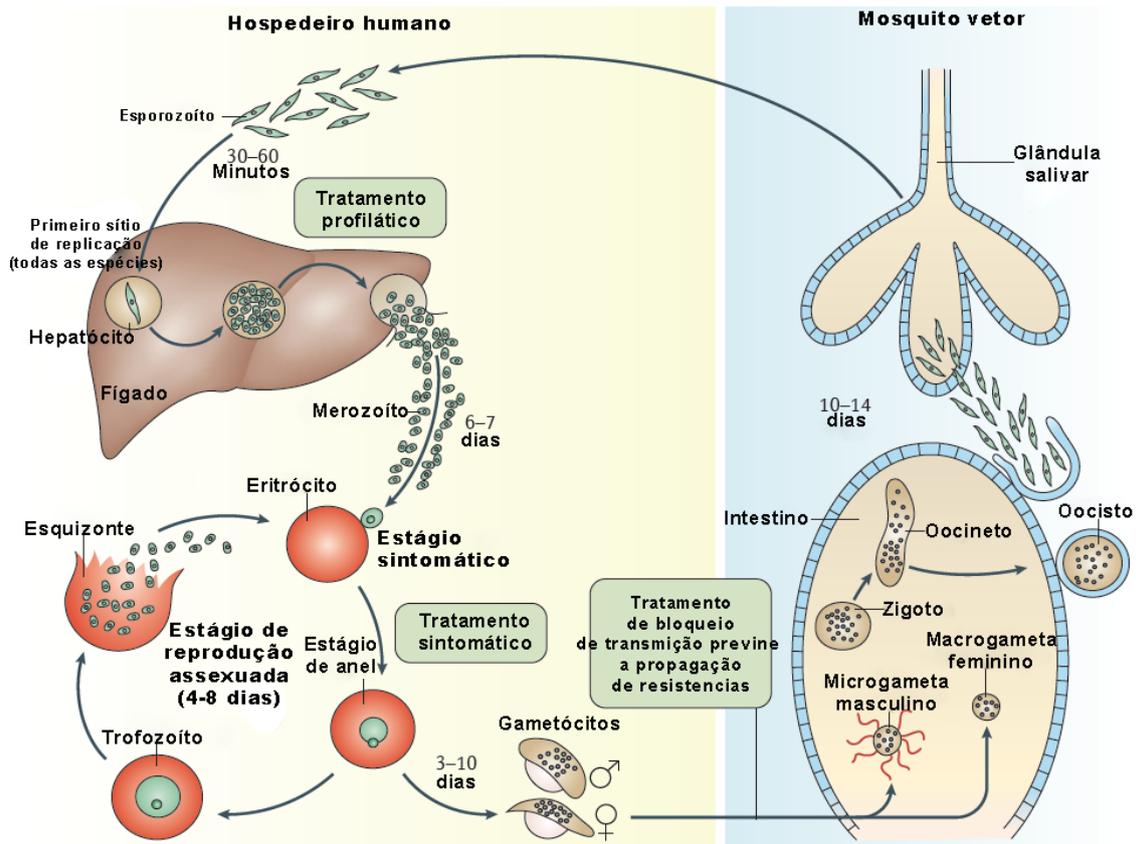


Figura 3 Ciclo de vida do *Plasmodium spp.* O mosquito vetor transmite o parasito *Plasmodium spp.* em seu estágio de esporozoíto para o hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos então invadem os hepatócitos, onde se replicam e dividem em merozoítos. Os hepatócitos infectados se rompem e liberam os merozoítos na corrente sanguínea, onde invadem hemácias para iniciar o estágio assexuado da reprodução, que é o estágio sintomático da doença. No fim do ciclo reprodutivo, o merozoíto rompe a hemácia e é liberado na corrente sanguínea para re-infectar outras hemácias e continuar a replicação ou se diferenciam em gametócitos masculinos ou femininos. Os gametócitos se concentram nos capilares da pele e são ingeridos pelo vetor no momento do repasto sanguíneo. No estômago do mosquito, cada gametócito masculino produzem oito microgametas depois de três mitoses; o gametócito feminino se modifica em macrogametas. Os gametas masculinos e femininos se fundem, formando um zigoto diploide, que se alonga se transformando em um oocineto, que se movimenta através do epitélio do intestino médio atravessando-o para formar um oocisto abaixo da lâmina basal. Os oocistos passam por ciclos de replicação formando esporozoítos, que ao romper a parede do oocisto, entram na hemolinfa e podem invadir as glândulas salivares, para que possam ser transmitidos para um novo hospedeiro humano quando a fêmea do Anopheles realizar um novo repasto sanguíneo. (Retirado de Phillips et al. 2017).

Estímulos externos como alta parasitemia e a exposição de agentes farmacológicos estão associados ao aumento da produção de gametócitos. A maturação do gametócito é um processo extenso e pode durar cerca de 11 dias para se concluir. Quando o vetor invertebrado realiza o repasto sanguíneo, os gametócitos maduros são ingeridos pelo vetor, alguns desses sofrem mitose originando oito microgametas (gametas masculinos) e alguns maturam para macrogametas (gametas femininos) (Baker 2010; Cowman et al. 2016; Phillips et al. 2017).

Dentro do intestino do mosquito, o microgameta, que é flagelado, fecundará o macrogameta, originando um zigoto diploide. Após cerca de 24 horas se transformará em um oocineto e, por ser móvel, transitará através do epitélio do intestino médio do vetor e se converterá em oocisto abaixo da lâmina basal. O oocisto então irá se replicar assexuadamente formando esporozoítos,

que ao romper a parede do oocisto, entram na hemolinfa e podem invadir as glândulas salivares, onde por lá ficará até um futuro repasto sanguíneo do mosquito onde ele pode re-infectar um novo hospedeiro vertebrado com novos esporozoítos, completando assim o ciclo biológico do parasito (Cowman et al. 2016; Phillips et al. 2017).

Os sintomas em humanos podem aparecer a partir do momento que as primeiras células do fígado são rompidas, mas na maioria dos casos somente apresentam sintomas quando os merozoítos invadem os eritrócitos e os rompem, resultando em hemólise, consequentemente anemia e outras características sintomáticas da malária (Mawson 2013; Milner 2018; Frevert et al. 2005). Entretanto, esse período que os merozoítos ficam fora da célula até a próxima reinfecção é um breve momento em que ficam desprotegidos no sangue, tornando esse um bom estágio para a ação de drogas antimaláricas (Bannister et al. 2000).

1.3.3. Tráfego celular, controle replicativo e famílias das dinaminas

A morfogênese dos merozoítos compreende um processo celular complexo que demanda a polarização do seu brotamento dentro de um esquizonte multinucleado, eventualmente produzindo um único merozoíto, cada um deles contendo suas próprias organelas, seu único apicoplasto e mitocôndria e suas organelas específicas de invasão (Bannister et al. 2000). Um tráfego intracelular preciso de todas as suas proteínas e organelas é vital para a replicação plasmodial. Qualquer falha da fusão/fissão mitocondrial ou de seu apicoplasto, por exemplo, pode ocasionar a morte celular, reiterando a rigorosa precisão das dinâmicas intracelulares (Verhoef, Meissner, and Kooij 2021). A morfogênese dos merozoítos é um importante estágio onde o *Plasmodium* adquire sua capacidade de invasão celular e a já mencionada fase que resulta na patogenicidade em humanos.

Os membros da superfamília das dinaminas são grandes GTPases conservadas através da evolução principalmente descritas como enzimas mecanoquímicas envolvidas nos processos de fissão e fusão de membranas. A arquitetura apresentada nas dinaminas que as tornam distintas de outras GTPases é o seu grande domínio GTPase seguido de dois adicionais domínios, um domínio médio e um domínio efetor de GTPase (*GED domain*). Esses últimos dois domínios são, respectivamente, envolvidos na oligomerização enzimática e na regulação da atividade da GTPase, o que provê a habilidade de se auto-oligomerizar, sua maior diferença com relação a outras GTPases (Praefcke and McMahon 2004).

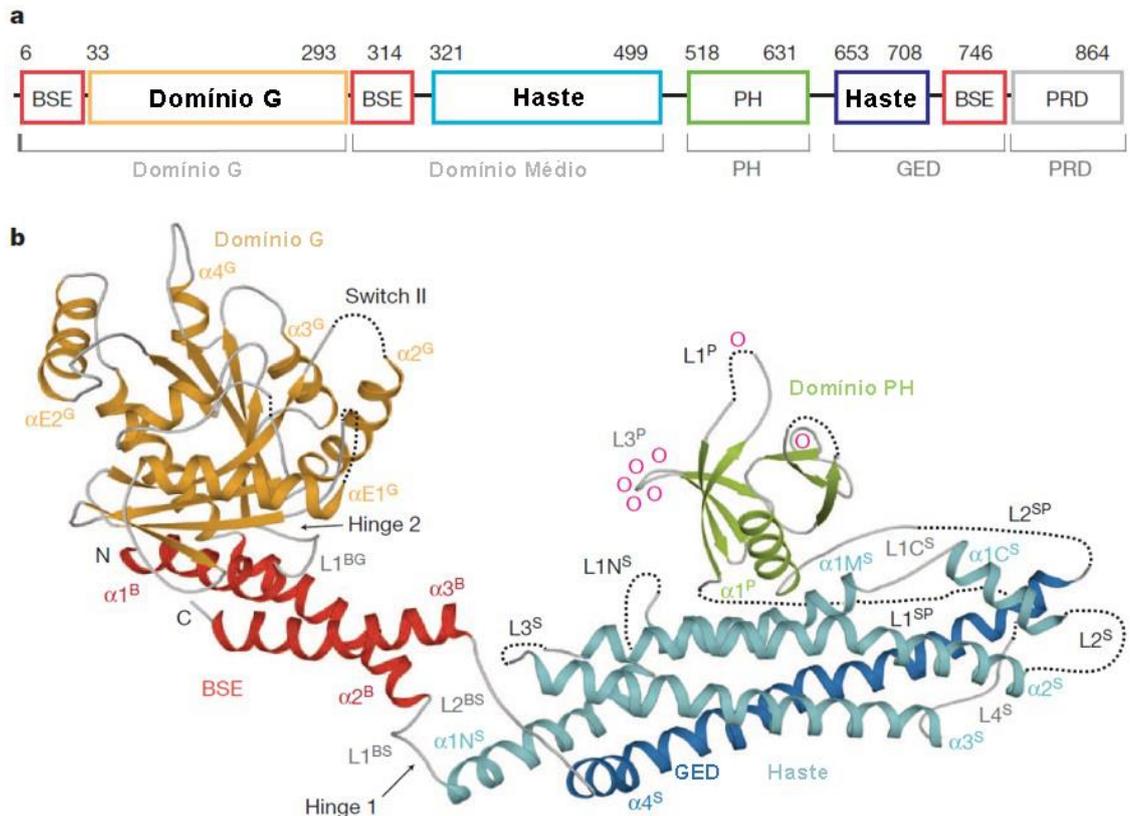


Figura 4 Estrutura cristalizada da dinamina humana 1 (hDMN1). Em evidência os domínios que compõem a estrutura das dinaminas clássicas, domínio G (amarelo), domínio médio (azul claro), domínio PH (verde), GED (azul escuro) e PRD (cinza). (imagem adaptada de Faelber et al. 2011)

A superfamília das dinaminas é subdivididas em subgrupos de acordo com suas diferentes organizações de domínio, permitindo reunir em grupos e classificar as proteínas que dividem os mesmos domínios alvo. Essa forma de visualização permite a análise que as proteínas com estruturas similares, terão o mesmo tipo de alvo, mesmo sendo evolutivamente distantes. As dinaminas clássicas, dinaminas que dividem a mesma estruturação de domínios que a dinamina 1 de mamíferos, contém além do domínio GTPase, domínio médio e GED, o domínio *Pleckstrin-homology* (PH) e o domínio rico em prolina (PRD). As proteínas *dynamamin-like* (DLP) ou *dynamamin-related* (DRP) não possuem PRD, mas, por mais que não possa ser identificada por meio da homologia sequencial, possuem o domínio PH (figura 7). Essa pluralidade de possíveis organizações pode explicar a quantidade de implicações biológicas que esse grupo de proteínas possui, auxiliando não somente a fusão e a fissão, consequentemente na endocitose, tráfego intracelular, citocinese, e resistência a patógenos (Praefcke and McMahon 2004).

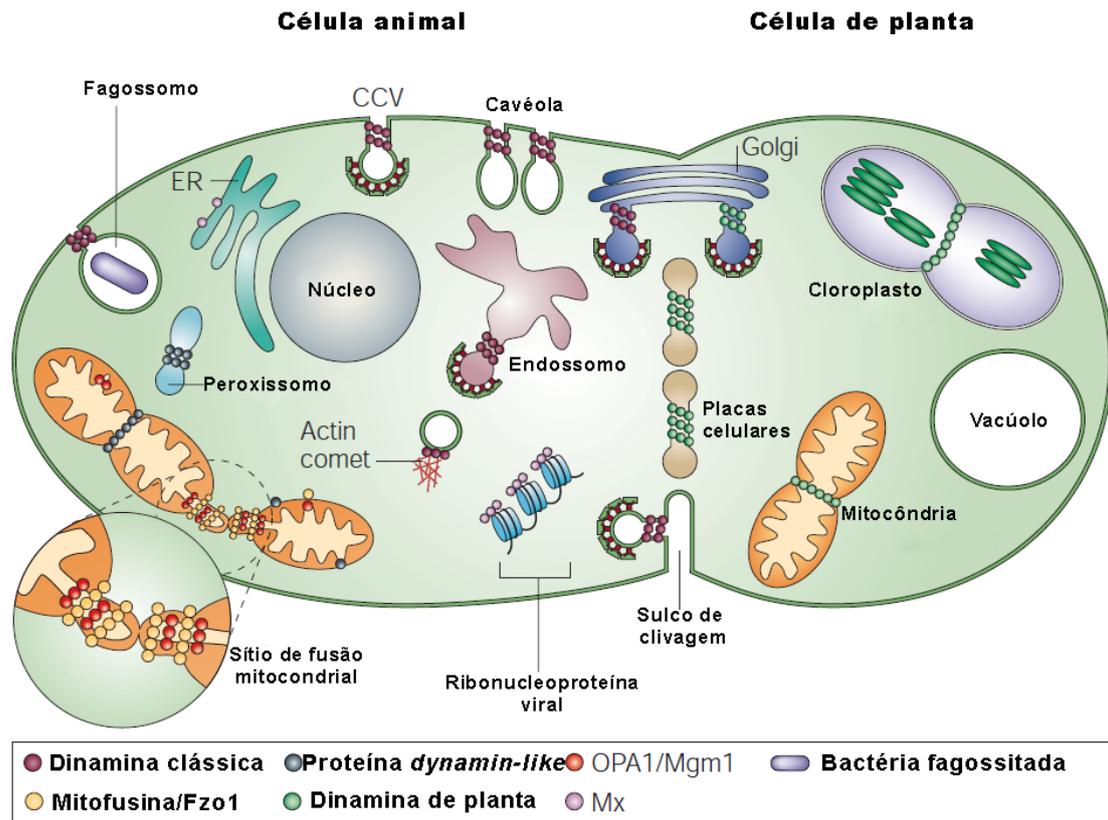


Figura 5 Membros da superfamília das dinaminas em animais e plantas. As dinaminas são subdivididas entre “dinaminas clássicas” e “*dynamin*-related”. As dinaminas clássicas (em vinho) são tipificadas pelas dinaminas envolvidas no processo de formação de brotamentos de vesículas revestidas de clatrina na membrana plasmática, sulcos de clivagem, Golgi e endossomos, mas também em formação de brotamentos não mediado por clatrina nas cavéolas e fagossomos. *Dynamin*-related” (DLPs) estão geralmente envolvidas em divisão organelar como as mitocôndrias e peroxissomos. As famílias OPA1 (atrofia ótica 1) e a mitofusina também estão envolvidas na reorganização da mitocôndria, mas provavelmente na fusão mitocondrial e, portanto, antagonizam com as DLPs. Os membros da família MX são induzidos por interferons e conferem resistência contra vírus de RNA. As plantas contêm várias dinaminas distintas. Algumas delas possuem funções similares às dinaminas humanas, mas outras possuem características únicas às plantas, como a formação do platô celular e a divisão do cloroplasto. (Retirado de (Praefcke and McMahon 2004).

De acordo com o banco de dados específico de *Plasmodium* spp. PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/app/>), acessado em 12 de julho de 2022, existem ao todo três proteínas *dynamin-like* no *Plasmodium falciparum* 3D7, a PfDYN1 (Li et al. 2004), a PfDYN2 (Charneau et al. 2007) e a putativa PfDYN3 (Breinich et al. 2009; Webster and McFadden 2009).

A PfDYN1 é uma DLP localizada no interior do parasito durante todo o ciclo eritrocitário, associada a diversas estruturas de membranas como o vacúolo digestivo, membrana nuclear, membrana plasmática do parasito, vacúolo parasitóforo e retículo endoplasmático, o que sugere, junto com sua similaridade às dinaminas de outros organismos, que sua função pode estar relacionada ao tráfego intracelular, como o tráfego mediado por ER, tráfego citoplasmático, e endocitose, sendo corroborado por Zhou et al, 2009, que observou que sua inibição interrompia a captação da hemoglobina e as vias do citóstoma, ambas dependentes de fissão de membrana para acontecer (Li et al. 2004; Zhou et al. 2009; Elliott et al. 2008)

A PfDYN2 é uma DLP localizada em especial no estágio esquizonte, ainda não teve sua função propriamente descrita. Porém sua similaridade sequencial com a VPS1 e a DNM1 que são DLPs de levedura permite induzir que ela está mais relacionada com a divisão mitocondrial, divisão do peroxissomo, divisão do plastídio, brotamento vesicular do ER, transporte vesicular ao complexo de Golgi e dinâmica endossomática. A co-localização com marcadores de ER, complexo de Golgi e apicoplasto, corrobora com essa hipótese (Charneau et al. 2007). Somado a isso, Stanway et. al. trouxe a discussão se a PfDYN2 era responsável tanto pela divisão do apicoplasto quando da mitocôndria, o que seria comparável ao que ocorre com a dinamina de *Trypanosoma brucei* que é responsável tanto pela endocitose quanto pela fissão mitocondrial, mas uma confirmação experimental ainda é necessária para propriamente determinar a função da PfDYN2 (Charneau et al. 2007; Stanway et al. 2009; Chanez et al. 2006)

O terceiro e último membro da superfamília das DLPs que pode ser encontrado em *P. falciparum*, PfDYN3, ainda não foi descrita, mas uma proteína similar em *Toxoplasma gondii* (TgDRPC) foi descrita por Mellati *et al.*, 2019. Essa proteína foi localizada adjacente a mitocôndria e compartilha similaridades com a TgDRPB e DNM1 de levedura, no qual sugere que ela pode desempenhar uma função na fissão mitocondrial. O TgDRPC foi localizado por ensaio de imunofluorescência como adjacente à mitocôndria, além disso Mellati *et al.* realizaram o *knock-down* dessa proteína o que resultou em uma morfologia anormal da mitocôndria e uma eventual morte celular, corroborando não só com sua função na fissão mitocondrial como no fato de ser essencial para sua sobrevivência (Melatti et al. 2019).

1.4. Sintomas da Malária

A malária pode ser classificada com relação à sua severidade, começando pela assintomática, bastante comum nas regiões endêmicas onde a população já adquiriu uma imunidade a doença, a não-complicada, definida como a presença de sintomas (febre) porém sem sinal clínico ou laboratorial que indique severidade ou disfunção dos órgãos vitais, e severa, geralmente advindo de uma infecção inicial não controlada e que evolui para um estágio no qual é possível observar danos teciduais e de órgãos (Cowman et al. 2016; Milner 2018). Os sintomas mais comuns da malária e presentes invariavelmente são a febre, calafrios e sudorese, os outros sintomas não específicos incluem dor de cabeça, náusea, dor muscular, fadiga e palidez. Em geral os sintomas são causados pela hemólise das hemácias infectadas com *Plasmodium* spp. (Phillips et al. 2017). Os quadros severos de malária muitas vezes levam ao óbito do paciente. A malária severa pode se apresentar de diversas formas, dependendo da característica imunológica do acometido. A maioria dos casos fatais em geral apresenta três síndromes que podem ocorrer tanto individualmente quanto em conjunto. São elas anemia severa, malária cerebral e complicações pulmonares, além do comprometimento de vários órgãos devido à obstrução da microcirculação (Moxon et al. 2020; Wassmer and Grau 2017; Cowman et al. 2016; Milner 2018; Phillips et al. 2017; Ashley, Pyae Phy, and Woodrow 2018).

Em áreas de alta transmissibilidade de malária, a população como um todo tem concentração reduzida de hemoglobina total em decorrência da doença, portanto um tratamento comum envolve a transfusão de sangue, que junto a esse método trás outros complicadores, como a infecção pelo vírus HIV, hepatite B e C, sífilis e até mesmo malária, sendo comum em algumas regiões endêmicas haver coinfeção por diferentes espécies (White 2018; Ahmadpour et al. 2019; Mremi et al. 2021; Douglas et al. 2013; Vermeulen et al. 2019). No caso das mulheres grávidas é ainda mais sério, pois não só há o aumento da prevalência de anemia durante a gravidez como as complicações afetam diretamente a saúde do feto, podendo causar baixo peso do recém-nascido e altas taxas de mortalidade neonatal, principalmente por conta da malária placentária, onde a mãe passa os parasitos através da placenta para o seu filho e, quando a mãe também é acometida por HIV, a chance de transmissão é ainda maior (Cowman et al. 2016; Ssentongo et al. 2020; Briand, Badaut, and Cot 2009; Brickley et al. 2016; Fried and Duffy 2017; Rogerson et al. 2018).

1.5. Malária no Brasil

O problema brasileiro com a malária data desde o final da década de 30 no qual o nordeste brasileiro foi invadido por *Anopheles gambiae* e uma severa onda de malária afetou a região que em geral não tinha nenhuma experiência com a doença alcançando um índice de fatalidade de 13% (Deane 1992). No início dos anos 40 se tornou um problema nacional e chegou a contaminar 20% da população anualmente (Barros-Barreto 1940). A partir do final da década de 50, o Brasil começou a melhorar o quadro implementando planos da OMS que diminuiram a taxa de contágio para seu menor nível perto da década de 60, porém no meio dessa mesma década outra onda afetou a região amazônica, que na época sofreu uma grande e descontrolada colonização graças ao incentivo do governo, e nos dias de hoje os casos de malária ainda são um grande fardo para a região (Tauil and Daniel-Ribeiro 1998; Loiola, Mangabeira Da Silva, and Tauil 2002). Mesmo após a criação do Plano Nacional de Controle da Malária (PNCM) e do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), que de fato trouxeram reduções drásticas de fatalidades, hospitalizações e incidências por meio da rápida detecção e controle vetorial, a malária continua sendo um complicado problema de saúde no país (Oliveira-ferreira et al. 2010; Bezerra et al. 2020).

No Brasil há a presença de três espécies de *Plasmodium* que causam malária, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* sendo que o mais predominante, diferente da maioria do mundo, é o *P. vivax* que é responsável por 83,7% dos casos, seguido por *P. falciparum* responsável por 16,3% dos casos. Esses valores são condizentes com o padrão de contaminação do continente americano, uma vez que o Brasil é responsável pelo segundo maior número de casos na região com mais de 150 mil casos só em 2020 (Oliveira-ferreira et al. 2010; Global Malaria Programme: WHO Global 2021). É importante ressaltar que o *Anopheles darlingi*, o principal mosquito vetor da malária no Brasil, está presente em praticamente todo o território (80%) porém a incidência de malária

é quase que exclusiva da região amazônica, sendo somente ela responsável por aproximadamente 99,8% de todos os casos do país (Tauil and Daniel-Ribeiro 1998; Oliveira-ferreira et al. 2010).

O Brasil em geral utiliza os medicamentos recomendados pela OMS para tratar seus casos de malária. Para o tratamento de malária causada pelo *P. falciparum* se utiliza AL e AS-AQ enquanto para os casos envolvendo o *P. vivax* utiliza-se a CQ ou a combinação de CQ e primaquina (PQ) (Global Malaria Programme: WHO Global 2021; Ferreira and Castro 2016). Mas antes do tratamento médico, a primeira linha de luta contra a malária são os projetos do governo de controle da Malária, o PNCM e PIACM, que está sob controle do Ministério da Saúde. Dentre as medidas para o controle da malária, é preconizado o controle vetorial e a detecção dos acometidos pela doença, medidas que de fato trouxeram redução da fatalidade e contágio. Dentre as ações está a pulverização interna de veneno contra o mosquito, além de um aumento na detecção de malária, otimizando assim o tratamento, além de um maior investimento financeiro e a regularidade desse incentivo na luta anti malária. Com relação aos aspectos sociais que permeiam a malária, o que pode ser observado no fato da doença estar presentes em indivíduos masculinos entre 30 e 50 anos, é que provavelmente está relacionado com a maior exposição do homem ao trabalho laboral, como o de mineração. (Tauil and Daniel-Ribeiro 1998; Vasconcelos et al. 2020; Loiola, Mangabeira Da Silva, and Tauil 2002).

Alguns fatores complicadores atrapalham o combate à malária no Brasil. O primeiro, e já mencionado, foi o crescimento rápido e desorganizado na região Norte do país, o que gerou um aumento progressivo da migração, desmatamento, pecuária, agricultura, mineração, dentre outras atividades resultantes da antropização da região, além da desigualdade social e econômica que induz as pessoas a viverem em condições menos favoráveis e conseqüentemente mais expostas ao vetor, e das medidas governamentais serem tomadas a nível nacional, sendo que deveria ter mais ações focadas em localidades específicas, todos esses fatores contribuem para o aumento da transmissão da doença (Oliveira-ferreira et al. 2010; Souza et al. 2019; Loiola, Mangabeira Da Silva, and Tauil 2002). Outro problema também corriqueiro é a falta de diagnóstico da malária causada por *P. vivax*, uma vez que a falta de sintomatologia dificulta o diagnóstico, já que em alguns locais da Amazônia brasileira chega a cerca de 17% dos casos diagnosticados serem assintomáticos e só começam a apresentar sintomas após 6 semanas de infecção (Alves et al. 2002; Barbosa et al. 2014; Carlos et al. 2019). O erro do diagnóstico leva a falha em medicar o paciente corretamente, que inclui a utilização da primaquina, a única droga aprovada para uso clínico capaz de matar a forma dormente do *Plasmodium*, hipnozoíto, que é uma forma que o *P. vivax* pode assumir que permite ficar protegido no interior da célula e reaparecer depois de algum tempo causando uma nova infecção (Milner 2018; Howes et al. 2012). O próprio uso da primaquina também traz um problema de saúde público, uma vez que a utilização dessa droga pode provocar quadros de anemia em pacientes com deficiência de G6PD, o que na região de Manaus, por exemplo, representa 3% da população masculina com uma mutação que induz essa deficiência (Santana

et al. 2009). O relato em 1992 de uma linhagem resistente a CQ também traz uma preocupação sobre o tratamento pois o tratamento contra *P. vivax* não mudou muito nesses últimos anos e por mais que essa linhagem ainda seja uma minoria levanta a discussão sobre a necessidade da criação de novos fármacos (Price et al. 2014; Garavelli and Corti 1992; Filho et al. 2007; Chehuan et al. 2013; Marques et al. 2014).

2. Ações de controle da malária

2.1. Enfrentamento antimalárico

Diversos esforços são realizados para enfrentar a malária, sendo consideradas principalmente três linhas de enfrentamento. A primeira linha de enfrentamento ocorre com o controle do *Anopheles* spp., o vetor da malária, com o auxílio do monitoramento ambiental de criadores de insetos e o uso de inseticidas em regiões de maior prevalência dos mosquitos. A segunda linha de enfrentamento ocorre por quimioterapia com quinolonas, antifolatos, artemisinina e derivados de artemeter, que possuem alta eficácia, baixa toxicidade, porém alto custo (Wellems and Plowe 2001; Travassos and Laufer 2009; Global Malaria Programme: WHO Global 2021). A terceira linha de defesa é a imunidade à malária, que é resultado da imunidade inata, adaptativa e como consequência da vacinação. Existe uma particularidade típica aos moradores de áreas endêmicas que por haver o contato frequente com o parasito eles acabam produzindo anticorpos contra proteínas indispensáveis à progressão do ciclo de vida do plasmódio. Essa imunidade acontece de forma gradual e lenta, dependendo do tempo que o indivíduo permaneceu na área de endemia, porém ela pode ser perdida caso o indivíduo se ausente da região por um longo período. Essa imunidade se dá inicialmente contra as formas letais da malária, ocorrendo isso após os cinco anos de idade, e evolui fazendo os sintomas da doença tornarem-se cada vez menos intensos e infrequentes. No entanto, os níveis do protozoário no sangue podem atingir valores constantes, o que não caracteriza uma imunidade estéril (Doolan, Dobaño, and Baird 2009; K. Marsh and Kinyanjui 2006; Long and Zavala 2017; Global Malaria Programme: WHO Global 2021)

Um dos maiores complicadores no enfrentamento da malária, em especial nas regiões menos desenvolvidas, é o financiamento para compra e distribuição de antimaláricos e a alocação desses recursos contra a doença como um todo, já que parte desse investimento deve ser alocado para pesquisa de antimaláricos e desenvolvimento de vacinas e parte deve ser alocado propriamente para a aquisição de medicamentos. O *Global technical strategy for malaria* (GTS) fez uma estimativa de quanto seria necessário arrecadar para alcançar as metas estipuladas para os períodos de 2020, 2025 e 2030, que envolvem a redução do número de incidência e mortalidade por pelo menos 40% até 2020, 75% até 2025 e 90% até 2030 baseado no número de casos que ocorreu em 2015. Esses valores anuais foram inicialmente estimados a 4,1 bilhões de dólares em 2016, valor esse que foi aumentado para 6,8 bilhões de dólares em 2020. O total

arrecadado para o controle e eliminação da malária em 2020 foi estimado em US\$ 3,3 bilhões, valor abaixo do requerido calculado pelo GTS, sendo que majoritariamente esse dinheiro veio de países desenvolvidos como Estados Unidos, Alemanha e Reino Unido, países esses que não possuem casos registrados de malária. Do valor total investido mais de três quartos (79%) foram direcionados a região africana. Os países endêmicos de malária contribuíram com aproximadamente um terço do total adquirido sendo esse valor aproximadamente US\$ 1,1 bilhão de dólares. Desse total, aproximadamente US\$ 0,3 bilhão foram gastos no setor público dos países afetados e o restante para outras atividades de controle de malária. A *Global Malaria Research and Development (R&D)*, em 2020, arrecadou US\$ 619 milhões de dólares que foram divididos entre investimento na produção de medicamentos (37%), pesquisa básica (28%), vacina (19%), produtos para controle vetorial (10%), diagnóstico (2,7%) produtos biológicos (0,9%) e outros produtos (1,9%) (Global Malaria Programme: WHO Global 2021).

Após quase dois anos do começo da pandemia da COVID-19, houve mais de 101 milhões de casos e 2,4 milhões de mortes causadas por essa doença só em países endêmicos de malária, sendo que os dados reportados para os países subsaarianos devem ser vastamente subestimados (Mwananyanda et al. 2021). Mesmo após o desenvolvimento de vacinas e o esforço global de promover acesso às mesmas aos países de média e baixa renda, o progresso da vacinação em massa está lento. Até agora a maioria dos países endêmicos de malária possui menos de 5% de sua população vacinada, o que resulta em diversas interrupções nos serviços antimalária, uma vez que ondas de transmissão do coronavírus atrapalham a saúde e economia desses países. Mesmo com os esforços da OMS e do suporte de vários países, que de fato evitaram que o problema chegasse a níveis mais alarmantes, o número de testes para detectar a malária diminuíram e o número de casos e de mortes voltou a subir, demonstrando como até mesmo uma perturbação moderada nos serviços contra a malária podem ter um forte impacto no combate à doença (Global Malaria Programme: WHO Global 2021).

2.2. Fármacos

Os primeiros registros de tratamento de malária datam de 2700 A.C. utilizando produtos naturais na medicina tradicional chinesa (Hsu 2006). Os missionários espanhóis em suas missões pela América utilizavam um pó produzido de árvores peruanas do gênero *Cinchona*, que depois foi levado para a Europa para tratamento de febre e malária. Esse pó continha como ingrediente ativo a quinina, que foi isolada no século 18 e utilizada como droga antimalárica até 1940, quando foi substituída pela cloroquina, que causava muito menos efeitos colaterais (Achan et al. 2011; Roersch van der Hoogte and Pieters 2014; Antony and Parija 2016; Goldsmith 1946; Skrzypek and Callaghan 2017). A cloroquina foi descoberta devido à necessidade de encontrar derivados da quinina em 1934. Esse medicamento é efetivo contra o *Plasmodium spp.* durante seu estágio intra-eritrocitário, uma vez que ele inibe a polimerização dos hemes

em hemozoína, que é um cristal inerte não tóxico para o parasito (Slater and Cerami 1992; Sullivan et al. 1996). Em adição à sua eficácia, seu baixo custo de produção fez que se tornasse rapidamente o padrão ouro de medicamento quimioterápico antimalárico nas regiões afetadas pela doença sendo adicionada pela OMS na “Lista de Medicamentos Essenciais” e utilizada em diversos programas de erradicação da malária, como o programa da OMS de erradicação mundial da malária em 1955 (Breeveld, Vreden, and Grobusch 2012; Skrzypek and Callaghan 2017; Global Malaria Programme: WHO Global 2021).

Os programas de erradicação, entretanto, levaram ao uso desenfreado da cloroquina o que resultou no surgimento de linhagens resistentes ao fármaco durante os anos 50 (“CINCHONA BARK AND ITS ALKALOIDS.” 1924; Skrzypek and Callaghan 2017), o que levou a comunidade científica a procurar novos fármacos. Essa movimentação levou o governo chinês a iniciar um projeto para descobrir um químico antimalárico no ano de 1967 que mobilizou mais de 60 instituições a estudarem plantas da medicina tradicional chinesa (Tu 2011; Chang 2016). A planta chamada *Artemisia annua*, também conhecida como qinghao, chamou a atenção dos pesquisadores por ter sido utilizada na medicina tradicional chinesa contra febre e inflamação há mais de 2000 anos (Ma et al. 2020), e em 1972 o composto ativo dessa planta, artemisinina, foi isolada e identificada (Tu 2011). Diversos cientistas então avaliaram a artemisinina e derivados dela e encontraram evidências da eficiência e segurança dessa família de fármacos (De Vries and Dien 1996; Gu, Lu, and Qu 1980). O tratamento utilizando derivados de artemisinina foi revolucionário a partir de 1990, no qual o tratamento combinado com esses fármacos se tornou o padrão ouro do tratamento antimalárico e garantiu o prêmio Nobel por seu estudo pela pesquisadora chinesa Tu Youyou (Miller and Su 2011; White 2008; Global Malaria Programme: WHO Global 2021; Ashley, Pyae Phyo, and Woodrow 2018; Cowman et al. 2016; Phillips et al. 2017). O mecanismo de ação da artemisinina funciona por meio de sua ativação pelo íon ferroso (Fe^{2+}), presente no grupo heme, da hemoglobina, ativa a clivagem da ponte da endoperóxido forma radicais livres que alquilam proteínas suscetíveis e metabólitos celulares, além de gerar espécies reativas de oxigênio, que coletivamente levam a morte parasitária (O’Neill, Barton, and Ward 2010; Stocks et al. 2007; Jing Yang et al. 2020).

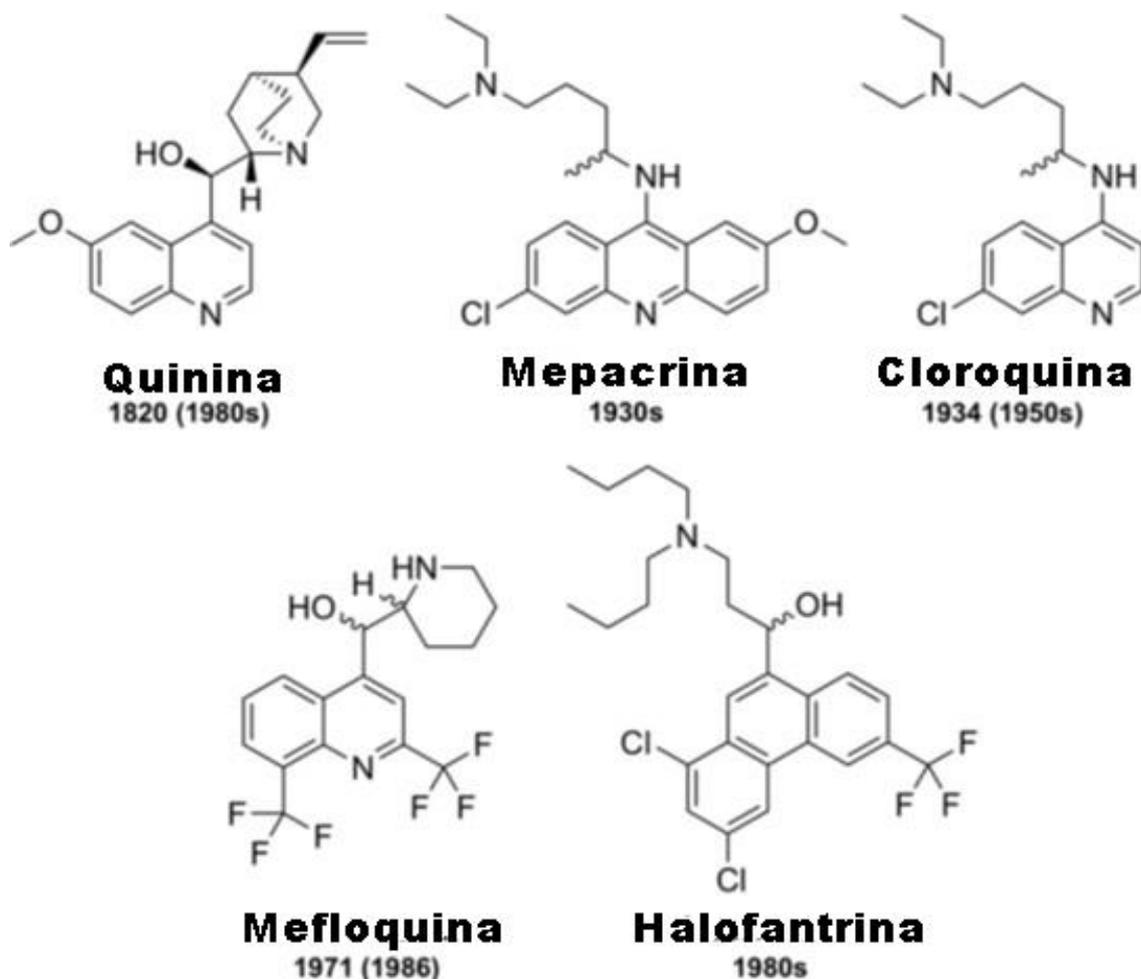


Figura 6 Fármacos antimaláricos descobertos entre os anos 1820 e 1980. Algumas ainda estão em uso atualmente e outras se tornaram ineficientes devido ao surgimento de cepas resistentes ou devido aos seus efeitos colaterais. Entre parênteses as datas em que foram reportados cepas resistentes a elas pela primeira vez. (Adaptado de Tse, Korsik, and Todd 2019)

Sabendo que nenhuma droga é eficiente para todos os tipos de *Plasmodium spp.*, cada região do mundo utiliza medicamentos que são pensados para agir contra os principais espécimes que afetam a região. Para a região africana da OMS é mais focado ao *Plasmodium falciparum* e inclui artemeter-lumefantrina (AL), artesunato-amodiaquina (AS-AQ), artesunato-pironaridina (AS-PY) e diidroartemisinina-piperaquina (DHAPPQ), na região americana da OMS é utilizado AL, artesunate-mefloquine (AS-MQ) e cloroquina (CQ), em outras regiões do mundo também se utilizam compostos similares aos mencionados, mas em geral estão relacionados ao tratamento de *P. falciparum* o principal causador de mortalidades (Ashley, Pyae Phyo, and Woodrow 2018; Global Malaria Programme: WHO Global 2021; Cowman et al. 2016; Phillips et al. 2017).

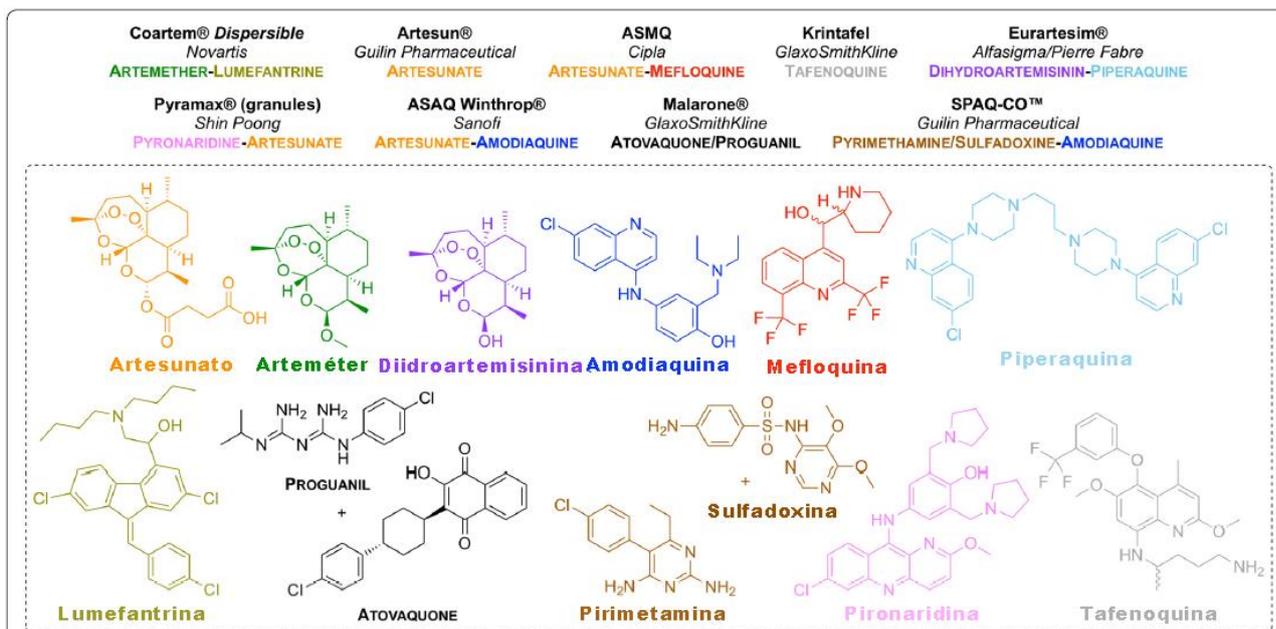


Figura 7 Novas combinações de fármacos/formulações que foram aprovadas para uso. Nome da marca do medicamento (em negrito no topo da imagem), são listados na figura a empresa parceira (em itálico) e combinação de fármacos (codificado em cores relacionados com a sua estrutura). (Adaptada de Tse, Korsik, and Todd 2019)

Um crescente aumento da resistência a artemisinina vem preocupando quanto a eficácia dos antimaláricos. Evidências apontam que atualmente há uma expansão clonal da mutação da *PfKelch13*, que é um marcador molecular associado ao fenótipo de resistência a artemisinina. Essa mutação leva a preocupação quanto a possibilidade de outras mutações ocorrerem e trazerem novas resistências, levantando sérios questionamentos quanto a eficiência dos antimaláricos (Ariey et al. 2014; Straimer et al. 2015; Tilley et al. 2016; Suresh and Haldar 2018; Global Malaria Programme: WHO Global 2021). Os primeiros casos de resistência do parasito foram reportados na década de 70, no qual foi relatado uma cepa de *P. falciparum* que era resistente a CQ e sulfadoxine-pyrimethamine (Hyde 2005). Atualmente é conhecido outros genes capazes de prover resistência a antimaláricos como os genes *pfcr1* (que provê resistência a CQ e foi também associado a resistência à piperaquina) e *pfmdr1* (que provê resistência a múltiplas drogas), que induzem um fenótipo similar ao encontrado em células cancerígenas no qual ocorre um efluxo dos fármacos do sítio de ação (Skrzypek and Callaghan 2017; Cornwell et al. 1986; Fojo et al. 1985; Riehm and Biedler 1971; Skovsgaard 1978; Willingham et al. 1986), esta característica explica o porquê dessa mutação induzir a resistência de drogas de múltiplas classes. Levando em conta que não há hoje nenhuma alternativa para os derivados de artemisinina (Bhagavathula, Elnour, and Shehab 2016; Mavoko et al. 2017), o cenário atual é extremamente preocupante, o que reforça a necessidade de estudos que possam detectar novos alvos terapêuticos de fármacos. O surgimento de múltiplas resistências levou a utilização de quimioterapia combinatória, para evitar o surgimento de novas mutações e casos de ressurgência (Price et al. 2004; Eastman et al. 2011).

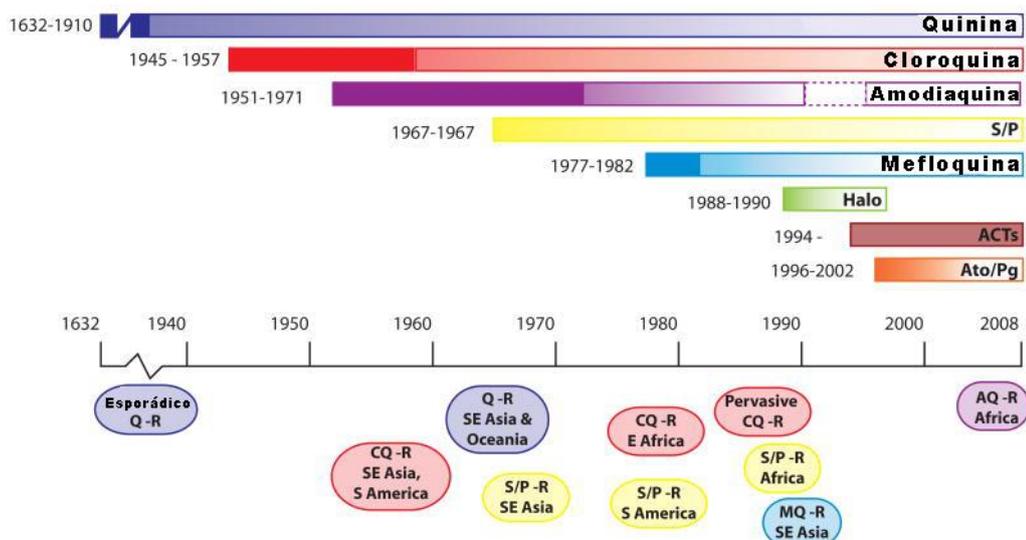


Figura 8 Surgimento de resistência aos principais antimaláricos. Cada barra colorida representa uma monoterapia ou uma combinação. Os anos à esquerda da barra representam o ano em que o fármaco foi introduzido e o primeiro caso reportado de resistência. Os círculos abaixo da imagem denotam o período aproximado em que as resistências se espalharam para diferentes regiões do planeta. (Adaptado de Eklund and Fidock 2008)

A utilização de múltiplos fármacos no tratamento antimalárico permite uma alta taxa de recuperação dos pacientes, como pode ser observado no exemplo de Ruanda e Uganda, onde há uma considerável população clonal da mutação *PfKelch13*, menos de 10% dos tratamentos falham, o que demonstra que as drogas parceiras ainda são eficientes (Global Malaria Programme: WHO Global 2021). Outro método que está sendo utilizado recentemente é a utilização de antibióticos em conjunto com os antimaláricos para o combate de malária multirresistente. Duas organelas importantes para a replicação e sobrevivência do *Plasmodium spp.* são o apicoplasto e o mitocôndria, ambos responsáveis por importantes vias metabólicas e possuem como origem evolutiva a endossimbiose de um organismo procariótico, e, portanto, são afetados por antibióticos e a sua replicação errônea acaba levando a morte do parasito, reforçando a importância de ambas as organelas na replicação e sobrevivência do organismo e porque é um bom alvo de fármacos. O efeito antimalárico do antibiótico, geralmente azitromicina, telitromicina ou quinupristina/dalfopristina, é um fenômeno conhecido como “morte atrasada”, no qual o organismo morre apenas na segunda replicação devido a erros na replicação dessas organelas (Pradel and Schlitzer 2010; Verhoef, Meissner, and Kooij 2021), porém, mesmo com esse quadro de morte tardia, é evidente que essas organelas podem ser bons alvos para fármacos.

2.3. Vacina

Com relação ao desenvolvimento de vacinas, pode-se considerar que está havendo uma evolução, pois protótipos de vacinas estão sendo desenvolvidos para tentar diminuir a crise nos países com maiores números de casos. Um dos protótipos de vacina contra malária, em estudo clínico de fase III, conhecida como RTS,S, obteve resultados promissores, porém sua baixa

eficiência a longo prazo (36,6% para crianças de 5 a 17 meses que receberam 4 doses após 48 meses (Olotu, Fegan, and Wambua 2016)) e ainda tem a possibilidade de rebote após alguns anos, o que a impede de ser aprovada pelos órgãos reguladores, mesmo assim ela ainda é recomendada pela OMS para crianças em países que tiverem risco moderado e alto de transmissão, tornando a RTS,S a primeira vacina recomendada pela OMS (Partnership 2015; Olotu, Fegan, and Wambua 2016; Global Malaria Programme: WHO Global 2021). Porém outra vacina baseada na RTS,S, essa em fase 2, conhecida como R21/Matrix-M, se apresenta como uma candidata mais promissora. Essa vacina não causa efeito adverso grave e a sua eficiência permaneceu entre 74-77% nos grupos estudados após 2-6 meses da última vacinação, mantendo seus níveis de imunidade ao completar um ano (Dattoo et al. 2021).

A vacina RTS,S utiliza como carreador o antígeno de superfície da hepatite B para carregar a matriz que produz a proteína de circunsporozoítio (CSP), um antígeno identificado como possível alvo para vacina que é secretado durante o estágio de esporozoítio pelo parasito da malária, que foi a mesma estratégia utilizada pela R21/Matrix-M (Laurens 2019; Dattoo et al. 2021). Porém essa não é a única estratégia hoje para o desenvolvimento de uma vacina contra malária, outros antígenos e tecnologias estão sendo pesquisadas e testadas para tentar criar uma vacina mais eficiente. Assim como a vacina da COVID-19, uma vacina baseada em RNA está em desenvolvimento utilizando o candidato a antígeno “fator inibitório de migração do macrófago de *Plasmodium* (PMIF)” (Mahase 2021). Outra vertente é o desenvolvimento de vacina baseada na tecnologia de “nanopartículas de proteínas de automontagem (SAPN)” que manipula a capacidade dos peptídeos e proteínas de se auto montarem em partículas que são quimicamente estáveis, essas partículas incluem múltiplos epítomos conformacionais que geram tanto resposta imune humoral quanto mediada por células (Burkhard and Lanar 2015). Atualmente a principal candidata a vacina SAPN foi feita para incluir os domínios da CSP de *P. falciparum*, incluindo os linfócitos T CD4+ e CD8+, epítomos de célula auxiliar T dentre outros, produzindo assim uma célula multivalente (Seth et al. 2017). Métodos utilizando o esporozoítio atenuado como um todo também estão em desenvolvimento, que se baseiam em entregar de forma intravenosa um esporozoítio atenuado por radiação, metabolicamente ativo e não replicante (Seder et al. 2013). Uma outra vacina em desenvolvimento utiliza como alvo um epítopo produzido pelo intestino do mosquito, a alanil aminopeptidase 1 (AnAPN1) de *Anopheles*. Essa vacina visa bloquear a transmissão do parasito afetando epítomos chave da AnAPN1 impedindo assim que o paciente desenvolva a doença (Armistead et al. 2014; Bender et al. 2021; Laurens 2021).

Diversos são os esforços para a produção de uma vacina eficiente e com baixos efeitos colaterais contra a malária, mas ainda precisam de muitos estudos para esse se tornar o primeiro e mais efetivo método de combate à doença. Além disso, o fato das vacinas atuais serem mais eficientes em crianças apenas reforça a necessidade de investimento na pesquisa de fármacos/quimioterápicos para tratar os já acometidos pela doença.

3. Desenvolvimento de fármacos

A pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos é um processo longo e altamente custoso. O processo desde a descoberta de algum composto até a comercialização do mesmo tem uma duração média de 13 anos e um custo de investimento estimado em 2,6 bilhões de dólares (Rao 2020; Wouters, McKee, and Luyten 2020; DiMasi, Grabowski, and Hansen 2016). Esse nível de investimento tanto financeiro, quanto de tempo resulta em fármacos chegando no mercado com preços exorbitantes, alcançando valores como 2,1 milhões de dólares por paciente (Cutler 2020; Avorn 2015; Annett 2021).

A P&D pode ser dividida em quatro etapas, a descoberta do fármaco, o pré-clínico, o estágio clínico, e a etapa regulatória. A etapa da descoberta, é a parte do projeto que define o desenho experimental, por meio da definição da doença, do alvo e da identificação de compostos ativos promissores previamente testados *in vitro* (*hits*). Os compostos são então levados para a próxima etapa, o *hit-to-lead*, no qual são realizados ensaios experimentais em modelos animais para elucidar seu comportamento no organismo. Os compostos definidos como mais promissores são escolhidos para a etapa de *lead optimization*, que procura otimizar a estrutura molecular com o intuito de melhorar sua eficácia, seletividade e propriedades farmacocinéticas, transformando-os em *lead* ou compostos líderes. Os compostos líderes serão então testados com estudos clínicos, iniciando a fase de descoberta de candidatos a fármacos (Bleicher et al. 2003; Holenz and Stoy 2019; Katsuno et al. 2015; Keseru and Makara 2006).

3.1. Desenvolvimento e planejamento de fármacos auxiliado por computação

O alto investimento de recursos que demanda a P&D alavancou a necessidade do emprego de outras metodologias, como a exemplo o planejamento de fármaco auxiliado por computador (CADD). As diversas técnicas de CADD são utilizadas para lidar com a massiva quantidade de dados disponível, uma vez que o manejo desses dados acaba se tornando tão importante quanto a própria produção deles (Akalin 2006). Estas ferramentas se tornaram então essenciais para o planejamento e análise de dados, biológicos, químicos ou físicos, que resulta em uma maior eficiência no processo de desenvolvimento de fármacos, além de uma redução de custo e aumento na taxa de sucesso da P&D (Andrade et al. 2019; Drewry et al. 2019; Bruno J. Neves et al. 2018; Xu and Hagler 2002; Macalino et al. 2015).

CADD pode ser dividido em duas principais vertentes, o planejamento de fármacos baseado na estrutura (SBDD), que é um estudo de fármacos baseado nas informações estruturais de um alvo macromolecular, e o planejamento de fármacos baseadas no ligante (LBDD), que é um estudo de novos candidatos a fármacos partindo da análise de outros ligantes com atividade biológica definida experimentalmente (Baig et al. 2016; Yang et al. 2019; Macalino et al. 2015). Essas duas abordagens, combinadas ou utilizadas individualmente, podem ser

utilizadas como filtro em uma triagem virtual que permite priorizar *hits* a partir de bancos de dados (Braga et al. 2014).

O SBDD pode ser utilizado quando a molécula alvo já possui a estrutura 3D definida, seja ela obtida por métodos experimentais como cristalografia eletrônica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear ou microscopia eletrônica, ou por métodos computacionais, como é o caso da modelagem tridimensional de proteínas. A estratégia SBDD mais utilizada para triagem virtual é o *docking* molecular, no qual compostos são ligados a um sítio de ligação (que pode ter sido predito experimentalmente ou por métodos computacionais) e o resultado é ranqueado de acordo com a afinidade de ligação predita pelo programa (Batool, Ahmad, and Choi 2019; Callaway 2020).

3.1.1. Predição da estrutura tridimensional

O crescimento de dados referentes a estruturas 3D possibilitou o surgimento de métodos computacionais de predição estrutural. Os métodos, em geral, se baseiam em três tipos, a predição por homologia, baseada no fundamento de que membros de uma mesma família proteica possuem uma similaridade estrutural (Waterhouse et al. 2018), predição por *threading* ou enovelamento, que é baseada na sequência de aminoácidos consenso que carrega consigo um padrão estrutural (Zhang 2008), e *ab initio*, que é uma abordagem por meio de *machine learning* sem utilização de perfis ou modelos para predição (Varadi et al. 2022). De maneira geral, atualmente pode se separar em dois grandes grupos, os que não utilizam estruturas moldes, que incluem a predição *ab initio* e predição *de novo*, e métodos baseados em estrutura molde, que incluem métodos de homologia e *threading*.

Modelagem por homologia se tornou uma importante técnica de biologia estrutural pela sua capacidade de diminuir a distância entre a sequência conhecida e as estruturas determinada experimentalmente. O servidor SWISS-MODEL foi um pioneiro no ramo de modelagem automatizada. O servidor utiliza a sequência de aminoácido que foi enviado pelo usuário para assim inferir sua estequiometria e sua estrutura em geral baseado na homologia com modelos, selecionados a partir de uma análise previa de similaridade sequencial (Waterhouse et al. 2018). Outro método de modelagem por homologia pode ser observado no servidor I-TASSER, no qual se baseia na similaridade com a estrutura secundária da proteína. A sequência alvo é primeiramente encadeada (*threading*) com a livreria estrutural do PDB para procurar por similaridades sequenciais (no mínimo 70% de similaridade). O fragmento contínuo é então removido do anelamento e é utilizado para ser remontado por meio da modelagem *ab initio* (Zhang 2008).

De maneira geral, inteligência artificial (IA) se refere a capacidade de uma máquina para executar tarefas em resposta a uma variedade de condições. A IA pode ser subdividida em dois subgrupos, o aprendizado de máquina, que se baseia em algoritmos capazes de aprender com os dados fornecidos a ele e o *Deep Learning*, que se baseia em aprendizado utilizando redes neurais que

aprendem e se adaptam com os dados (John McCarthy and Patrick J. Hayes 2008; Lavecchia 2015; Mak and Pichika 2019).

Existem diversos algoritmos de predições estruturais que utilizam AI. O servidor AlphaFold, por exemplo, utiliza uma abordagem de aprendizado de máquina que incorpora conhecimentos biológicos e físicos sobre a estrutura da proteína, alavancando um alinhamento multi sequencial, no design do algoritmo de *Deep Learning* e *ab initio* (Tunyasuvunakool et al. 2021; Jumper et al. 2021). Outro servidor que também utiliza métodos de *Deep Learning* é o trRosetta, que utiliza redes neurais para prever a geometria dos inter-resíduos, incluindo distância e orientação. As geometrias preditas são utilizadas como guias para a predição estrutural baseada na direta minimização de energia (Du et al. 2021).

3.1.2. Docking molecular

Como dito anteriormente, o docking molecular é o método SBDD mais utilizado na triagem virtual de novos compostos e amplamente utilizado na otimização de hits com o intuito de encontrar análogos dos *hits* que apresentem uma melhor interação intermolecular e uma maior afinidade com o alvo (Gagic et al. 2020; Prieto-Martínez et al. 2019; Schneider and Böhm 2002; Torres et al. 2019). Essa estratégia se baseia em uma predição de conformação (pose) e *scores* de afinidade de ligação de pequenas moléculas a um sítio de ligação predito. A função de pontuação ordena os melhores *scores* das poses amostradas mostrando quais delas demonstraram maior afinidade com a macromolécula alvo. (Morris and Lim-Wilby 2008; Torres et al. 2019; Berman 2000; Ferreira et al. 2015; Paulsen and Anderson 2009).

Os algoritmos de busca geralmente se resumem a três categorias, sistemático, estocástico e determinístico. Em sua maioria, a macromolécula é tratado como um corpo rígido enquanto o ligante é flexível. As funções de pontuação são categorizadas em três grupos, sendo eles funções baseadas em campo de força, funções empíricas, funções baseadas em aprendizado de máquina e funções baseadas no conhecimento. O resultado que elas trazem nomeia a pose com o menor score de energia como o modo de ligação preferível (Guedes, de Magalhães, and Dardenne 2014; Saikia and Bordoloi 2019; Bruno Junior Neves et al. 2021)

O *docking* de fato traz muitas vantagens para a triagem virtual de moléculas, porém o método carrega em si algumas limitações que podem comprometer os resultados. As mais importantes falhas estão relacionadas a baixa resolução da estrutura 3D da macromolécula, escolha inadequada da conformação do bioativo dos ligantes e da macromolécula, configuração incorreta das moléculas de água e estados de protonação dos resíduos de aminoácidos, baixa correlação entre função de score e afinidade experimental e a ausência de uma avaliação de enriquecimento usando um *dataset* e um descritor (Bruno Junior Neves et al. 2021)

II. Justificativa

A malária causa altos níveis de morbidade e mortalidade em seres humanos em todo o mundo. De acordo com a OMS, mais de meio milhão de pessoas morrem desta doença a cada ano. Apesar dos esforços contínuos no desenvolvimento de vacinas, a prevenção da malária é difícil e nenhum fármaco é universalmente eficaz. Tendo em vista a crescente necessidade de buscar novos e mais eficientes alvos para fármacos é premente a necessidade da aplicação de novos métodos de estudo de proteínas para otimizar esse processo e, como discutido anteriormente, a bioinformática traz um novo paradigma para essas análises, otimizando estudos com predições de nível experimental, realizadas de maneira rápida e em grande escala, otimizando o processo de análises de milhares de dados.

III. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral um estudo mais aprofundado das dinaminas de *Plasmodium falciparum* e seus possíveis inibidores por meio de uma abordagem computacional. Além disso, identificar e selecionar potenciais moléculas inibidoras dessas dinaminas, utilizando ferramentas computacionais como análise de similaridade estrutural e docking molecular, com base nas estruturas preditas dessas dinaminas.

1. Objetivos Específicos

1. Análise *in silico* das sequências primárias e predição das estruturas tridimensionais das dinaminas de *Plasmodium falciparum*;
2. Predição e seleção de sítios de ligação;
3. Seleção de potenciais compostos inibidores, baseado em análise de similaridade estrutural a inibidores conhecidos de dinaminas, e *docking* molecular, para seleção de potenciais inibidores das dinaminas PfDYN1 e PfDYN2.

2. Desenho experimental

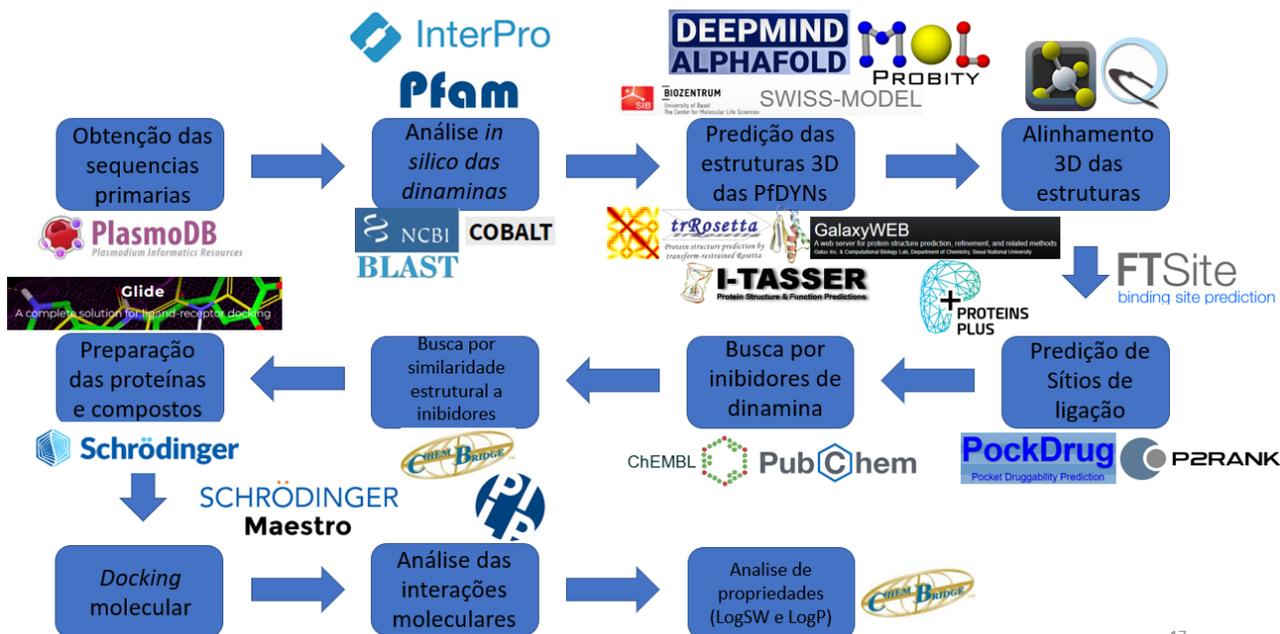


Figura 9 Esquema ilustrativo do desenho experimental.

17

IV. Metodologia

1. Obtenção das sequências primárias das dinaminas de *Plasmodium falciparum*

Utilizando o banco de dados PlasmODB (<https://plasmodb.org/plasmo/app/>) (Roos et al. 2001; Bahl 2003), foram identificadas as três proteínas relacionadas a dinamina no *P. falciparum*, PfDYN1 (Li et al. 2004), PfDYN2 (Charneau et al. 2007) e PfDYN3 (M. Zhang et al. 2018; Verhoef, Meissner, and Kooij 2021). Suas sequências de aminoácidos foram extraídas do banco de dados UniProt para serem usadas nos servidores Swiss-Model, AlphaFold, trRosetta e I-TASSER. A sequência ID no UniProt das dinaminas são PfDYN1 (Q8IHR4), PfDYN2 (Q8IJ32) e PfDYN3 (Q8I5M3).

2. Análise *in silico* das dinaminas

A partir das sequências primárias e a obtenção dos ID no UniProt, foram utilizados alguns servidores e programas para determinação da estrutura tridimensional, de possíveis funções e sua caracterização de maneira geral, conforme descrito a seguir.

Os domínios, sítios conservados e família proteica foram analisados por meio dos bancos de dados Pfam (Mistry et al. 2021) (<https://pfam.xfam.org/>) e o InterPro (Blum et al. 2021) (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Para análise de similaridade sequencial e alinhamento entre proteínas foi utilizada a ferramenta de procura básica de alinhamento local (BLAST) (Altschul et al. 1990) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a partir da submissão do ID das dinaminas por alinhamento múltiplo das proteínas. A partir do servidor BLASTp submeteu-se a sequência primária de cada proteína e identificou-se proteínas homólogas.

Os sítios conservados foram analisados utilizando o programa COBALT (Papadopoulos and Agarwala 2007) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi). A partir do servidor Cobalt submetemos a sequência primária das proteínas e identificamos domínios conservados. A sequência FASTA da *dynammin-like* humana de PDB ID 4BEJ (Fröhlich et al. 2013) serviu de comparação.

3. Predição das estruturas tridimensionais das PfDYNs

A modelagem 3D foi realizada utilizando quatro servidores diferentes, por meio da submissão do arquivo FASTA das três DLPs de *P. falciparum*, afim de comparar esses modelos entre eles, SWISS-MODEL (Guex and Peitsch 1997), I-Tasser (Zhang 2008), trRosetta (Du et al. 2021) e AlphaFold (Jumper et al. 2021).

O servidor SWISS-MODEL realiza a modelagem utilizando como molde a estrutura 3D de uma proteína homóloga, a partir da sequência primária, no qual ele faz uma comparação automatizada para predizer o modelo (Guex, Peitsch, and Schwede 2009; Waterhouse et al. 2018; Bienert et al. 2017; Studer et al. 2020)

O servidor trRosetta é um servidor de predição 3D que utiliza *deep learning* e o algoritmo Rosetta. Rosetta é um algoritmo capaz de predizer uma estrutura 3D com o método *de novo*, esse método envolve a união de pequenos fragmentos de proteínas já conhecidos utilizando a estratégia Monte Carlo, que se baseia em repetidas amostragens aleatórias para obter um resultado positivo, para obter conformações similares ao que seria encontrado em seu estado nativo. O servidor também utiliza informação de estruturas 3D homólogas de cristalizações para um *input* adicional (Du et al. 2021; Su et al. 2021; Yang et al. 2020; Rohl et al. 2004).

O servidor I-TASSER é uma plataforma integrada para predição automatizada da estrutura e função da proteína baseada no paradigma sequência-estrutura-função. O servidor utiliza a sequência de aminoácidos enviada pelo usuário e gera um modelo 3D que então é comparado com um banco de dados de *foldings* (enovelamento) de outras estruturas 3D do *PDB* comparando a densidade de agrupamento e significância consensual de múltiplos modelos (Roy, Kucukural, and Zhang 2010; Yang and Zhang 2015; Yang et al. 2015; Y. Zhang 2008).

O Alpha Fold é um servidor baseado em *ab initio* e *deep learning*, desenvolvido pela DeepMind e a EMBL-EBI, que disponibiliza modelos 3D de proteínas que são gerados a partir de alinhamentos multi-sequenciais e *deep learning* (Varadi et al. 2022; Jumper et al. 2021).

Os modelos gerados por programas que fazem análise de homologia (SWISS-MODEL, ITASSER e trRosetta) utilizaram em comum como molde a cristalografia presente no banco de dados do *PDB* da *dynamamin-like* humana DNML1 (*PDB* ID: 4BEJ (Fröhlich et al. 2013)). De fato, DNML1 possui 70% de cobertura e 38,1% de identidade sequencial com a PfDYN1 e 84% de cobertura e 40,67% de identidade sequencial com a PfDYN2 (Guex and Peitsch 1997). É a maior estrutura de DLP dentre as estruturas homólogas às três de *P. falciparum*. Os modelos selecionados para cada servidor foram os que apresentaram os melhores resultados na predição estrutural. Em relação ao servidor AlphaFold, ele disponibiliza os modelos de predição 3D das proteínas de *P. falciparum* Dyn1, Dyn2 e Dyn3 com alto grau de confiabilidade estrutural, ou seja, um *per-residue confidence score* (pLDDT) > 80, sendo 100 o maior valor possível e 0 o menor (Jumper et al. 2021).

Todos os modelos então foram refinados utilizando a plataforma GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) (Ko et al. 2012; Shin et al. 2014). O servidor realiza para o refinamento o anelamento conformacional espacial, uma otimização das conformações de regiões locais não confiáveis. Para verificar a qualidade estatística dos modelos 3D, todos tiveram sua qualidade geométrica dos modelos avaliada utilizando o servidor Molprobit (<http://molprobit.biochem.duke.edu/>), e avaliou-se os parâmetros Ramachandran *favored* (porcentagem de aminoácidos com conformações favoráveis), Molprobit *score* (combina todas as pontuações geométricas em um único valor de qualidade que reflete a resolução cristalográfica do modelo) e *clash score* (número de colisões a cada 1000 átomos) que determina a qualidade de um modelo estrutural por meio de parâmetros estruturais da proteína que avaliam a geometria da proteína e representam uma proteína cristalizada (Davis et al. 2007; Williams et al. 2017)

4. Visualização e Alinhamento 3D das estruturas

Foram utilizados dois programas para realizar a visualização das estruturas originadas das predições, o UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004; Huang et al. 2014) e o PyMol (Schrödinger 2015). Com esses programas, utilizando os plugins “MatchMaker” no Chimera e “Alignment” no PyMol, foi possível realizar o alinhamento das estruturas 3D para comparar a similaridade com a *dynamamin-like* humana *PDB* ID 4BEJ (Fröhlich et al. 2013) e comparar as estruturas preditas umas com as outras.

O programa GalaxyHomomer (Baek et al. 2017) (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=HOMOMER>) foi utilizado para prever a estrutura 3D do dímero da estrutura predita para as PfDYN1 e PfDYN2 a fim de comparar visualmente, utilizando Chimera e PyMol, com as estruturas cristalizadas de outras dinaminas, auxiliando na predição dos mais prováveis sítios ativos e para auxiliar na predição do seu comportamento e organização molecular *in vivo*.

5. Predição de sítios de ligação a ligantes

A predição de sítios foi realizada utilizando quatro servidores: FTSite (Kozakov et al. 2015; Ngan et al. 2012) (<https://FTSite.bu.edu/>), DoGSiteScorer (Volkamer et al. 2012) (<https://proteins.plus/#dogsite>), PockDrug (Borrel et al. 2015; Hussein et al. 2015) (<http://pockdrug.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/index.py?page=home>) e PrankWeb (Jendele et al. 2019; Jakubec et al. 2022) (<https://prankweb.cz/>) por meio da submissão do melhor modelo 3D obtido.

O FTSite utiliza um algoritmo de mapeamento computacional que identifica regiões em macromoléculas onde é mais provável que ocorra uma ligação com ligantes testando sondas em diferentes posições e observando qual o mais eficiente energeticamente. A premissa é que o sítio de ligação também é capaz de ligar pequenas moléculas orgânicas de diversos formatos e polaridades, como já demonstrado em outros experimentos (Hajduk, Huth, and Fesik 2005; Mattos and Ringe 1996). Regiões onde houver agrupamentos consensuais de sondas são identificados como possíveis sítios e ranqueados baseado no número de contatos. Quanto mais contatos, mais bem ranqueado e conseqüentemente, mais provavelmente são um sítio ativo da proteína (Ngan et al. 2012; Brenke et al. 2009; Kozakov et al. 2015).

DoGSiteScorer utiliza um algoritmo baseado na estrutura da proteína para prever seus sítios de ligação baseados na Diferenças de Gaussianas (DoG) que origina do processamento de imagens. DoGSite divide a proteína em *subpockets*, permitindo uma refinada descrição da topologia do sítio ativo. Subseqüentemente, ele analisa a geometria e as propriedades físico-químicas desses pockets permitindo assim uma predição da sua drogabilidade com a ajuda da “support vector machine” (Volkamer, Kuhn, Rippmann, et al. 2012; Volkamer, Kuhn, Grombacher, et al. 2012; Volkamer et al. 2010).

PockDrug utiliza diferentes métodos de predição de pockets para realizar sua predição, sendo eles métodos de proximidade, comparando com ligantes cocrystalizados ou utilizando métodos de estimações do DoGSite ou fpocket. O programa retém a melhor combinação de três propriedades que impactam a drogabilidade: geometria, hidrofobicidade e aromaticidade (Borrel et al. 2015).

PrankWeb serve de interface para o P2Ran, que é um moderno método de predição que utiliza de *machine learning* em suas predições de vizinhanças ligáveis a solventes na superfície da proteína. O programa simula a ligação de

diversos solventes na superfície da molécula analisada e a região que tem capacidade de ligar esses solventes são pontuadas. As regiões com altas pontuações são então agrupados para determinar as prováveis regiões de sítio de ligação onde ligantes podem interagir. O servidor consegue determinar sequencias conservadas e utiliza essa informação tanto na predição dos sítios como para auxiliar a visualização dos resultados (Krivák and Hoksza 2018; Jendele et al. 2019).

Os sítios preditos pelos quatro servidores foram comparados e utilizou-se os sítios *consensus*, comparando também com sítios conhecidos da literatura, para os cálculos de *docking*.

6. Seleção de inibidores conhecidos de dinaminas

Primeiro foram selecionadas moléculas presentes em estruturas cristalográficas de dinaminas homólogas armazenadas no *Protein Data Bank (PDB)* (rcsb.org) (Burley et al. 2021; Berman 2000) de dinaminas, sendo encontradas cinco moléculas: beta-D-glucopiranosose (BCG), ácido fosfometilfosfonico éster guanilato (GCP), guanosina-5'-difosfato (GDP), aminofosfonico ácido-guanilato éster (GNH) e tetraetileno glicol (PG4). Para compor o restante da biblioteca, utilizamos a base de dados ChEMBL (Gaulton et al. 2017; Davies et al. 2015) (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) (Davies et al. 2015; Gaulton et al. 2017), na qual oito classes de compostos já haviam sido testadas experimentalmente em dinaminas: *dynasore* (Macia et al. 2006) (ChEMBL1209885), *dyngo-4a* (McCluskey et al. 2013) (ChEMBL4071130), *dynole* (Hill et al. 2009) (ChEMBL483059), *iminodyn* (Hill et al. 2010) (ChEMBL1098764), *longChain/MitMAB* (Hill et al. 2004) (ChEMBL113150), *mdiv* (Li, Wang, and Wang 2016) (ChEMBL4594349), quinone (Shrader et al. 2011) (ChEMBL1812161) e *rhododyn* (Robertson et al. 2012) (ChEMBL2062734); e estruturas derivadas do GDP (ChEMBL384759), com isso gerou uma biblioteca contendo 192 compostos.

7. Seleção de compostos por análise de similaridade estrutural

A biblioteca para priorização de compostos foi gerada através de busca por similaridade estrutural aos inibidores na biblioteca comercial ChemBridge (<https://www.chembridge.com/>) que utiliza como método de procura “métricas de Similaridade”, que mensura quão similar uma molécula é em relação a outra baseado no coeficiente de Tanimoto. A recomendação do *site* é que para o resultado ser significativo a similaridade deve ser de no mínimo 40%. Portanto, selecionamos compostos com similaridade estrutural de 60% para *dynasore*; 60% para *dyngo-4a*; 60% para *dynole*; 60% para GDP; 70% para *iminodyn*; 40% para *longChain/MitMAB*; 75% para *mdiv*; 50% para quinona e 85% para

rhodadyn. Essas foram as porcentagens de mais alta similaridade para cada classe encontrada na biblioteca ChemBridge.

8. Preparação dos ligantes

A biblioteca de compostos foi preparada no programa Maestro (Schrödinger 2021c), usando a ferramenta LigPrep (Schrödinger 2021b), para a correta protonação e geração de confórmeros dos compostos em pH $8,0 \pm 0,5$, o pH ótimo de atividade enzimática.

9. Preparação dos *grids* para *docking*

Os grids para centrar os cálculos de *docking* foram baseados nos melhores sítios preditos dentre todos os programas de predição. As coordenadas dos sítios ativos utilizadas foram as mais similares aos conservados evolutivamente, para a PfDYN1 o centro de grid foi $x = -35.20 \text{ \AA}$, $y = -8.33 \text{ \AA}$, $z = 17.57 \text{ \AA}$ e para a PfDYN2 foi $x = 29.36 \text{ \AA}$, $y = 18.19 \text{ \AA}$, $z = -16.84 \text{ \AA}$, todos com tamanho de 20 \AA e usando as configurações padrões do servidor. Para isso, foi utilizada a ferramenta *Receptor Grid Generation* do software Maestro.

Tabela 1 Coordenadas dos grids utilizados para o experimento de docking

	x	y	z
PfDYN1	-35.2580068862 Å	-8.3383581746 Å	17.5738044127 Å
PfDYN2	11.86000000 Å	0.6900000000000001 Å	-34.340000000 Å

10. Preparação das proteínas

As proteínas foram preparadas no programa Glide, utilizando a ferramenta *Protein Preparation Wizard* (Madhavi Sastry et al. 2013; Epik and Schrödinger, n.d.) em pH de $8,0 \pm 0,5$ (pH ótimo de atividade das *PfDYNs*), seguindo o protocolo de adição de átomos de hidrogênio e minimização de energia do sistema, utilizando campo de força OPLS-2005 (Hayes, Stein, and Weiser 2004).

11. Priorização de compostos baseada em *docking* molecular

A priorização de compostos baseada em *docking* da biblioteca comercial ChemBridge contra os modelos 3D da DYN1 e DYN2, foi realizada, de forma independente, utilizando o programa Glide Maestro no modo *extra precision* (Friesner et al. 2006; Schrödinger 2021c).

12. Docking Molecular

O *docking* molecular foi realizado utilizando o programa Glide (Friesner et al. 2006; Halgren et al. 2004; Friesner et al. 2004; Schrödinger 2021a) do software Maestro (Schrödinger Release 2022-3), utilizando o *grid* determinado nas etapas anteriores e utilizando as configurações padrões do programa com o módulo Glide XP (*extra precision Glide*).

O Glide XP constitui uma função de pontuação, que se caracteriza em dois fatores, a aplicação de uma grande penalidade de solvatação para ambos os ligantes e proteínas polares e grupos carregados em casos apropriados, e a identificação do motivo estrutural que provê excepcionalmente grandes contribuições para melhorar a afinidade da ligação, e um melhorado algoritmo de amostragem, uma vez que para garantir uma acurada penalidade de solvatação e do reconhecimento dos motivos estruturais requer uma amostragem de alta performance (Friesner et al. 2006).

13. Análise das Interações Moleculares

Para analisar as ligações e interações entre as moléculas ancoradas e as dinaminas foram utilizados dois programas, o PLIP (*Protein Ligand Interaction Profiler*) (Salentin et al. 2015; Adasme et al. 2021) e a ferramenta do programa Maestro “*Ligand Interaction Diagram*” (Schrödinger Release 2022-1).

V. Resultados

1. Análise *in silico* Das Dinaminas

Para análise de domínios estruturais proteicos, dos sítios conservados evolutivamente e de família proteica das 3 DLPs de *P. falciparum*, foram utilizados os bancos de dados Pfam (Finn et al. 2016; Mistry et al. 2021) (<https://pfam.xfam.org/>). Esse banco utiliza referências proteômicas do UniProt KB para classificar as sequências proteicas em famílias e domínios utilizando métodos de alinhamentos de sequência múltiplos (Sonnhammer, Eddy, and Durbin 1997; Finn et al. 2014; 2016; Mistry et al. 2021), e o InterPro (Blum et al. 2021) (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) que provê uma classificação de proteínas em famílias, identifica domínios funcionalmente importantes e sítios conservados, além de fornecer uma descrição da proteína em termos de *Gene Ontology* (Blum et al. 2021). Ambos os servidores identificaram essas proteínas como pertencentes à família das dinaminas, corroborando com a análise de Gardner et al. e Melatti et al. que apontavam a presença de três dinaminas no

Plasmodium assim como em outros organismos dentro do filo Apicomplexa possuem (Gardner et al. 2002; Melatti et al. 2019).

Essas análises permitiram verificar que o domínio mais conservado entre as três dinaminas é a região da GTPase (Dynamamin_N). Como o domínio médio (Dynamamin_M) e o domínio efetor de GTPase (GED) não foram identificados na PfDYN3, sendo apenas descritos pelos servidores como uma região de desordem, essa dinamina não apresenta uma característica estrutural comum entre as dinaminas descritas. A PfDYN 1 e 2 são similares estruturalmente sendo principalmente diferentes na região C terminal do domínio médio, onde na PfDYN1 possui uma estrutura a mais, e no domínio GED, que é uma região menos conservada entre as dinaminas e que deve ser responsável pelas especificidades dessas duas dinaminas.

A



B

Source	Domain	Start	End	Source	Domain	Start	End	Source	Domain	Start	End
Pfam	Dynamamin_N	33	213	Pfam	Dynamamin_N	29	210	Pfam	Dynamamin_N	61	207
Pfam	Dynamamin_M	221	514	Pfam	Dynamamin_M	219	510	coiled_coil	n/a	342	376
disorder	n/a	514	563	disorder	n/a	529	540	low_complexity	n/a	351	362
low_complexity	n/a	514	538	disorder	n/a	546	549	low_complexity	n/a	476	498
Pfam	GED	615	706	disorder	n/a	572	573	disorder	n/a	478	479
disorder	n/a	679	681	disorder	n/a	579	584	disorder	n/a	486	507
disorder	n/a	683	684	low_complexity	n/a	601	626	disorder	n/a	570	571
disorder	n/a	686	690	Pfam	GED	614	704	low_complexity	n/a	655	689
coiled_coil	n/a	686	706	coiled_coil	n/a	684	704	disorder	n/a	660	691
disorder	n/a	728	837					disorder	n/a	1055	1060
low_complexity	n/a	776	789								

Figura 10 Organização estrutural das dinaminas de *Plasmodium falciparum* obtida utilizando o servidor Pfam. A: Esquema das estruturas primárias com os domínios identificados; B: O Posicionamento dos domínios identificados nas sequências de aminoácidos. GED, *GTPase effector domain*.

Para análise de similaridade estrutural e alinhamento entre proteínas foi utilizada a ferramenta de procura básica de alinhamento local (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que tem como função primária encontrar regiões de similaridade local entre sequências de nucleotídeo ou de proteínas conhecidas comparando com um banco de dados e pode ser utilizado para inferir relações funcionais e evolutivas entre sequências conhecidas assim como ajudar na identificação de membros da mesma família gênica, permitindo assim a criação de uma árvore evolutiva entre elas a fim de estabelecer uma relação mais facilmente visível de proximidade evolutiva (Altschul et al. 1990; Johnson et al. 2008; Camacho et al. 2009; Madden, Tatusov, and Zhang 1996). Assim proteínas homólogas às DPLs de *P. falciparum* foram identificadas por meio do servidor BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al. 1990; Johnson et al. 2008; Boratyn et al. 2012) empregando o banco de dados

“refseq_protein”. Foram selecionadas três proteínas de três organismos distintos, *Homo sapiens*, *Toxoplasma gondii* e *Saccharomyces cerevisiae*, para os quais suas DLPs já foram descritas. Em especial, o organismo *T. gondii* foi selecionado por pertencer também ao filo Apicomplexa e servir de modelo para os estudos desse grupo taxonômico. A partir das 12 sequências de aminoácidos, foi realizado um alinhamento por ClustalW e assim uma análise filogenética baseada nas suas similaridades sequenciais (Figura 11). Embora as 3 dinaminas de *P. falciparum* sejam DLPs, elas foram distribuídas em *clusters* diferentes na árvore filogenética. PfDYN1 está agrupada com TgDRPB. PfDYN2 está mais próxima a TgDRPA. PfDYN3 está agrupada com a TgDRPC depositada com o nome de sintetase arginil-tRNA no banco de dados. Portanto, as 3 DLPs de *P. falciparum* devem possuir funções similares das 3 DLPs de *T. gondii*.

A fim de corroborar com o estudo filogenético, uma análise dos sítios conservados foi realizada com o programa COBALT (Papadopoulos and Agarwala 2007) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi). É um programa de alinhamento baseado em restrição utilizando banco de dados, como o banco de dados de domínios conservados (CDD) e o banco de dados de *protein-motif* detectando similaridades sequenciais com o arquivo fasta ou sequência proteica que deseja ser comparado. Depois o programa junta as informações em um alinhamento múltiplo progressivo de alta qualidade (Papadopoulos and Agarwala 2007).

Dois alinhamentos foram feitos para analisar a similaridade estrutural das proteínas homólogas. O primeiro foi feito a partir das sequências primárias das três DLPs de *P. falciparum* com as nove DLPs homólogas selecionadas (Figura 12A). A segunda foi feita para comparar as três DLPs com a *dynamin-like* humana DNML1 com código *PDB* ID 4BEJ (Fröhlich et al. 2013) que é a DLP humana de maior similaridade em relação às DLPs de *P. falciparum* (Figura 12B). Ademais, DNML1 humana possui uma estrutura 3D que foi utilizada como modelo para predição da estrutura tridimensional das proteínas de *P. falciparum*.

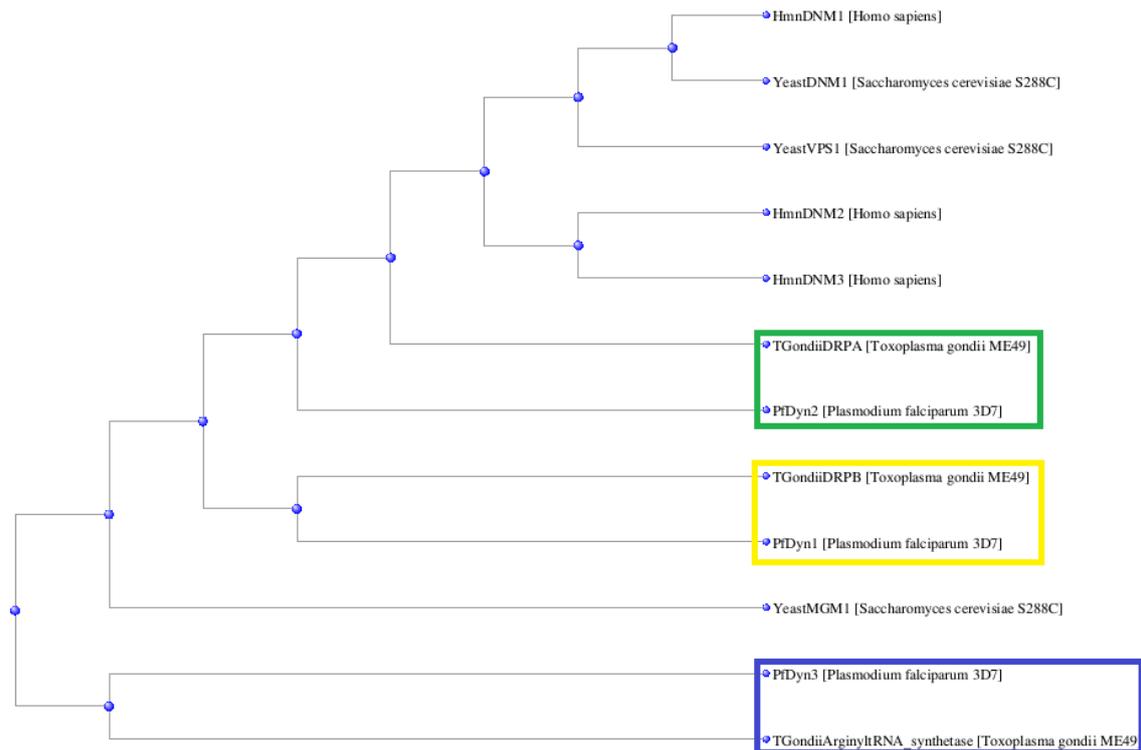


Figura 11 A árvore filogenética agrupando as proteínas que possuem maiores similaridades na estrutura primária, permitindo assim identificar quais proteínas são mais próximas evolutivamente e, portanto, podem exercer funções similares em seus respectivos organismos, como pode ser observado a PfDYN1 é similar a TgDRPB (quadrado amarelo), PfDYN2 é similar a TgDRPA (quadrado verde) e a PfDYN3 é mais similar a DRPC (quadrado azul).

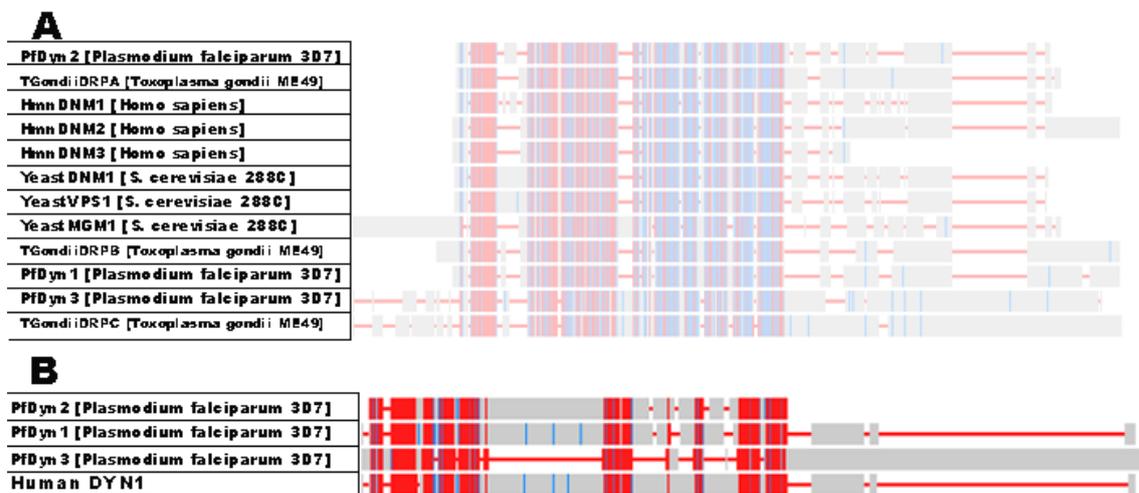


Figura 12 Alinhamento entre dinaminas homólogas. Resultado obtido do alinhamento realizado no BLASTp utilizando o programa COBALT, regiões coloridas em vermelho são regiões mais conservadas e regiões azuis são regiões menos conservadas. As regiões demonstradas como mais conservadas foram as referentes ao domínio N e o domínio médio, sendo o efetor o mais destoante A: Alinhamento de todas as sequências primárias alinhadas pelo BLAST que foram utilizadas para gerar a árvore filogenética. B: Alinhamento das dinaminas de *P. falciparum* com a *dynamina-like* humana DNML1 de código PDB 4BEJ (Fröhlich et al. 2013), proteína humana que possui maior grau de similaridade com as proteínas de *Plasmodium falciparum*.

Existe uma similaridade entre as sequências primárias e evolutivamente os domínios de dinamina são regiões bem conservadas, mas possuem algumas diferenças pontuais que podem determinar diferenças estruturais e de funções.

Essas informações explicam o resultado obtido na árvore filogenética e foram úteis para as etapas seguintes de predição estrutural para a escolha dos melhores modelos.

2. Predição das Estruturas Tridimensionais das PfDYNs

A modelagem 3D foi realizada utilizando quatro servidores por meio da submissão da sequência FASTA das três dinaminas de *P. falciparum*, de forma independente. Os servidores utilizados foram: SWISS-MODEL (Guex, Peitsch, and Schwede 2009) (<https://swissmodel.expasy.org/>), AlphaFold (Varadi et al. 2022) (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>), trRosetta (Du et al. 2021) (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>) e I-TASSER (Yang and Zhang 2015) (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>).

Utilizando o servidor SWISS-MODEL e I-TASSER, obtivemos um modelo 3D a partir de modelagem por homologia, o primeiro baseado na sequência primária e o segundo na estrutura terciária, sendo que o I-TASSER realiza isso a partir do método de *threading (folding)* e selecionamos como molde a estrutura com maior identidade sequencial e cobertura (Waterhouse et al. 2018; Yang et al. 2015).

A partir das sequências primárias, obtivemos os modelos 3D a partir dos servidores AlphaFold e trRosetta, pelo método *ab initio* e *Deep Learning* e pelo servidor trRosetta que utiliza *Deep Learning* por meio de redes neurais. Selecionamos os melhores modelos obtidos a partir dos parâmetros *per-residue confidence score* (pLDDT) do AlphaFold e *TM-score* do trRosetta (Jumper et al. 2021; Du et al. 2021).

Após os modelos serem gerados, todos foram refinados utilizando o servidor GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>). Todos tiveram sua qualidade geométrica dos modelos avaliada utilizando o servidor MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).

Os melhores modelos 3D gerados para as três DLPs foram através do servidor AlphaFold com refinamento do GalaxyRefine (Heo, Park, and Seok 2013; Lee, Heo, and Seok 2016), uma vez que apresentam as melhores pontuações do *Molprobity score* (o menor valor), sendo a resolução do modelo gerado da PfDYN1 1,1 Å, o da PfDYN2 1,15 Å e a da PfDYN3 1,11 Å, sendo esses os melhores resultados como um todo quando comparado com os outros modelos, sendo que o modelo que chegou mais próximo em questão de qualidade de resolução foi o SWISS-MODEL com mais de 1,4 Å (Figura 13). Todos os outros modelos tiveram ao menos um dos parâmetros de qualidade considerada mediana ou ruim. Os modelos gerados pelo I-TASSER, para as três DLPs, foram os piores apresentando ao menos um parâmetro em cada modelo considerado ruim e, dentre todos os modelos, apenas um parâmetro do modelo gerado para a PfDYN2 foi considerado bom (Tabela 2).

Tabela 2 Parâmetros estatísticos de qualidade dos modelos gerados das dinaminas, as cores nas colunas são utilizadas pelo servidor MolProbity para representar a qualidade desses resultados, sendo verde um bom valor, amarelo um valor que exige cautela e vermelho um resultado que exige atenção. Não foi possível gerar um modelo trRosetta do PfDYN3 por limitação de tamanho máximo de uma proteína para poder gerar o modelo (<1000 aminoácidos). Os números em parênteses são os percentis que aquele número representa, sendo que percentis maiores que 66 não considerados bons, entre 66 e 33 o valor exige cautela, e abaixo de 33 é um resultado que exige atenção.

PfDYN1	Clash Score	Rama Favored	MolProbity score
AlphaFold refinado	3,1 (98 ^o)	99,5%	1,10 (100 ^o)
I-TASSER refinado	23,1 (24 ^o)	88,7%	2,43 (51 ^o)
SWISSMODEL refinado	4,2 (96 ^o)	96,5%	1,42 (97 ^o)
trRosetta refinado	5,9 (91 ^o)	97,4%	1,44 (96 ^o)
PfDYN2	Clash Score	Rama Favored	MolProbity score
AlphaFold refinado	3,73 (96 ^o)	98,7%	1,16 (99 ^o)
I-TASSER refinado	10,4 (69 ^o)	93,3%	1,97 (77 ^o)
SWISSMODEL refinado	6,4 (89 ^o)	96,4%	1,59 (93 ^o)
trRosetta refinado	9,89 (72 ^o)	96,32%	1,76 (87 ^o)
PfDYN3	Clash Score	Rama Favored	MolProbity score
AlphaFold refinado	3,17 (97 ^o)	98,8%	1,11 (100 ^o)
I-TASSER refinado	13,7 (55 ^o)	89,9%	2,28 (60 ^o)
SWISSMODEL refinado	12,6 (60 ^o)	95,2%	1,94 (79 ^o)

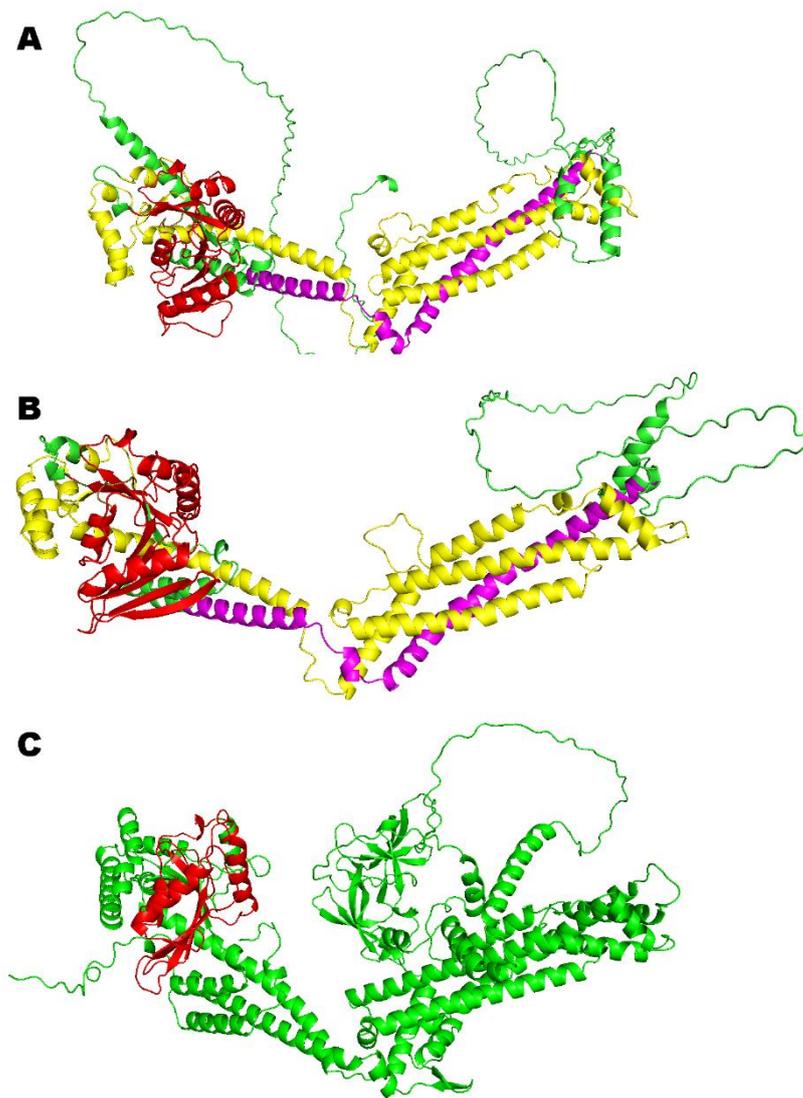


Figura 13 Estrutura tridimensional das dinaminas de *Plasmodium falciparum*, A: PfDYN1; B: PfDYN2; C: PfDYN3, preditas utilizando o servidor AlphaFold com refinamento do GalaxyRefine. Visualização gerada pelo programa de PyMol. Vermelho: GTPase; Amarelo: Domínio médio; Magenta: GED; Verde: Região de desordem, baixa complexidade ou superhélices.

3. Análise Comparativa das Estruturas Tridimensionais Preditas das PfDYN1 e PfDYN2

Por meio do alinhamento molecular foi possível comparar as estruturas das 3 DLPs de *P. falciparum* com a DNML1 humana com PDB ID 4BEJ, que teve sua estrutura predita por utilizando métodos de cristalografia eletrônica (Fröhlich et al. 2013). Esta análise de similaridade estrutural realizou-se pelos programas PyMol (Schrödinger 2015), utilizando o plugin “*Alignment*” e Chimera (Huang et al. 2014) utilizando o plugin “*MatchMaker*” (Figura 14). Os sítios ativos GTPásicos das proteínas da família dinamina, que corresponde aproximadamente aos 220 primeiros aminoácidos a partir da região N terminal, estão na mesma posição tridimensional uma vez que as dinaminas são evolutivamente conservadas (Faelber et al. 2011; Reubold et al. 2015; Ford, Jenni, and Nunnari 2011; Praefcke and McMahon 2004). Portanto os sítios ativos

das PfDYN1, PfDYN2 e PfDYN3 são esperados nessa região. De fato, a partir da sequência de resíduos de aminoácidos do domínio GTPase das 3 PfDYN, o alinhamento tridimensional predito mostrou um alto grau de superposição entre eles (Figura 14D).

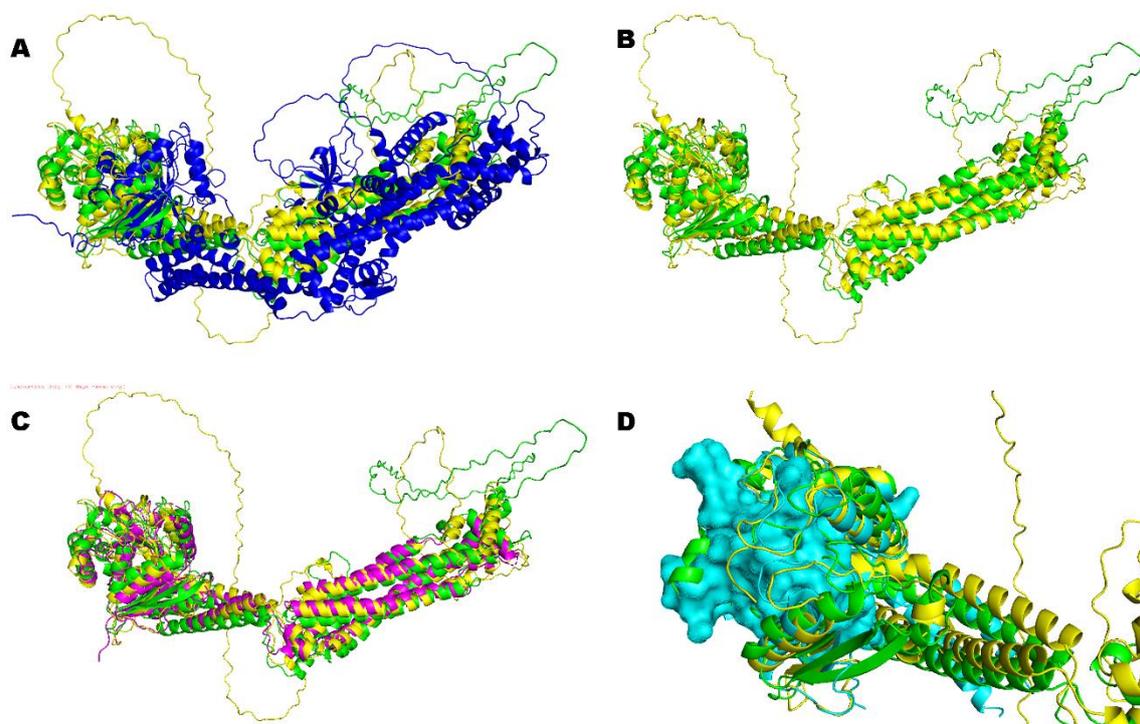


Figura 14 Alinhamento das estruturas tridimensionais preditas e de dinaminas humanas com estruturas previamente descritas por métodos de cristalografia. A: Alinhamento dos modelos das três dinaminas presentes no *P. falciparum* mostrando uma discrepância estrutural da dinamina 3; B: Alinhamento dos modelos das dinaminas 1 e 2 de *P. falciparum*; C: Alinhamento entre os modelos das PfDYN1 e 2 com a estrutura da *dynamin-like* humana 4BEJ (Fröhlich et al. 2013); D: Alinhamento entre os modelos das PfDYN1 e 2 com a estrutura da DNML1 humana (PDB ID: 3W6N (Kishida and Sugio 2013)) mostrando a região (cor ciano) onde se localiza o sítio ativo da HmDNML1 onde ocorre a GTPase. Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2; Azul escuro: PfDYN3; Magenta: *Dynamin-like* 4BEJ (Fröhlich et al. 2013); Ciano: HmDNML1 3W6N (Kishida and Sugio 2013).

Como as dinaminas e proteínas relacionadas à dinamina (DLPs) são grandes GTPases que podem formar oligômeros semelhantes a anéis (anel de dinamina), utilizou-se o programa GalaxyHomomer para prever a estrutura do homodímero a partir das estruturas das DLPs de *P. falciparum* preditas. Em seguida foi realizada uma análise comparativa com o homodímero da DNML1 humana 4BEJ (Fröhlich et al. 2013) por meio do programa PyMol e Chimera para prever possíveis regiões onde elas podem interagir (Figura 15). A partir desta etapa, a PfDYN3 foi desconsiderada das análises uma vez que seu tamanho estrutural é incompatível com os programas do Galaxy para predição de homômeros. Os programas de predição de sítio ativo, em geral, são apenas capazes de prever o sítio ativo em estruturas menores que 1000 aminoácidos, como dito anteriormente a PfDYN3 possui 1060 aminoácidos em sua composição, impossibilitando o uso dos programas. Outro motivo para a exclusão das análises dessa proteína foram as análises de predição dos seus domínios. A região C terminal da PfDYN3 não pode ser identificada pelos programas de análise de domínio, sendo então considerada como “região

indefinida”. Para uma melhor análise dessa PfDYN3 é necessário a utilização de outros métodos de análise estrutural. Podemos observar que as DLPs de *Plasmodium* interagem por meio dos seus domínios médios, formando um homodímero, posicionando assim os domínios GTPase nas extremidades (Figura 15).

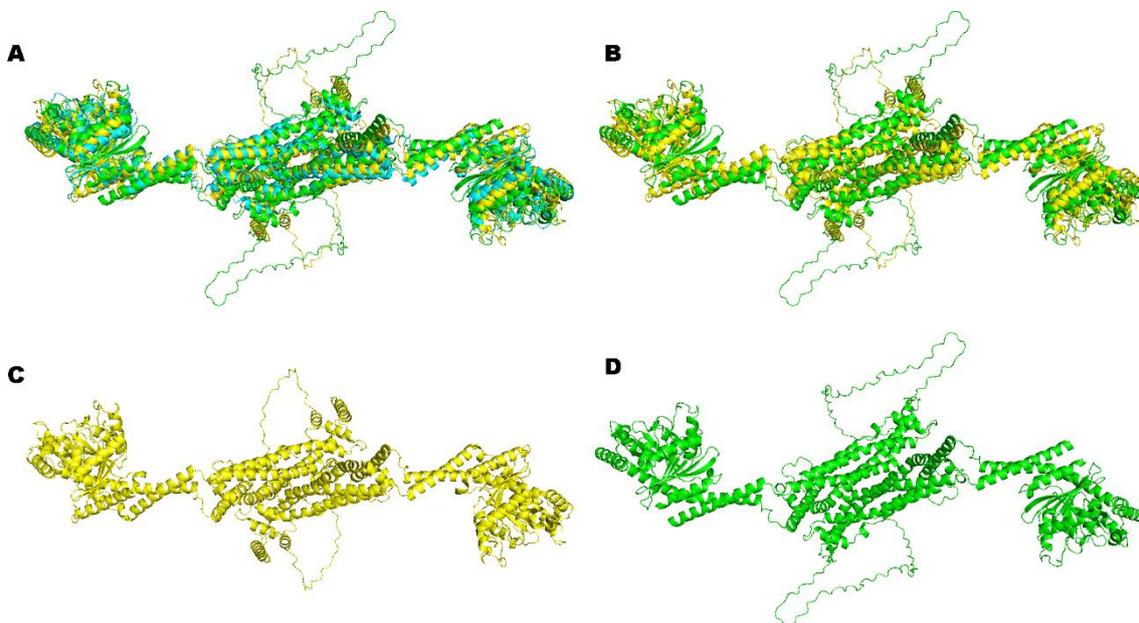


Figura 15 Predições das dinaminas homodimerizadas e o alinhamento entre elas e o homodímero da *dynamain-like* 4BEJ (Fröhlich et al. 2013), permitindo uma melhor compreensão da interação da dinamina com ela mesma para permitir seu funcionamento no organismo. A: Predição manual utilizando o PyMol por meio do plugin “*Alignment*” e o Chimera por meio do plugin “*MatchMaker*” que permitiu o alinhamento das estruturas preditas das dinaminas com o homodímero da 4BEJ para prever a estrutura homodimerizada das duas dinaminas; B: Alinhamento da estrutura homodimerizada da PfDYN1 e 2 predita pelo programa do Galaxy (GalaxyHOMOMER); C: Estrutura homodimerizada da PfDYN1 predita pelo Galaxy; Estrutura homodimerizada da PfDYN2 predita pelo Galaxy. Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2; Ciano: *dynamain-like* humana 4BEJ.

4. Predição de Sítios Ligação a ligantes das PfDYN1 e PfDYN2

As predições dos sítios de ligação a ligantes das PfDYN1 e 2 foram realizadas pelos servidores FTSite (Ngan et al. 2012), DoGSite (Volkamer et al. 2012), PockDrug (Borrel et al. 2015) e PrankWeb (Jendele et al. 2019).

Foram escolhidos os três melhores resultados preditos segundo o *ranking* de cada servidor (Figura 16) para realizar as análises iniciais e por meio deles foi possível observar regiões que foram comumente encontradas em mais de um servidor, permitindo a determinação de três sítios prováveis para cada dinamina (Figura 17).

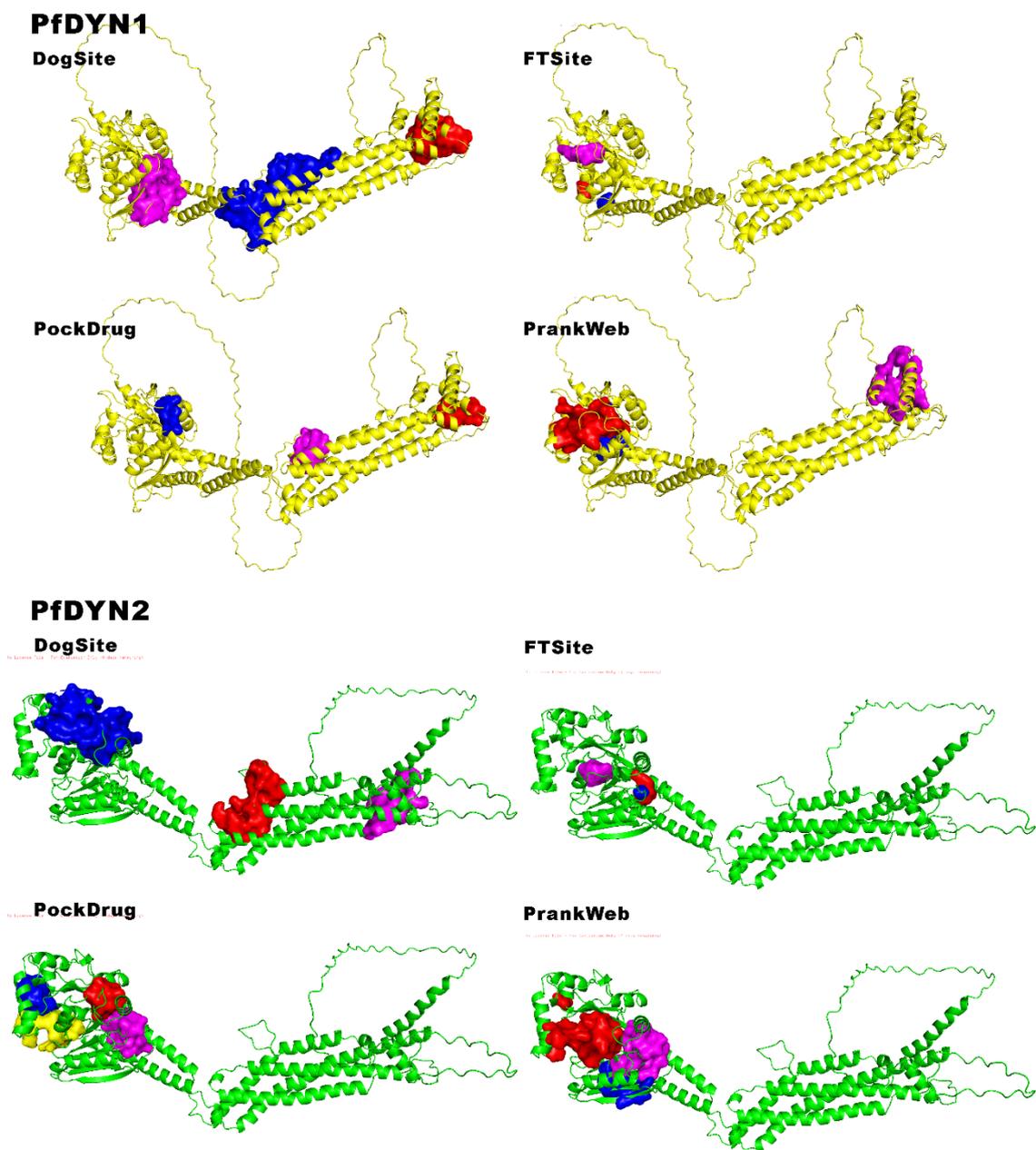
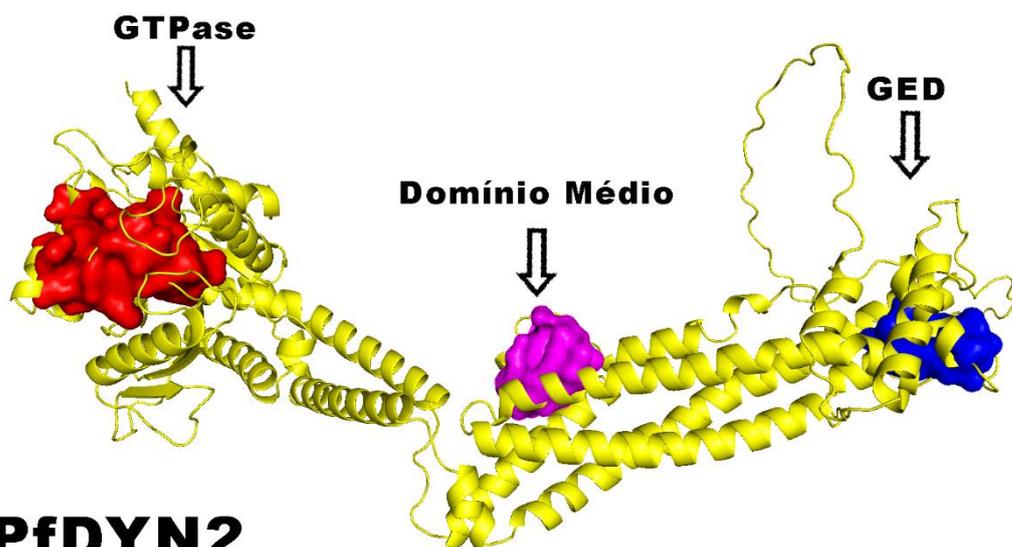


Figura 16 Posição dos sítios ativos preditos por cada servidor utilizado, as regiões dos sítios foram marcadas utilizando o programa de visualização PyMol e a região colorida representa um dos três (quatro no caso do PockDrug da PfDYN2) sítios preditos com melhor avaliação segundo os programas utilizados. PfDYN1: DoGSite – rosa P4, vermelho P5, azul P1; FTSite – magenta P1, vermelho P2, azul P3; PockDrug – magenta P3, vermelho P15, azul P41; PrankWeb – vermelho P1, azul P2, magenta P3. PfDYN2: DoGSite – vermelho P3, magenta P5, azul P2; FTSite – vermelho P1, azul P2, magenta P3; PockDrug – magenta

P3, azul P7, amarelo P4, vermelho P8; PrankWeb – vermelho P1, magenta P2, azul P3. Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2.

PfDYN1



PfDYN2

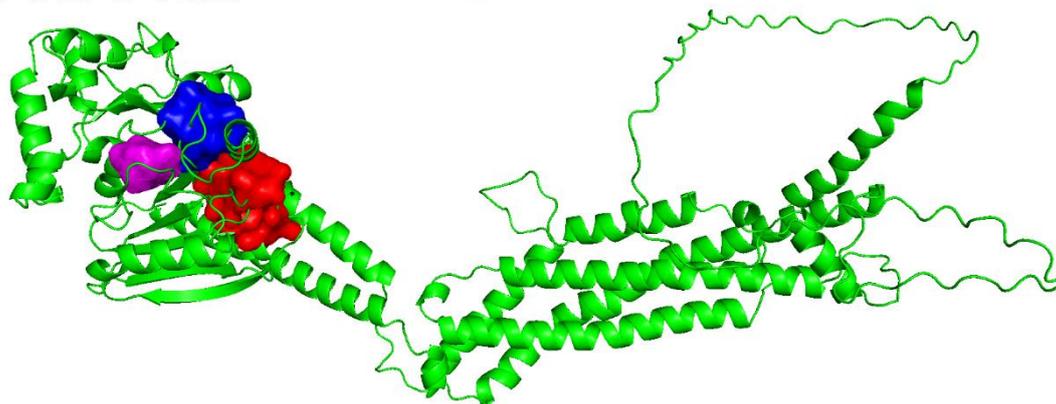


Figura 17 Posição dos três melhores sítios em geral determinado tanto pelas avaliações dos servidores como por uma análise comparativa entre cada sítio predito no qual as regiões determinadas por mais de um servidor teoricamente indica uma maior possibilidade de haver um sítio naquela região, com isso os três mais prováveis sítios preditos foram: PfDYN1: P15 da PockDrug (azul), P3 da PockDrug (magenta) e P1 da FTSite (vermelho); PfDYN2: P3 da PockDrug (vermelho), P8 da PockDrug (azul), P3 da FTSite (magenta). Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2.

Esses sítios então foram comparados com os sítios já conhecidos por meio de análises da estrutura cristalográfica de dinaminas homólogas de outros organismos (em especial a dinamina humana com PDB ID 3W6N (Kishida and Sugio 2013) na Figura 14) que permitiu a determinação de um sítio, que seria o mais conservado dentro da superfamília das dinaminas, que é a região onde ocorre a GTPase. Os sítios escolhidos e que foram utilizados nos cálculos de *docking* molecular seriam as regiões onde provavelmente ocorrem a GTPase nas dinaminas de *Plasmodium* (Figura 18). Os aminoácidos que foram preditos para compor o sítio ativo da PfDYN1 foram, Thr38, Gln39, Ser40, Ser41, Gly42, Lys43, Ser44, Ser45, Pro57, Arg58, Gly59, Gly61, Ile62, Val63, Thr64, Asp140, Leu141, Pro142, Gly143, Lys212, Asp214, Val241, Asn242, Arg243, Ser244, Thr245 e Ile248. Já para a PfDyn2, os aminoácidos que foram preditos

para compor o sítio ativo foram, Ala34, Gln35, Ser36, Val37, Gly38, Lys39, Thr40, Ser41, Pro53, Lys54, Gly55, Glu56, Asp57, Ile58, Val59 Thr60, Asp139, Leu140, Pro141, Gly142 e Thr144.

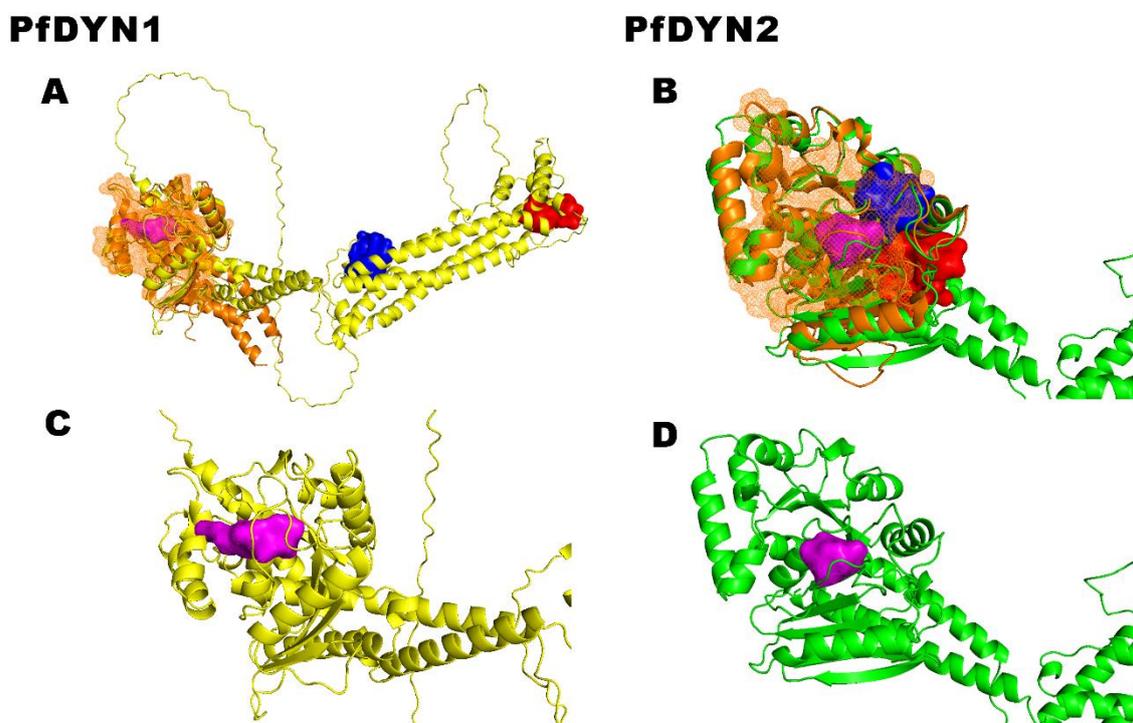


Figura 18 Sítio escolhido para a realização dos testes de *docking* molecular, o sítio foi escolhido baseado na similaridade estrutural entre dinaminas de diferentes espécies graças a conservação do sítio da GTPase entre elas e, portanto, é a área mais provável que inibidores de dinamina atuam. A região cinzenta representa essa região do sítio ativo que é conservada evolutivamente e, portanto, o sítio predito que melhor se posicionava dentro dessa região foi selecionado para o teste de *docking*. A: Sobreposição entre a PfDYN1 com os 3 melhores sítios preditos (Figura 17) e a DNM humana 3W6N (Kishida and Sugio 2013) em laranja com seu sítio ativo destacado em laranja (pontilhado); B: O sítio escolhido para realização de testes de *docking* molecular (P1 da FTSite); C: Sobreposição entre a PfDYN2 com os 3 melhores sítios preditos (Figura 17) e a DNM humana 3W6N (Kishida and Sugio 2013) em laranja com seu sítio ativo destacado em laranja (pontilhado); D: O sítio escolhido para realização de testes de *docking* molecular (P3 da FTSite). Amarelo: PfDYN1; Verde: PfDYN2.

5. Resultados computacionais da priorização de compostos

5.1. Preparação da biblioteca de compostos

Primeiramente realizamos uma busca por similaridade estrutural a inibidores conhecidos de dinaminas na biblioteca comercial ChemBridge (~1,3 milhões de compostos; <https://chembridge.com>). Foram selecionados os inibidores que possuem os menores IC_{50} dentre os inibidores de dinamina comerciais e os compostos selecionados para a biblioteca deveriam ter similaridade estrutural de no mínimo 60% em relação ao inibidor base. Os inibidores que foram selecionados como base de procura para similares são *dynasore* (Figura 19A) ($IC_{50} = 15 \mu M$; mínimo de 60% de similaridade estrutural) (Macia et al. 2006), *dyngo-4a* (Figura 19B) ($IC_{50} = 0,38 \pm 0,05 \mu M$; mínimo de 60% de similaridade estrutural) (McCluskey et al. 2013), *dynole* (Figura 19C)

($IC_{50} = 1,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$; mínimo de 60% de similaridade estrutural) (Hill et al. 2009), iminodyn (Figura 19E) ($IC_{50} = 0,45 \pm 0,05 \mu\text{M}$; mínimo de 70% de similaridade estrutural) (Hill et al. 2010) e rhodadyn (Figura 19D) ($IC_{50} 5,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$; mínimo de 85% de similaridade estrutural) (Robertson et al. 2012).

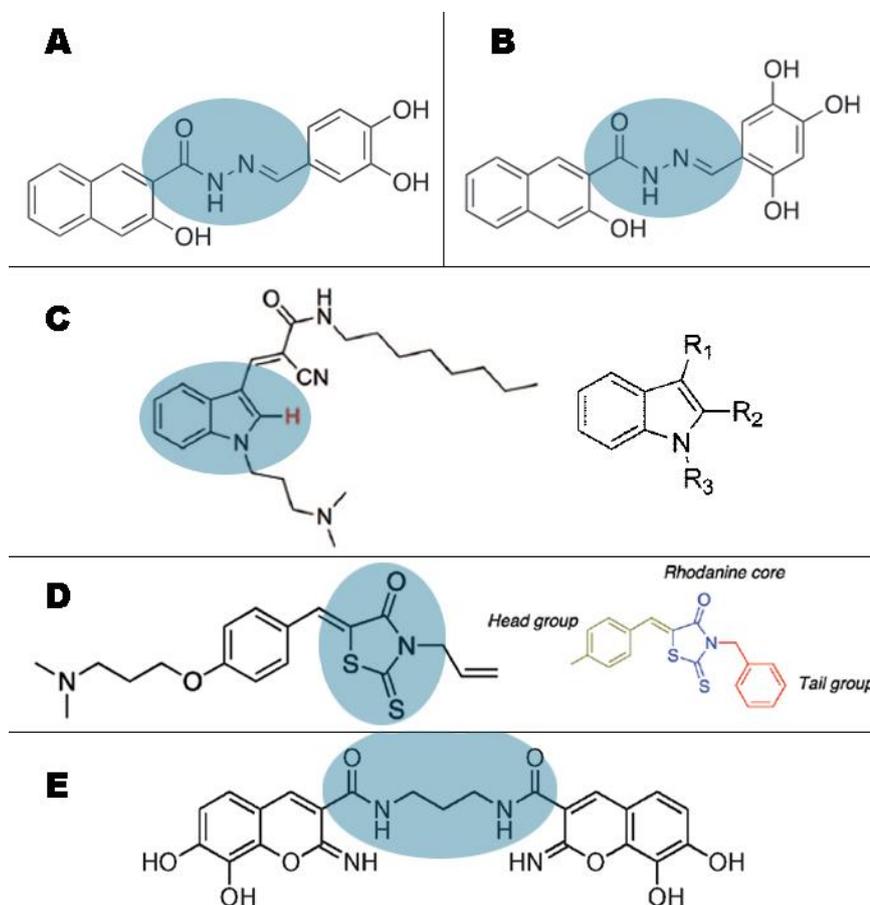


Figura 19 Representação da estrutura 2D das moléculas inibidoras comerciais selecionadas para serem as bases das pesquisas por moléculas similares. A região marcada em azul representa região central de cada uma dessas moléculas e que determina o grupo ao qual ela pertence. A: *Dynasore*, em azul o grupo formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida; B: *Dyngo-4a*, em azul o grupo formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida; C: *Dynole* (a esquerda), em azul o grupo indole, a direita uma representação das regiões que as compõem e que podem ser modificadas para produzir uma substancia derivada; D: *Rhodadyn* (a esquerda), em azul o grupo 4-metilideno-1,3-tiazolidina-2-tiona, a direita uma representação das regiões que as compõem e que podem ser modificadas para produzir uma substancia derivada; E: *Iminodyn*, em azul o grupo N-(3-acetamidopropil)acetamida.

5.2. Preparação dos compostos e das proteínas PfDYN1 e PfDYN2

Os compostos foram então preparados para os cálculos de *docking* no programa Glide, utilizando a ferramenta *ligprep* (Schrödinger Release 2022-3) para a correta protonação e geração de conformémeros (ou isômeros conformacionais) dos compostos em $\text{pH } 8,0 \pm 0,5$. Após a remoção das duplicatas, o resultado dessa pesquisa no banco de dados comercial resultou em uma biblioteca contendo 2134 moléculas.

As proteínas PfDYN1 e PfDYN2 foram preparadas através da ferramenta *Protein Preparation Wizard* (Friesner et al. 2006; Madhavi Sastry et al. 2013), em pH $8,0 \pm 0,5$.

6. Cálculos de *Docking* Molecular

O *docking* molecular foi então realizado utilizando o programa Glide, no melhor sítio, de GTP, determinado na etapa anterior, para ambas as dinaminas. Como resultado, para PfDYN1, obtivemos 2134 compostos com pontuação de *docking* entre $-11,75$ a $1,80$ Kcal·mol⁻¹. Para PfDYN2, obtivemos 2134 compostos com score variando de $-9,67$ a $4,38$ Kcal·mol⁻¹.

A seleção dos compostos se baseou (i) nos scores de *docking* (pelo menos um dos scores de *docking* deveria ser -5 Kcal·mol⁻¹ para serem considerados como uma afinidade capaz de interagir com o sítio ativo), (ii) nas interações com resíduos importantes do sítio GTP, (iii) na lipofilicidade (LogP), que deve estar entre 0 e 5, para que o composto permeie membranas e (iv) na solubilidade em água (LogSW), que deve ser ≥ -5 , para que o composto seja hidrossolúvel. Os compostos que passaram nesses filtros, foram priorizados para serem futuramente testados experimentalmente (Tabela 3).

Tabela 3 Compostos priorizados para futuro teste de restrição e suas pontuações de *docking score* para PfDYN1 e PfDYN2

Arcabouço molecular	ID ChemBridge	LogP	LogSW	<i>Docking Score</i> PfDYN1 (Kcal·mol ⁻¹)	<i>Docking Score</i> PfDYN2 (Kcal·mol ⁻¹)
<i>dynasore</i>	5321707	3,21	-3,78	-7,12	-5,39
<i>dynasore</i>	5318676	1,32	-1,62	-6,32	-5,67
<i>dyngo-4a</i>	8806659	3,98	-4,79	-7,15	-2,13
<i>dyngo-4a</i>	5367002	4,72	-5,14	-5,99	-1,53
<i>dynole</i>	8880132	3,18	-5,26	-5,2	-4,18
<i>dynole</i>	6009726	4,04	-5,43	-5,04	-3,08
<i>iminodyn</i>	5103008	2,34	-4,19	-7,1	-2,9
<i>iminodyn</i>	5103018	2,79	-4,25	-6,1	-5,8
<i>rhododyn</i>	6873032	4,3	-5,7	-7,35	-4,27
<i>rhododyn</i>	5668109	1,13	-2,64	-7,21	-5,67
<i>rhododyn</i>	7377558	3,04	-4,14	-5,35	-7,07
<i>rhododyn</i>	7181860	3,13	-4,67	-5,27	-6,71

7. Análises das interações intermoleculares

Essa etapa filtrou compostos considerando-se aqueles que apresentaram maior número de interações com os resíduos do sítio GTP da proteína. Utilizou-se como comparativo, as interações que a molécula de GTP realiza com os resíduos da proteína. 47 moléculas foram priorizadas. Em seguida foram selecionadas 12 moléculas (Tabela 3) que apresentaram maior

similaridade estrutural aos compostos base (no mínimo 70% de similaridade estrutural) e que possuíam os melhores resultados de score de *docking*.

Utilizando o programa PLIP e a ferramenta do Maestro “*Ligand Interaction Diagram*” (Schrödinger 2021c) foi possível analisar as interações tridimensionais previstas pelo *docking* entre as moléculas analisadas e os resíduos do sítio GTPase.

O composto derivado de *dynasore*, 5318676, faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage a Lys43 da PfDYN1 e a Lys39, Lys54 e Gln242 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas. A Thr245 e a Gly42 da PfDYN1, que faz duas ligações de hidrogênio com diferentes regiões do composto, e a Lys43, que faz uma ligação de hidrogênio com o composto, e os aminoácidos de PfDYN2, Asp57, que faz uma ligação de hidrogênio, e a Lys54 e Lys39, que fazem apenas interações hidrofóbicas, são aminoácidos conservados evolutivamente na superfamília das dinaminas. Possivelmente o maior número de ligação de hidrogênio que foi observado na PfDYN1 potencializou a afinidade que ela possui com a PfDYN1 e, portanto, teve um melhor score de *docking* (Figura 20).

O composto derivado de *dynasore* 5321707 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage a Lys43, Leu15 e Asn242 da PfDYN1 e a Lys39, Lys54 e Lys209 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas. A Gly61, Val63, Thr64 e Gly143 da PfDYN1 e a Lys54 da PfDYN2 são aminoácidos conservados evolutivamente na superfamília das dinaminas e todos eles fazem uma ligação de hidrogênio com algum átomo da molécula. O aminoácido Lys43 e Asn242 de PfDYN1 e Lys39 da PfDYN2 também são conservados evolutivamente e fazem interação hidrofóbica, como previamente dito (Figura 21).

O composto derivado de *dyngo-4a* 5367002 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Gln39 e Lys212 da PfDYN1 e a Lys39 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas sendo os dois aminoácidos da PfDYN1 conservados evolutivamente, sendo que a Lys212 também realiza uma interação pi-cátion, interagindo com a região que foi modificada do *dyngo*. Os aminoácidos, Asn242 e Ser44 de PfDYN1 e Gly38, Gly55 e Ser41 também são conservados e realizam ligação de hidrogênio com a molécula. A Thr 245 da PfDYN1 realiza uma ligação de hidrogênio com o cloro presente nessa estrutura modificada, enquanto na PfDYN2 o cloro está exposto ao solvente (Figura 22).

O composto derivado de *dyngo-4a* 8806659 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Val63, Lys212 e Asn242 da PfDYN1 e a Lys39 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas, sendo que todos os três aminoácidos da PfDYN1 são conservados. Os aminoácidos Gly42, Ser45, Arg58, e Asn242 de PfDYN1 e os aminoácidos Gly38, Thr40 e Ser41 de PfDYN2 são conservados e fazem ligação de hidrogênio com a molécula. A Lys212 da PfDYN1, além da interação hidrofóbica, e a Lys209 de PfDYN2, que diferente da primeira não é conservada

evolutivamente, fazem uma interação pi-cátion com a região que foi alterada quando comparada com a *dyngo-4a* (Figura 23).

O composto derivado de *dynole* 6009726 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Gln39 e Lys212 da PfDYN1 e a Gln35, Thr40, Lys54 e Val59 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas e todas elas são conservadas evolutivamente. Os aminoácidos Thr64 e Gly59 de PfDyn1 e Gly38 e Ser41 da PfDYN2 são conservadas e fazem ligação de hidrogênio com região modificada da *dynola* (Figura 24).

O composto derivado de *dynole* 8880132 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Arg58, Lys212 e Asp214 da PfDYN1 e a Lys39, Lys54 e Lys209 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas, sendo que os três aminoácidos da PfDYN1 e a Lys39 e Lys54 da PfDYN2 são conservados evolutivamente. Os aminoácidos Gly42, Ser46 e Gly143 da PfDYN1 e Gly38, Lys39 e Gln242 de PfDyn2 fazem ligação de hidrogênio com o composto ancorado, sendo que todos da PfDYN1 e os dois primeiros aminoácidos citados da PfDYN2 são conservados evolutivamente. A Arg58 da PfDYN1 e a Lys54 da PfDYN2 fazem duas interações pi-cátion com o grupamento indol. Além disso, a Lys212 da PfDYN1 e a Lys209 da PfDYN2 fazem uma interação iônica com o mesmo nitrogênio presente em uma região que foi alterada da *dynola* (Figura 25).

O composto derivado de *iminodyn* 5103008 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Lys43, Val63, Lys212, Asp214 e Leu215 da PfDYN1 e a Lys39 e Lys209 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas, sendo que os aminoácidos Val63, Lys43, Lys 212 e Asp 214 são conservados evolutivamente. Os aminoácidos Ser40, Gly42 e Asn 242 de PfDYN1 e Gly38, Thr40, Ser41 e Gln242 de PfDYN2 fazem ligação de hidrogênio com o composto e desses aminoácidos, apenas a Gln242 de PfDYN2 não é conservado (Figura 26).

O composto derivado de *iminodyn* 5103018 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Lys43, Lys212, Asp214 e Leu215 da PfDYN1 e a Val59 e Lys209 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas, sendo que a Leu215 da PfDYN1 interage com dois átomos do composto. A Gly42 e Asn242 da PfDYN1 e a Gly38 e Thr40 da PfDYN2 fazem ligação de hidrogênio. A Lys209 da PfDYN2 faz uma interação pi-cátion com um grupamento benzeno. Desses aminoácidos listados, a Gly42, Lys43 e Asp214 de PfDYN1 e a Val59, Gly38 e Thr40, são conservados evolutivamente e possuem algum tipo de interação com a molécula ancorada (Figura 27).

O composto derivado de *rhododyn* 5668109 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Asn242 da PfDYN1 por interação hidrofóbica sendo esse aminoácido conservado evolutivamente. Os aminoácidos Ser45, Lys43, Gly 42 e Ser40 de PfDYN1 e Ser36 e Gly38 de PfDYN2 fazem ligação de hidrogênio com a molécula ancorada. Além disso, a Arg58 da PfDYN1 e a Lys54 da PfDYN2 fazem

uma interação iônica com o mesmo átomo de oxigênio presente no grupamento que difere da *rhodadyn* comercial (Figura 28).

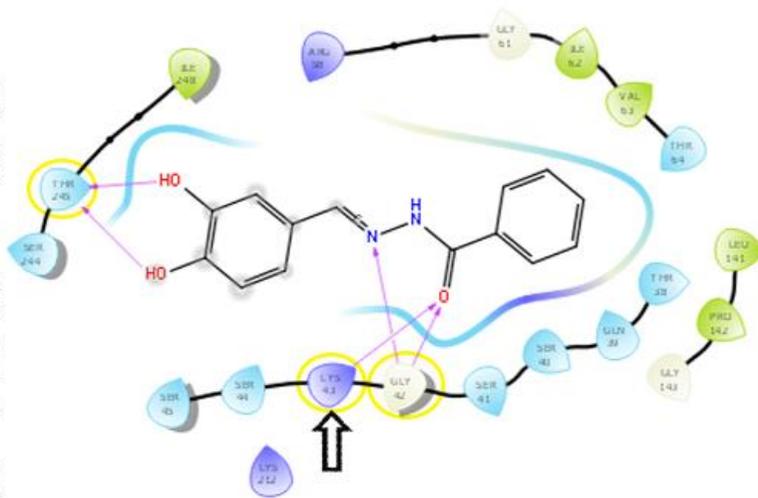
O composto derivado de *rhodadyn* 6873032 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Lys43, Lys212 e Asn242 da PfDYN1 e a Gln35 e Ile58 da PfDYN2 por interações hidrofóbicas, sendo que desses apenas o Asn242 da PfDYN1 não é conservado evolutivamente. Além disso a Val63, Thr64, Lys 43 e Gly 42 da PfDYN1 e a Ser36 da PfDYN2 fazem ligação de hidrogênio, desses, apenas a Gly42 da PfDYN1 não é conservado e a Val63 e Thr64 se ligam ao enxofre presente na indole. Os aminoácidos conservados evolutivamente, Arg58 e Lys212 da PfDYN1 e Lys54 da PfDYN2 fazem interação pi-cátion com o composto (Figura 29).

O composto derivado de *rhodadyn* 7181860 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, dois átomos do composto interagem com a Lys54 da PfDYN2 por interação hidrofóbica, sendo que a Lys54 da PfDYN2 interage com 2 átomos. Os aminoácidos Val63, Ser40, Gly42, Thr245 da PfDYN1 e Lys54 e Gly142 da PfDYN2 fizeram ligações de hidrogênio. Além dessas interações, na PfDYN1 a Arg58 fez uma interação pi-cátion e o aminoácido Gly59 fez uma ligação de hidrogênio com o cloro do composto. Já na PfDYN2 a Lys39 fez uma interação iônica com o composto e os aminoácidos Val59 e Gly55 fizeram uma ligação de hidrogênio com o cloro do composto. Todos os aminoácidos que interagiram com o composto são conservados evolutivamente (Figura 30).

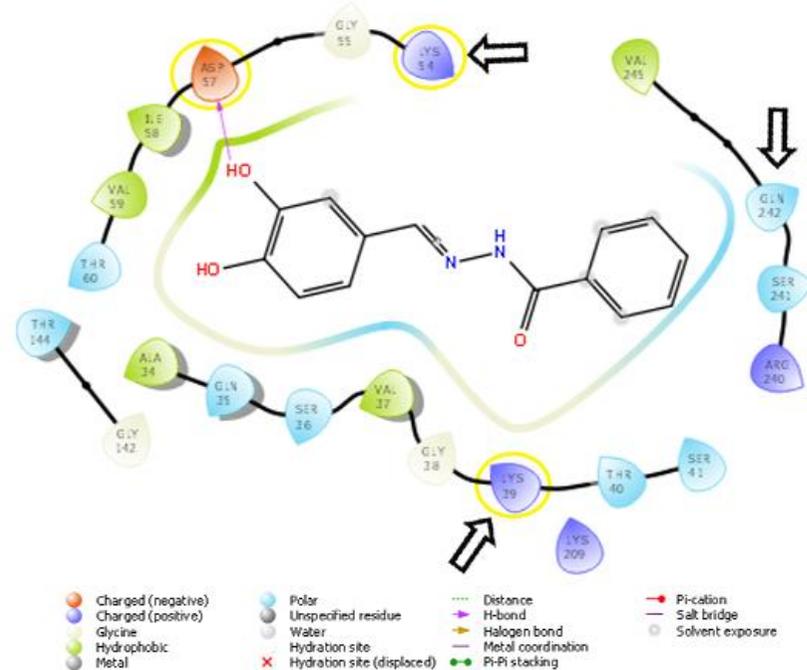
O composto derivado de *rhodadyn* 7377558 faz majoritariamente ligação de hidrogênio com o sítio ativo. Além disso, o composto interage com a Gln35, Lys54 e Ile58 da PfDYN2 por interação hidrofóbica, sendo que a Lys54 interage com dois átomos do composto. Os aminoácidos Thr64, Val63 e Gly143 de PfDYN1 e Ser43, Ser41 e Thr60 de PfDYN2 fazem ligação de hidrogênio com o composto. Além dessas interações a Lys54 da PfDYN2 faz uma interação iônica com o átomo de oxigênio e uma interação pi-cátion com o anel aromático, já a Ser44 da PfDYN1 faz uma ligação de hidrogênio com o bromo, que na PfDYN2 está exposto ao solvente. Todos os aminoácidos mencionados são conservados evolutivamente (Figura 31).

PfDYN1

D
y
5
n
3
a
1
8
s
6
o
7
r
6
e



PfDYN2



- Charged (negative)
- Charged (positive)
- Glycine
- Hydrophobic
- Metal
- Polar
- Unspecified residue
- Water
- Hydration site
- X Hydration site (displaced)
- Distance
- H-bond
- Halogen bond
- Metal coordination
- Pi-Pi stacking
- Pi-cation
- Salt bridge
- Solvent exposure

Figura 20 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro , das moléculas similares a *dynasore* 5318676 selecionadas após cálculos de *docking* e as interações que elas realizam com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra as interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada.

PfDYN1

PfDYN2

**D
y
5
n
3
a
2
1
s
7
o
o
r
7
e**

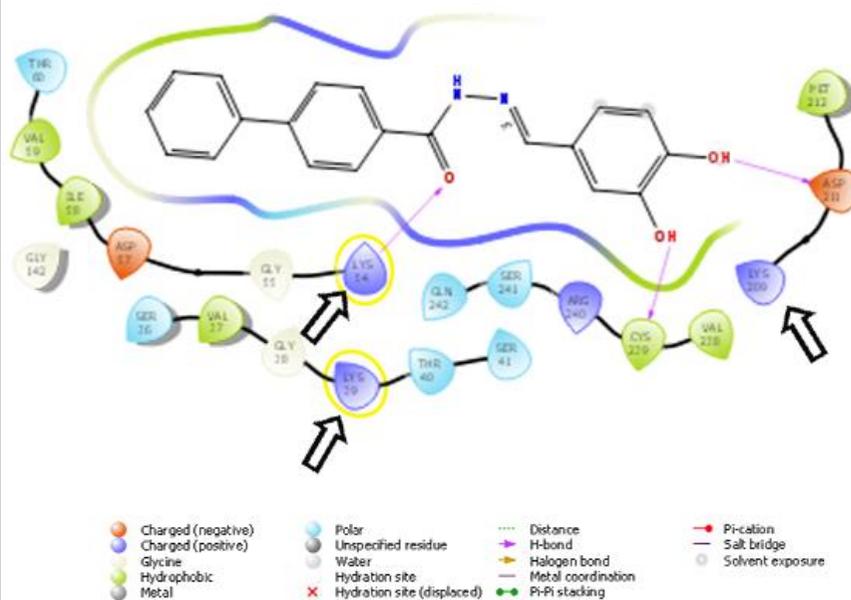
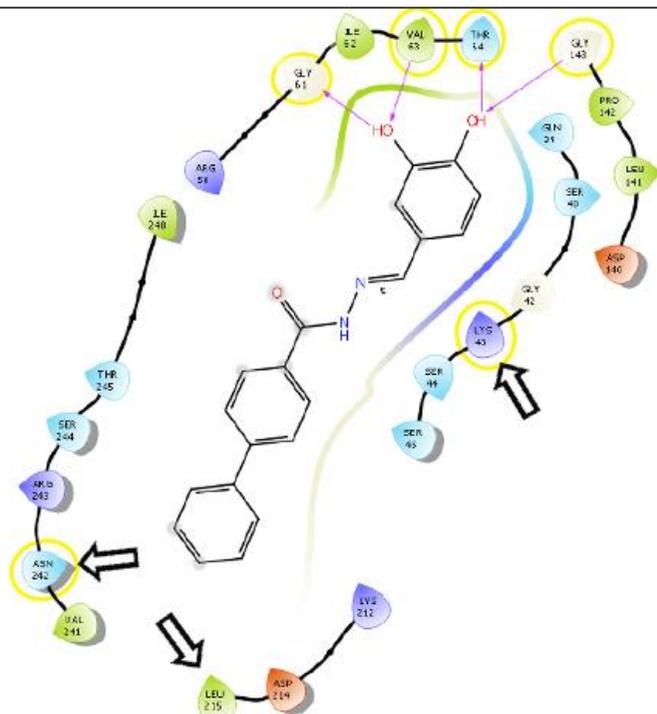
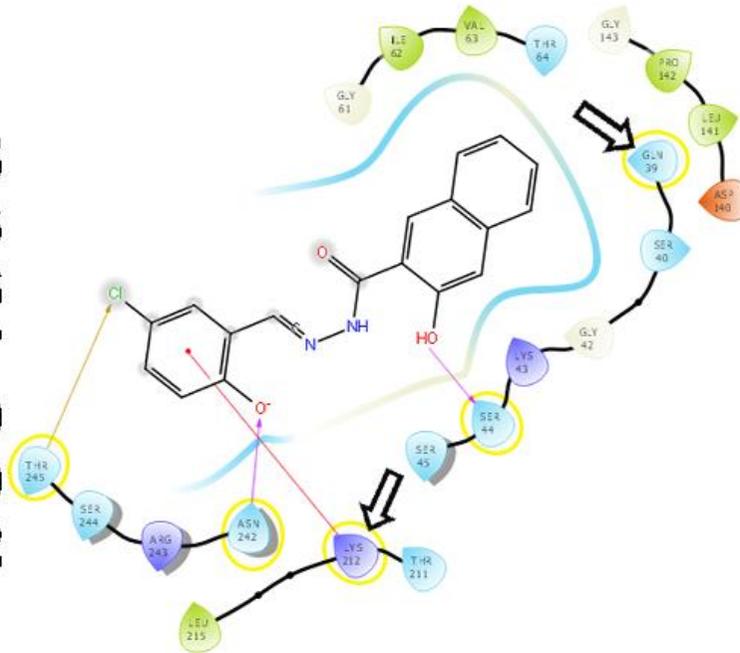


Figura 21 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, das moléculas similares a *Dynasore* 5321707 selecionadas após cálculos de *docking* e as interações que elas realizam com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagem com a molécula ancorada.

PfDYN1

D5
Y6
n7
o9
o0
2



PfDYN2

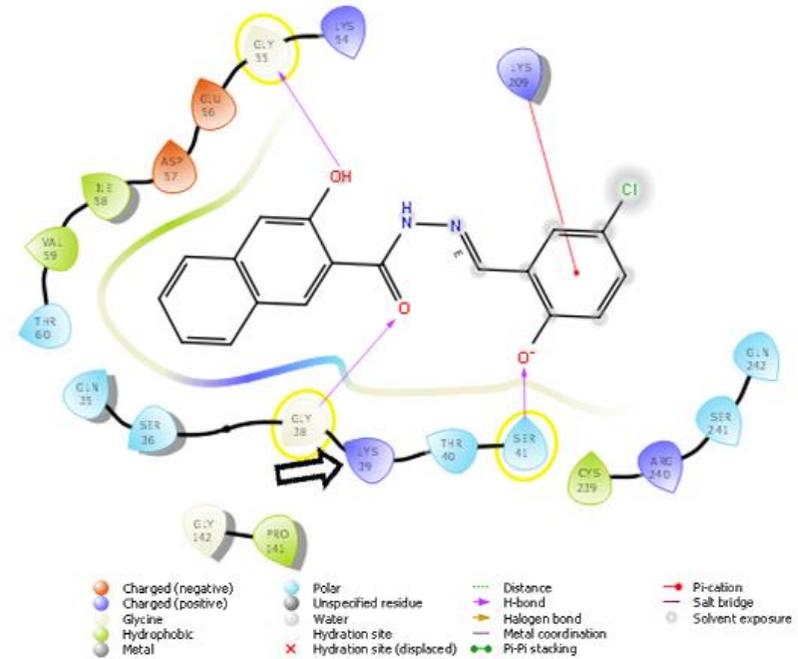
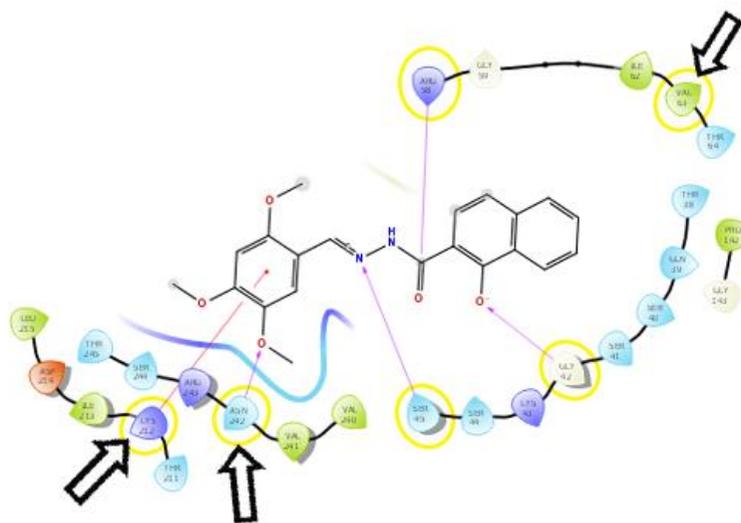


Figura 22 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, das moléculas similares a *dyngo-4a* 5367002 selecionadas após cálculos de *docking* e as interações que elas realizam com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagem com a molécula ancorada.

PfDYN1

**D
y
n
g
o**
8806659



PfDYN2

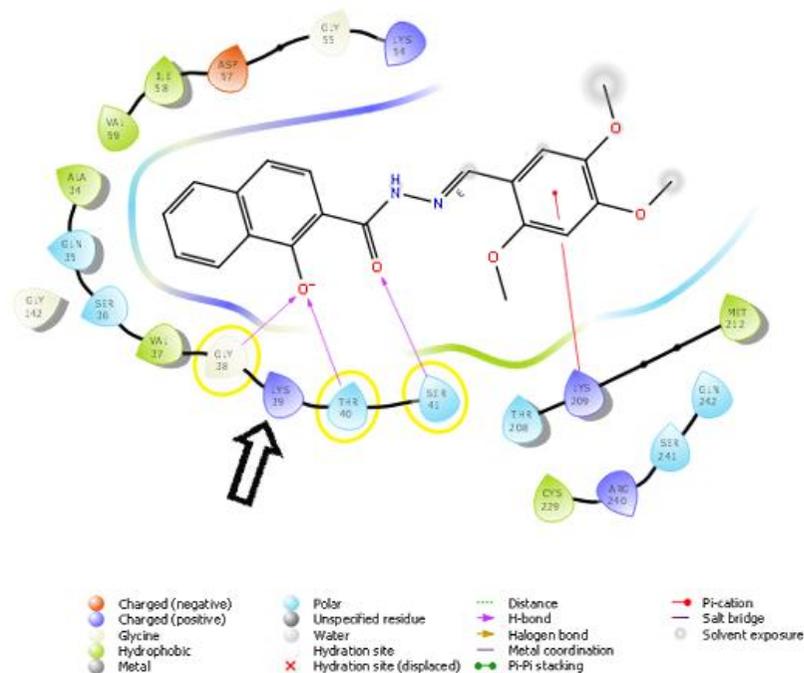
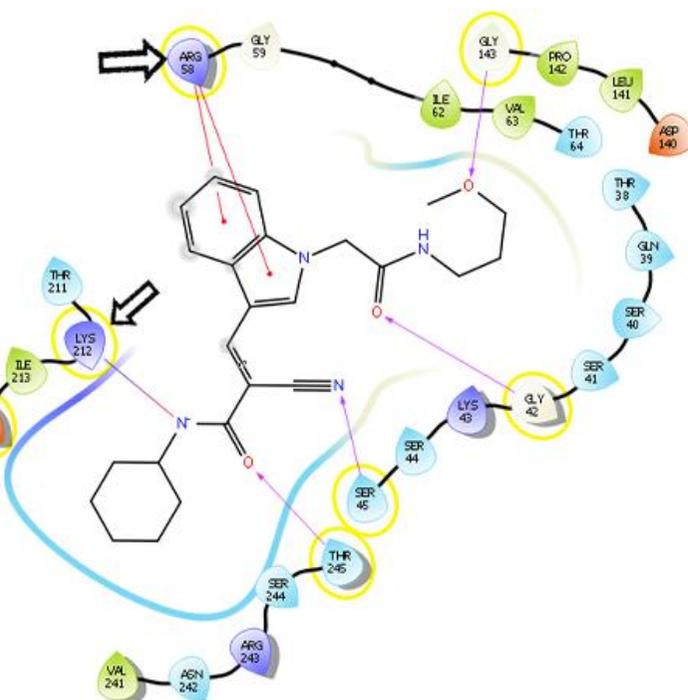


Figura 23 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *dyngo-4a* 8806659, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada.

PfDYN1

**D8
y88
n88
o13
l3
e2**



PfDYN2

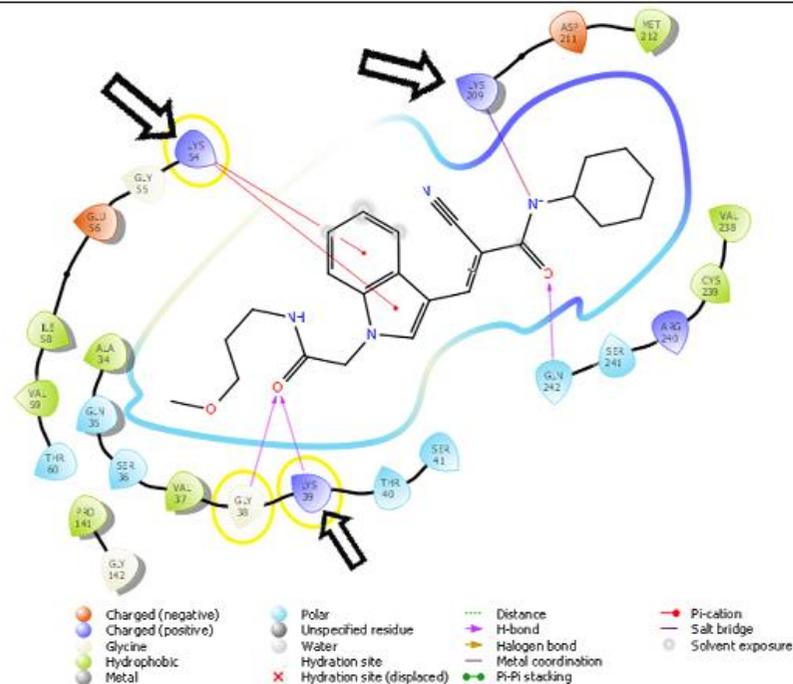
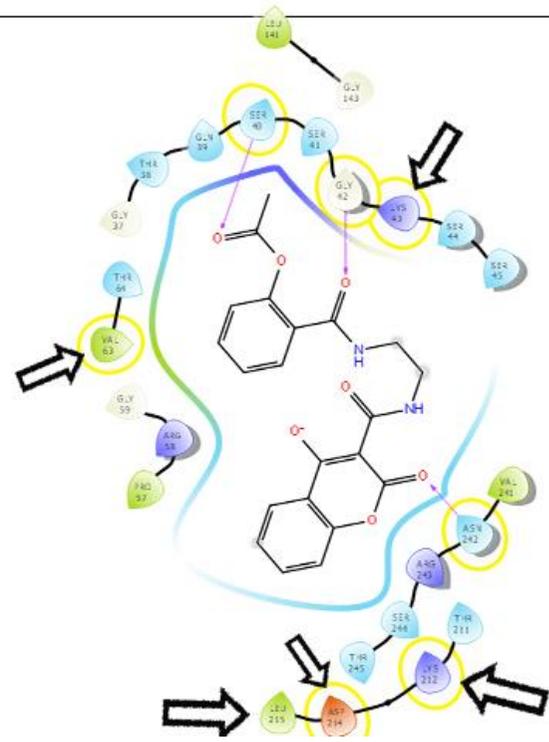


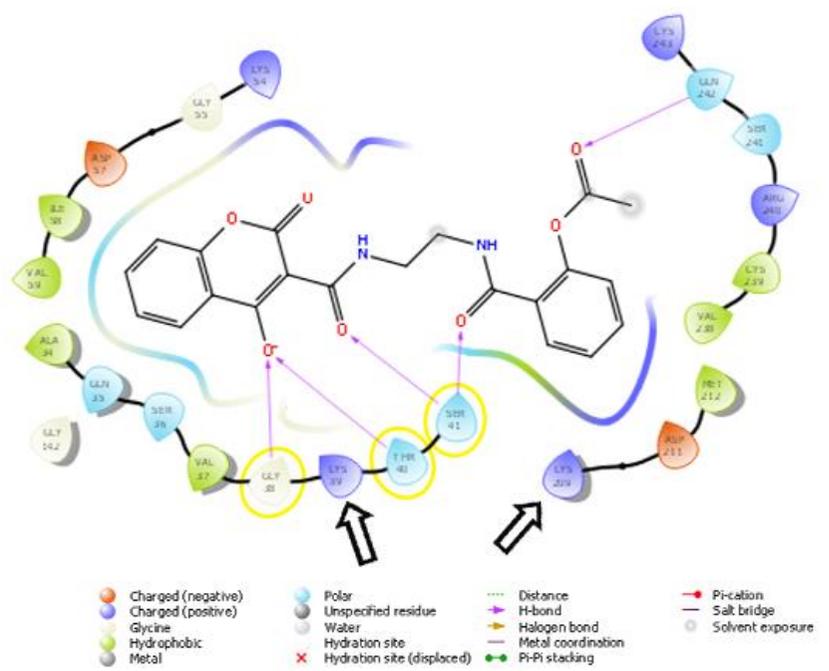
Figura 25 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Dynole* 8880132, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagem com a molécula ancorada.

I
m5
i1
n3
o0
o0
y8
n

PfDYN1



PfDYN2

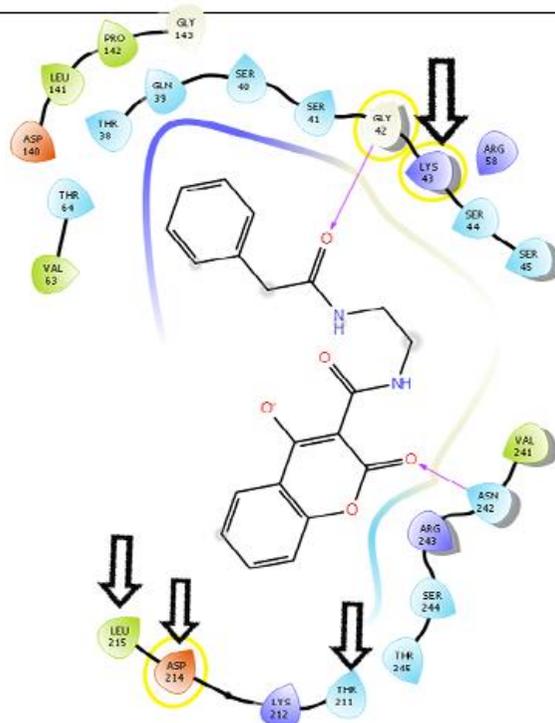


- Charged (negative)
- Charged (positive)
- Hydrophobic
- Metal
- Polar
- Unspecified residue
- Water
- Hydration site
- Hydration site (displaced)
- Distance
- H-bond
- Halogen bond
- Metal coordination
- Pi-Pi stacking
- Pi-cation
- Salt bridge
- Solvent exposure

Figura 26 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Iminodyn* 5103008, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagem com a molécula ancorada.

I
m5
i1
n3
o0
d1
y8
n

PfDYN1



PfDYN2

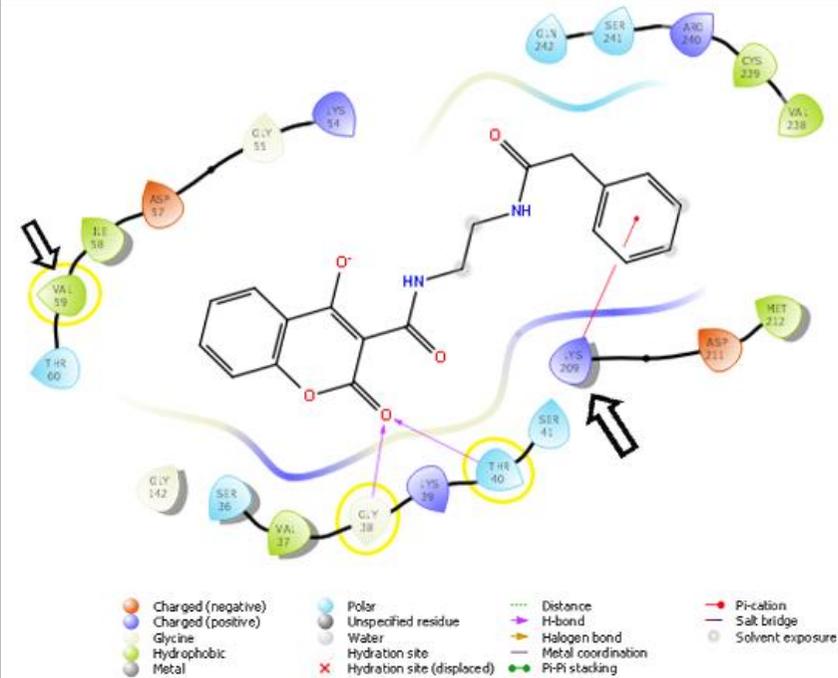
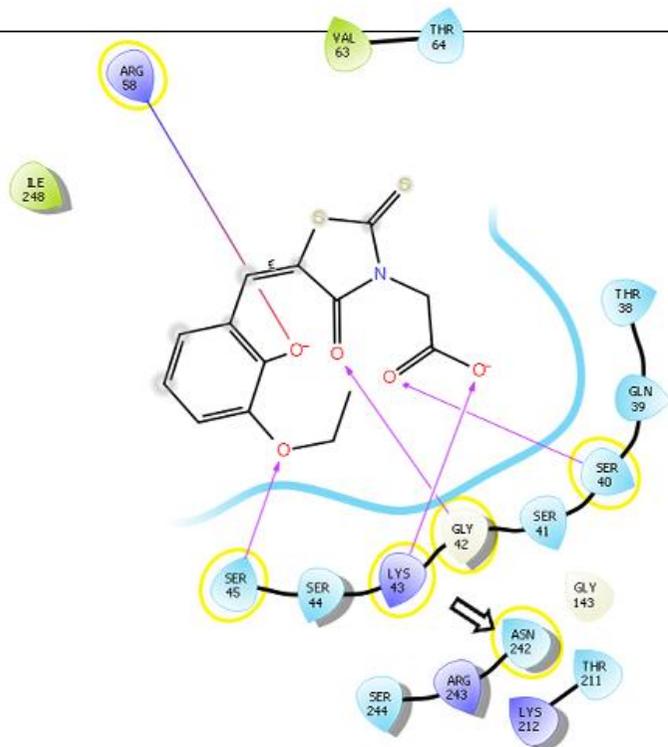


Figura 27 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Iminodyn* 5103018, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada.

PfDYN1

R
h
5
o
6
d
6
8
a
1
d
o
y
9
n



PfDYN2

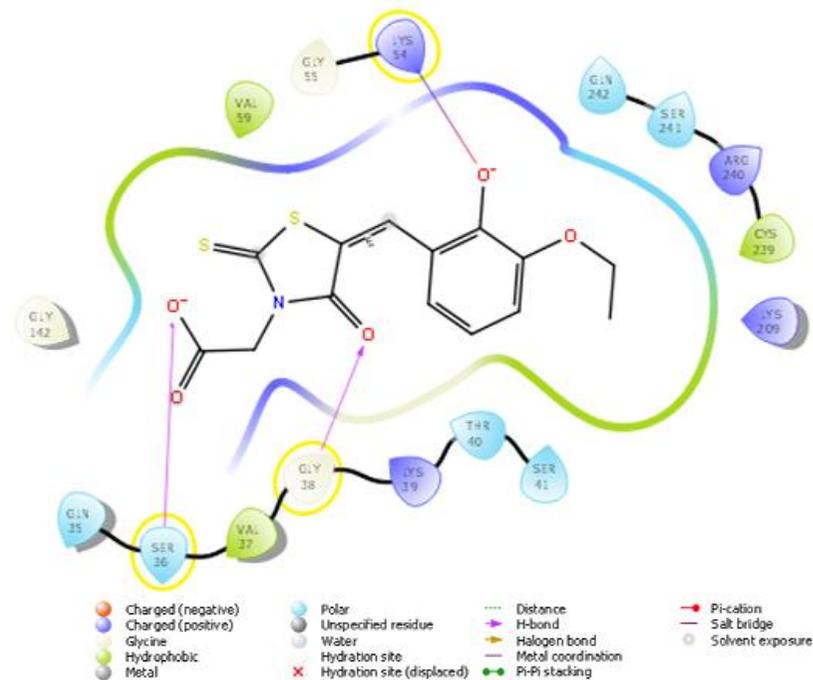


Figura 28 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Rhodadyn* 5668109, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada.

PfDYN1

PfDYN2

R
h
6
o
d
a
d
y
n
6
8
7
3
0
3
2

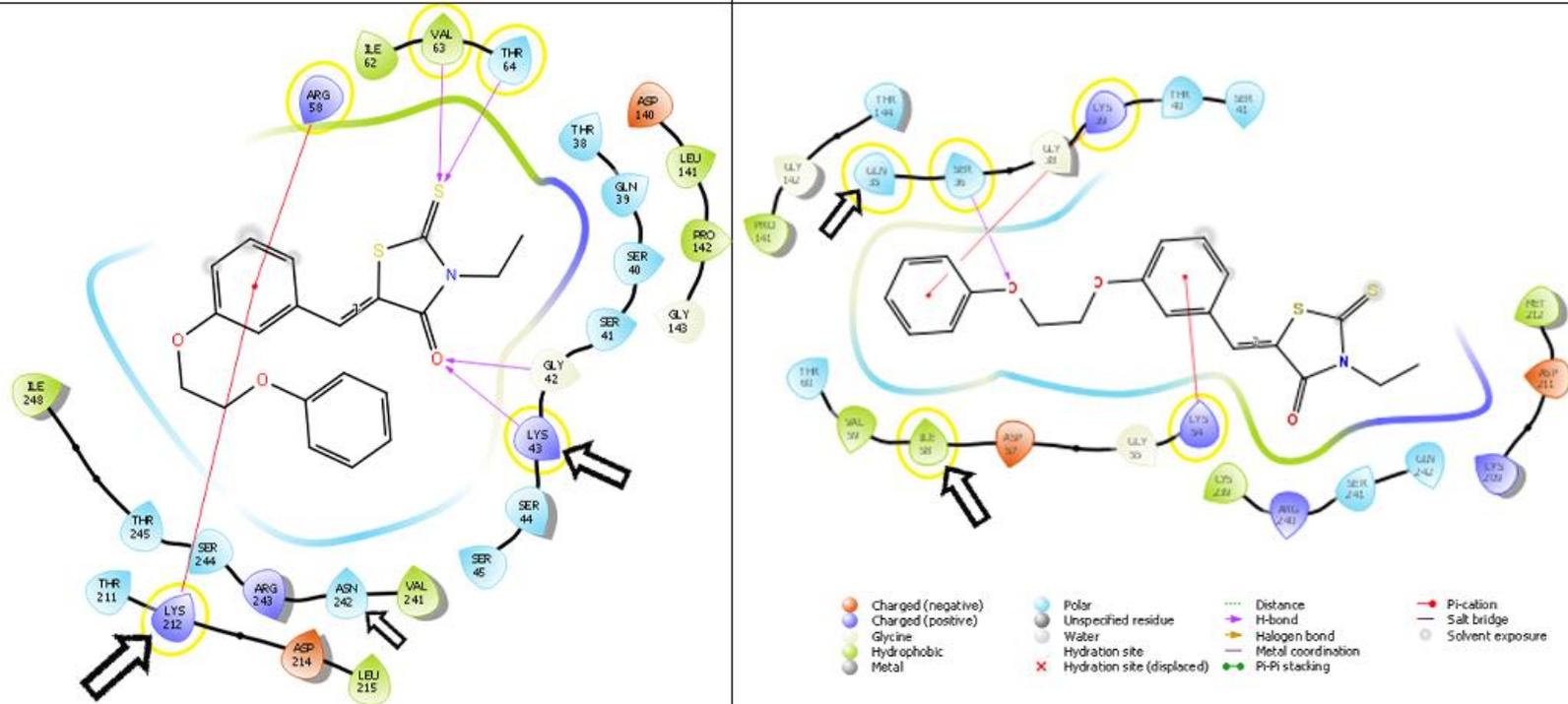


Figura 29 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Rhododyn* 6873032, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada.

PfDYN1

PfDYN2

R
h
o
d
a
d
y
n
7
1
8
1
8
6
0

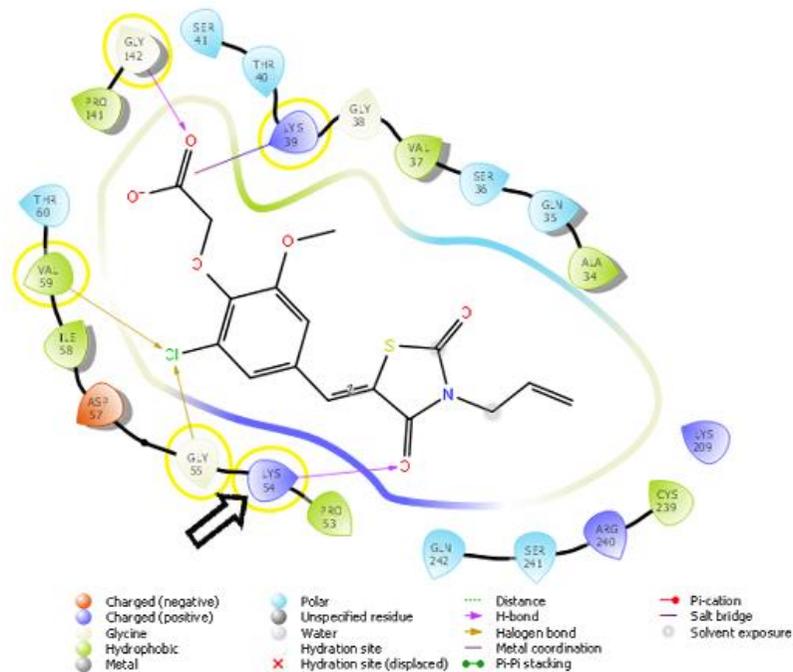
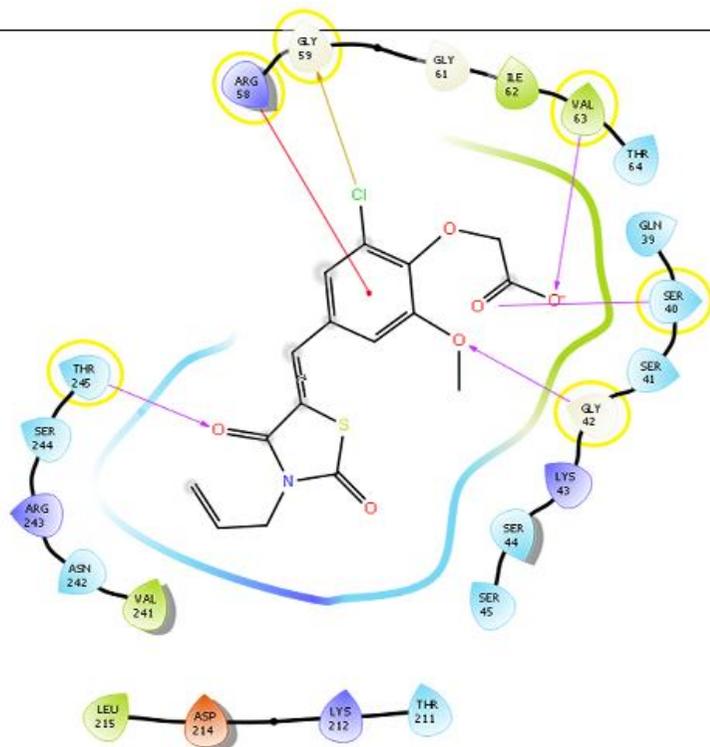


Figura 30 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Rhodadyn* 7181860, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada.

PfDYN1

PfDYN2

R
h
7
o
d
a
d
y
n

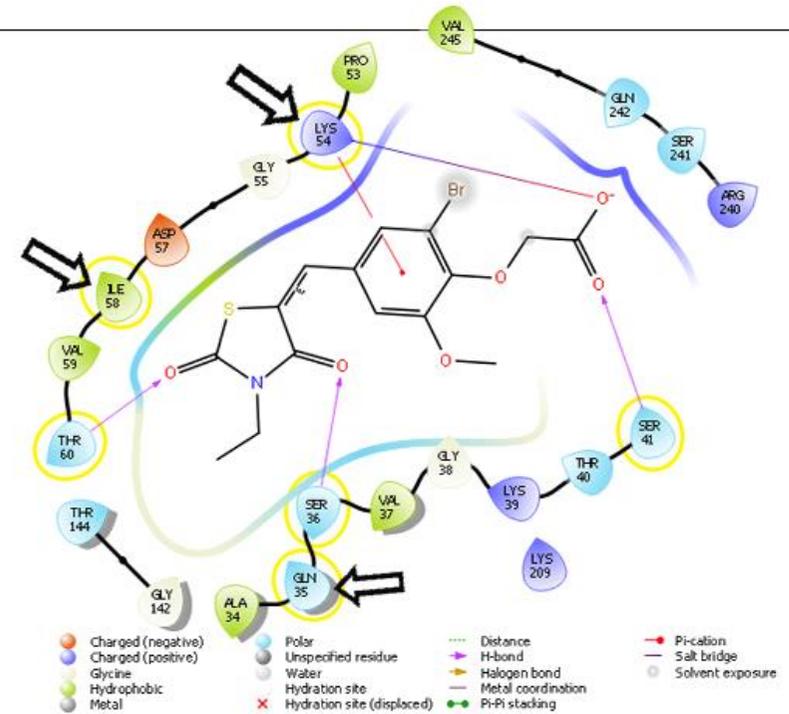
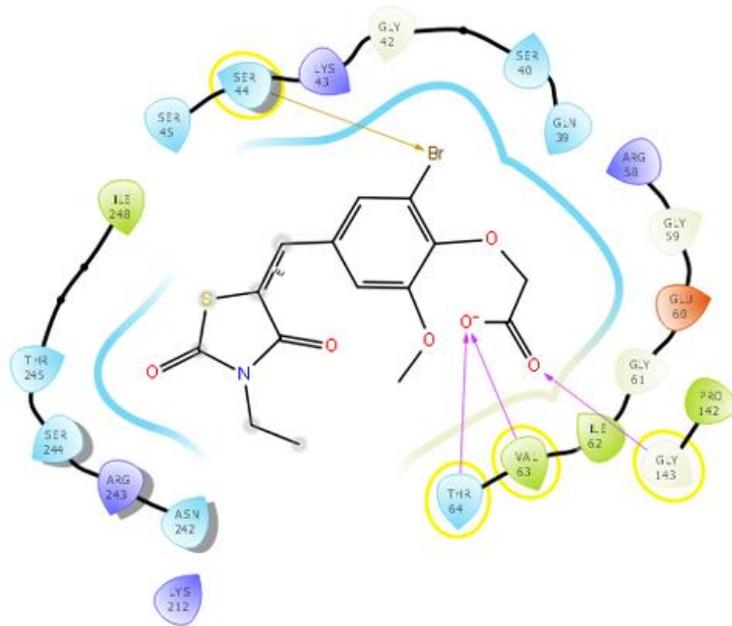


Figura 31 Diagrama de interação 2D ligante-proteína, gerada pelo programa Maestro, da molécula similar a *Rhodadyn 7377558*, selecionada após cálculo de *docking*, e as interações que ela realiza com o sítio de ligação predito na região da GTPase para a PfDYN1 e 2. A seta mostra onde ocorrem interações hidrofóbicas segundo o PLIP e os círculos amarelos são os aminoácidos conservados evolutivamente que interagiram com a molécula ancorada.

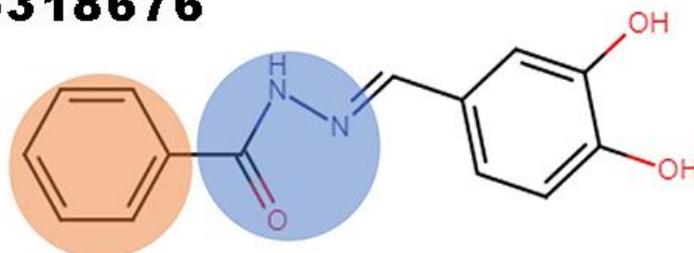
8. Características Estruturais dos compostos priorizados

Seguindo o protocolo previamente descrito, as moléculas foram selecionadas analisando as estruturas moleculares delas e respeitando as características moleculares que os desenvolvedores dos inibidores observaram tornar os inibidores mais eficientes.

Duas moléculas derivadas da dynasore (Figura 20 e Figura 21) foram escolhidas por suas fortes interações com as DLPs de *P. falciparum*. Uma característica importante que procurou ser mantida na escolha dessas moléculas foi a formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida localizada na parte central da molécula e a presença de duas hidroxilas no anel fenil, já que isso é uma característica que contribui para aumento de sua potência (McCluskey et al. 2013). A principal diferença dessas moléculas em relação a sua referência é a ausência do naftaleno que compõe sua estrutura original, no seu lugar está presente na região um fenil no composto 5318676 e um grupamento bifenil no composto 5321707 (Macia et al. 2006) (Figura 32).

Dynasore

5318676



5321707

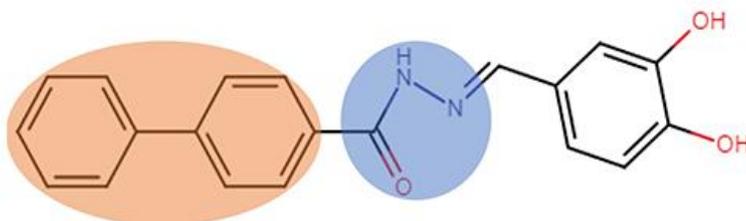


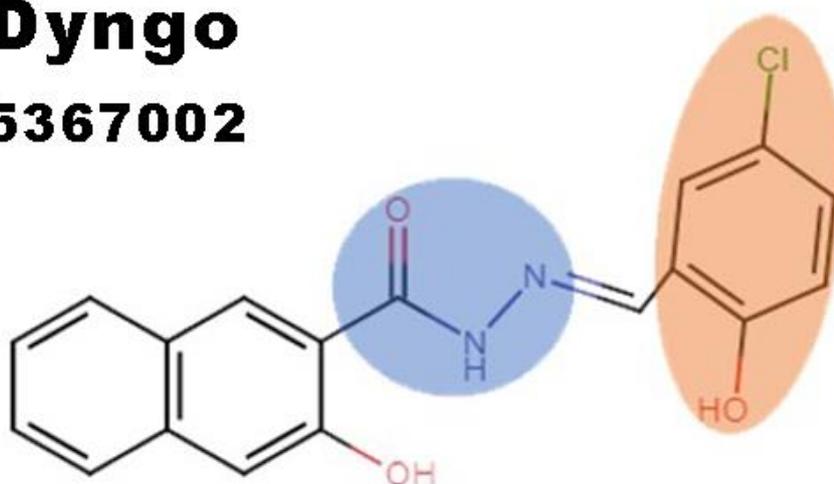
Figura 32 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *dynamin* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, A região em azul contém a formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida, a região não marcada é um anel fenil com duas hidroxilas (também uma

característica que aumenta sua potência). A esquerda, no círculo vermelho, no 5318676 possui um grupo fenil e no 5321707 possui um bifenil, ambos no lugar do naftaleno presente na *dynasore*.

Escolhemos também duas moléculas derivadas da *dyngo-4a* (Figura 22 e Figura 23). As características que procuraram ser mantidas nas moléculas derivadas foram a formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida localizada na parte central da molécula e a presença do naftaleno. A principal diferença dessas moléculas em relação a sua original é a perda de uma hidroxila, mudança de posicionamento de "orto" (similar a localizada na *dynasore*) para "para", e a substituição de uma hidroxila por cloro na composto 5367002 e a mudança. Já o composto 8806659 manteve as posições no anel aromático, porém ao invés de serem hidroxilas foram substituídos por éter (McCluskey et al. 2013) (Figura 33).

Dyngo

5367002



8806659

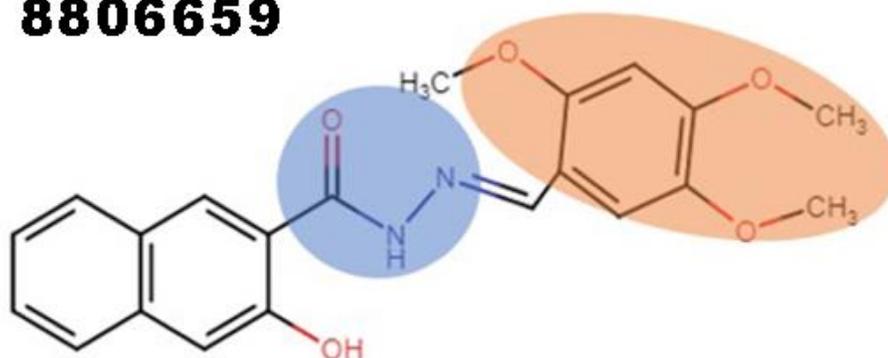


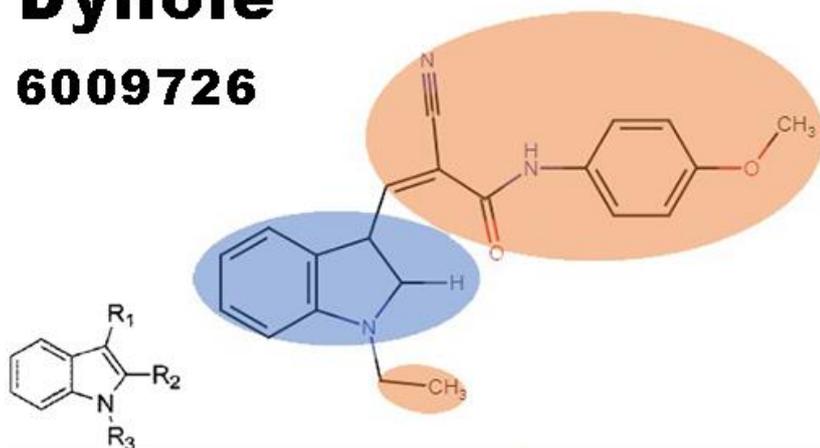
Figura 33 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *dyngo-4a* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, A região em azul contém a formil-hidrazida/ N'metilideno-aceto-hidrazida, a região não marcada é um naftaleno. A direita, no círculo vermelho, no 5367002 uma das hidroxilas (o grupo OH ligado ao benzeno) foi substituída por cloro, além de uma mudança na distribuição desses compostos no benzeno, já no 8806659, as hidroxilas presentes no *dyngo-4a* foram substituídas por éter.

Duas moléculas derivadas de *dynole* (Figura 24 e Figura 25) foram escolhidas. As características que procuraram ser mantidas nas moléculas derivadas foi o grupamento indol, estrutura básica de toda *dynole*, e a ausência

da ligação de carbono no carbono 2 (R₂) do indol, pois essa característica aumentou a atividade quando a *Dynole* 34-2 foi originalmente sintetizada (Hill et al. 2009). A molécula 6009726 possui diferença nos dois radicais que compõem a dynola original, primeiramente a ligada a nitrogênio (R₃) foi substituída por um etano, e a ligada no carbono 3 (R₁) foi substituído por (2Z)-2-etinil-N-(4-metóxfenil)but-2-enamida. Já na molécula 8880132, a R₁ foi substituída por N-(3-metoxipropil)acetamida e a R₃ por 3-(ciclo-hexilamino)-2-metilideno-but-3-enenitrila (Figura 34).

Dynole

6009726



8880132

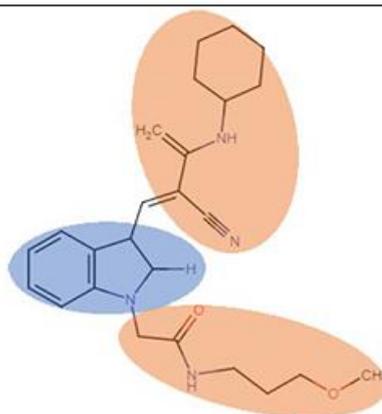


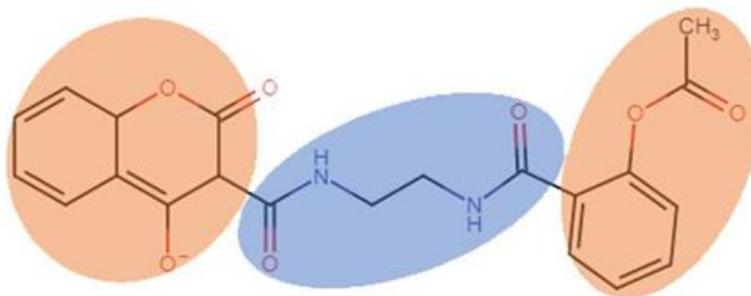
Figura 34 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *dynole* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto. Ambas moléculas preservaram a região central da dynola (o grupamento indol). Na 6009726, a R₃ foi substituída por um etano e a R₁ por (2Z)-2-etinil-N-(4-metóxfenil)but-2-enamida. Já na molécula 8880132, a R₁ foi substituída por N-(3-metoxipropil)acetamida e a R₂ por 3-(ciclo-hexilamino)-2-metilideno-but-3-enenitrila.

Duas moléculas derivadas de *Iminodyn* (Figura 26 e Figura 27) foram escolhidas. As características que procuraram ser mantidas nas moléculas derivadas foi a região central N-(3-acetamidopropil)acetamida, que é uma região espelhada de N-etilacetamida, que caracteriza as *iminodyns*. As moléculas selecionadas se diferem da original pelas modificações dos compostos ligados a região central, não só são estruturalmente distintos do original como não possuem a característica de serem enantiômeros e sim dois compostos distintos entre eles. As moléculas 5103008 e 5103018 são estruturalmente similares, possuindo ambas de um lado 4-hidroxi-2H-cromen-2-ona e do outro a 5103008

possui um acetato de fenila e o 5103018 possui um tolueno (Hill et al. 2010) (Figura 35).

Iminodyn

5103008



5103018

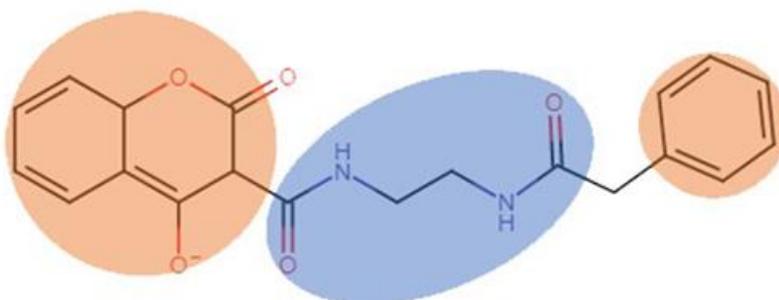


Figura 35 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *iminodyn* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, A região em azul corresponde a N-(3-acetamidopropil)acetamida, que é uma região espelhada, característica das *iminodyn*. A esquerda de ambas possui um 4-hidroxi-2H-cromen-2-ona, já a direita a 5103008 possui um acetato de fenila e i 5103018 possui um tolueno.

Diferentemente das outras moléculas, no caso das *rhodadyns* (Figura 28-Figura 31) foram selecionadas quatro moléculas ao invés de duas, visto que elas foram as moléculas que tiveram a maior porcentagem de similaridade e por serem os únicos a possuírem exemplares moleculares que o resultado de *docking* apontava maior similaridade a PfDYN2 respeitando os outros parâmetros. As características que procuraram ser mantidas nas moléculas derivadas foi o grupamento ligado ao nitrogênio do núcleo da *Rhodadyn*) deve ser pequeno, uma vez que o artigo que sintetizou a série de *Rhodadyn* apontou que isso aumenta a potência, o grupo ao carbono do núcleo da *Rhodadyn*) deve possuir um fenol, como mostrado nos melhores resultados dos experimentos de desenvolvimento da *Rhodadyn*, e o núcleo da *Rhodadyn* 4-metilideno-1,3-tiazolidina-2-tiona, sendo que o tioformaldeído no composto 7181860 e composto 7377558 foram substituídos por formaldeído (Robertson et al. 2012). As principais diferenças presentes nas moléculas selecionadas, além do já descrito no núcleo da *Rhodadyn*, é a presença de cloro ligado ao anel aromático

do composto 7181860 e a presença de bromo no anel aromático do composto 7377558 (Figura 36).

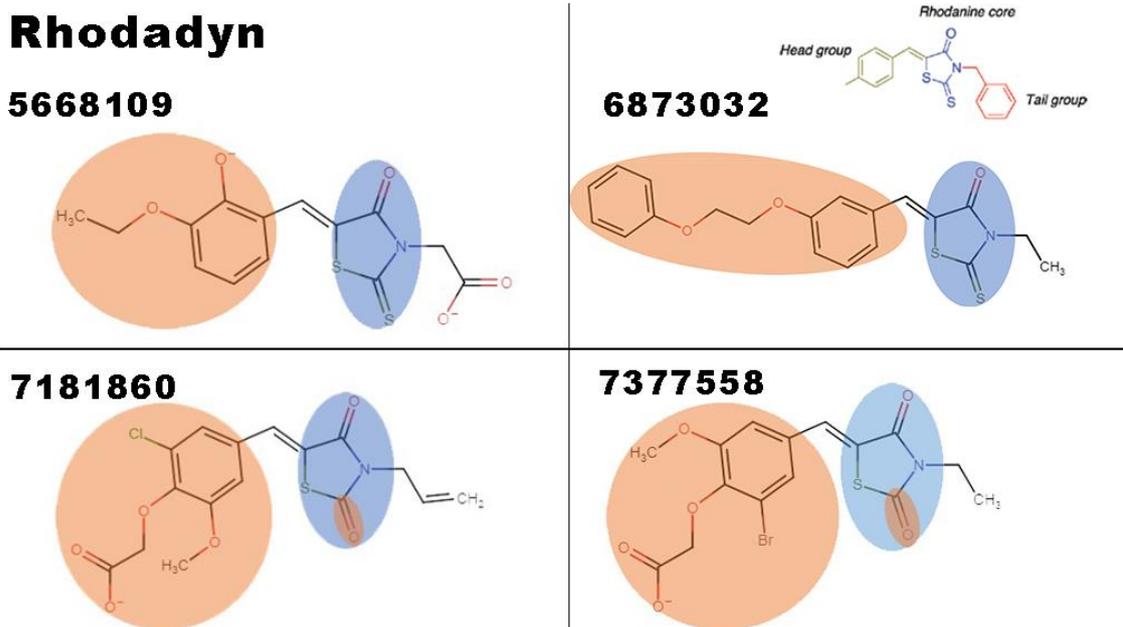


Figura 36 Imagem 2D dos compostos selecionados como potenciais inibidores similares a *rhodadyn* mostrando suas alterações do composto base. Em azul, a estrutura conservada do composto base; Em vermelho, a característica específica do composto, As características mantidas, a região azul, contém um grupo caudal pequeno (maior potência), o núcleo da *rhodadyn* (4-metilideno-1,3-tiazolidina-2-tiona) e um fenol ligado ao carbono. Nos compostos 7181860 e 7377558 foi substituído a dupla ligação a enxofre (tioformaldeído) e foram substituídos por oxigênio (formaldeído). As principais diferenças além das mencionadas é a presença de cloro ligado ao anel aromático do composto 7181860 e a presença de bromo no anel aromático do composto 7377558.

VI. Discussão

Esse trabalho utilizou diversos programas de bioinformática para estudar as DLPs de *P. falciparum*, com o intuito de (i) compreender suas possíveis funções; (ii) prever suas estruturas 3D, já que não foram determinadas experimentalmente, (iii) investigar os sítios de ligação a ligantes e (iv) priorizar possíveis inibidores por meio das abordagens de similaridade estrutural a inibidores de PfDYNs e *docking molecular*.

1. Análise *in silico* das DLPs de *P. falciparum*

As análises *in silico* das sequências primárias das DLPs de *P. falciparum* permitiram observar que elas compartilham características estruturais da família das dinaminas. PfDYN1 e PfDYN2 são estruturalmente similares, diferenciando apenas em uma região terminal de baixa complexidade, região que se acredita decodificar domínios de funções desconhecidas que não atrapalham a função do dobramento da proteína (Pizzi and Frontali 2001), na PfDYN1 que não existe na PfDYN2. Entretanto, a PfDYN3 se apresenta estruturalmente distinta de ambas, possuindo apenas o domínio da GTPase (*Dynamain_N*) e este não é bem

definido como nas outras dinaminas (Figura 12). Isso explica o porquê Li et al. 2004 e Charneau et al. 2007 não mencionaram essa proteína como uma DLP de *P. falciparum* uma vez que ela não possui todas as características que definiriam uma *dynamin-like*.

O alinhamento de sequências primárias entre algumas DLPs de organismos distintos com as 3 DLPs de *P. falciparum* pelo programa COBALT, permitiu observar que os domínios conservados são domínio N da GTPase e o domínio médio, sendo o domínio efetor o mais destoante, domínio esse responsável pela regulação da atividade enzimática (Figura 12).

Em um alinhamento sequencial feita com outros agrupamentos de dinaminas foi possível observar algumas similaridades. A PfDYN1 e a PfDYN2 são bastante similares entre si com relação a seus domínios e sequencialmente, devem possuir uma grande similaridade estrutural. Além disso elas são similares a DRPB e DRPA, respectivamente. Já a PfDYN3 possui uma sequência de aminoácidos e um tamanho molecular muito maiores quando comparados com os da PfDYN1 e da PfDYN2 e possui algumas distinções sequenciais, em especial na região média e terminal. Porém ela é extremamente similar a TgDRPC, o que pode dizer que sua estrutura e então suas funções celulares devem ser similares a essa DLP de *T. gondii*. Esses dados corroboram os dados obtidos por Li et al. 2004, Zhou et al. 2009, Elliott et al., Charneau et al. 2007, Stanway et al. 2009 e Melatti et al. 2019, que compararam DLPs homologas já conhecidas com as de *Plasmodium* a fim de deduzir suas funções e localização.

T. gondii e *P. falciparum* são parasitos unicelulares membros do mesmo filo Apicomplexa. As análises de sequências confirmaram a presença de 3 DLPs conservadas entre eles. A análise filogenética agrupou PfDYN1 com TgDRPB, que poderia ser envolvida na biogênese de organelas secretoras em *T. gondii* (Breinich et al. 2009). Enquanto, PfDYN1 foi sugerida participar da captação da hemoglobina e do tráfego intracelular (H. Li et al. 2004). PfDYN2 TgDRPA foram agrupadas e as duas são supostas por ser envolvidas na fissão da membrana mitocondrial externa (Charneau et al. 2007). TgDRPA foi descrita também por ser envolvida na fissão do apicoplasto em *T. gondii* (van Dooren et al. 2009). PfDYN3 está agrupada com a TgDRPC depositada sob o nome de sintetase arginil-tRNA no banco de dados, que se localiza em pontos no citoplasma e concentra-se na constrição da mitocôndria (Melatti et al. 2019). Portanto, as 3 DLPs de *P. falciparum* devem possuir funções similares das 3 DLPs de *T. gondii*.

Tendo em vista suas importâncias em diversos mecanismos de replicação organelar como a divisão do apicoplasto e mitocôndria (Charneau et al. 2007; Melatti et al. 2019), além de suas funções em vias metabólicas como endocitose, captação da hemoglobina e tráfego intracelular (Li et al. 2004; Zhou et al. 2009; Elliott et al. 2008; Chanez et al. 2006; Charneau et al. 2007) e que quando funcionam de maneira errada elas acabam induzindo a morte celular (Li et al. 2004; Melatti et al. 2019). Essas análises corroboram a importância dessas moléculas para o desenvolvimento do parasito e reafirmam a possibilidade delas se tornarem um alvo para fármacos.

2. Estruturas Tridimensionais e análises comparativas

Os modelos tridimensionais das 3 DLPs de *P. falciparum* que apresentaram os melhores resultados, segundo os parâmetros de qualidade obtidos através do servidor MolProbity, foram os modelos refinados do servidor AlphaFold.

Após a identificação dos melhores modelos, as proteínas foram então comparadas quanto suas características físicas utilizando programas de visualização para alinhá-las (Figura 14). Esses alinhamentos permitiram observar a similaridade estrutural entre os modelos da PfDYN1 e da PfDYN2 com a DLP homóloga escolhida como molde por ser cristalizada, a DNML1 humana 4BEJ (Fröhlich et al. 2013) . Além disso, permitiu observar algumas distinções. A PfDYN3 não se alinha corretamente com as outras duas DLPs e a sua predição pelo AlphaFold apresentou uma parte estrutural que assemelha ao domínio *Pleckstrin-Homology*. Este domínio não está presente nas PfDYN1 e PfDYN2, o que ressalta que a estrutura da PfDYN3 é mais distante e que precisa ser melhor estudada para compreender melhor seu funcionamento.

Graças à similaridade estrutural e sequencial entre a DNM1L humana e as PfDYN1 e PfDYN2, pode-se deduzir que o sítio ativo será conservado e estará aproximadamente na mesma posição. Portanto, como uma etapa prévia à predição dos sítios de ligação das DYN1 e DYN2, fizemos o alinhamento com a DNM1L humana (*PDB* ID: 3W6N (Kishida and Sugio 2013)), cujo sítio ativo do GTP foi previamente descrito (Faelber et al. 2011; Reubold et al. 2015; Ford, Jenni, and Nunnari 2011). Também foi realizada a predição de homodímeros (Figura 15) com o intuito de prever como seria a organização dimérica das DLPs. Os dois métodos utilizados trouxeram resultados similares e outras regiões foram observadas como possíveis regiões para interação da proteína com outras substâncias, principalmente na região média e terminal da proteína. Provavelmente essas regiões encontradas são as que os homômeros e proteínas auxiliares às dinaminas se ligam para formar o anel da dinamina.

3. Predição dos Sítios de ligação

Selecionamos os três melhores sítios preditos pelos servidores (Figura 17). As previsões para a PfDYN1 foram em geral em toda região da proteína, excetuando o FTSite, em que os melhores resultados se limitaram ao domínio da GTPase, todos os outros servidores encontraram no GED e no domínio médio, ambas as regiões podem funcionar como sítio ativo/região onde um fármaco pode ligar, pois são regiões de modulação de atividade da GTPase e uma região de interação e estruturação da proteína respectivamente. Para a PfDYN2 por outro lado, com exceção da predição do servidor DoGSite, predisse como sítio apenas a região da GTPase.

Os melhores sítios foram então comparados entre si para analisar sítios que foram preditos em mais de um programa, o que resultou na seleção de três

sítios para cada DLPs, para a PfDYN1 os melhores três resultados incluíam sítios preditos nos três domínios da dinamina, já para a PfDYN2 se limitou a região da GTPase, ambas as proteínas tiveram como melhores resultados dois sítios preditos pela PockDrug e um predito pelo FTSite (Figura 18).

Utilizando-se da comparação da Figura 14D, sabendo que o domínio da GTPase é conservado evolutivamente (Praefcke and McMahon 2004), escolheu-se utilizar para os testes subsequentes os sítios localizados na região da GTPase, assim como encontrado no sítio ativo da DNM1L humana (Faelber et al. 2011), portanto utilizou-se o sítio predito pelo FTSite para ambas as dinaminas.

4. Priorização de compostos para PfDYN1 e PfDYN2

Ao utilizar a base de dados ChEMBL foi possível detectar um conjunto de oito classes de inibidores de dinaminas, são eles: *dynasore* (ChEMBL1209885)(Macia et al. 2006), *dyngo-4a* (ChEMBL4071130) (McCluskey et al. 2013), *dynola* (ChEMBL483059)(Hill et al. 2009), *iminodyn* (ChEMBL1098764)(Hill et al. 2010), *longChain/MitMAB* (ChEMBL113150) (Hill et al. 2004), *mdiv* (ChEMBL4594349) (Y. Li, Wang, and Wang 2016), *quinone* (ChEMBL1812161) (Shrader et al. 2011) e *rhodadyn* (ChEMBL2062734)(Robertson et al. 2012). Todos eles já foram testados em outros organismos.

A partir desses inibidores gerou-se uma biblioteca de compostos através de uma busca por similaridade estrutural utilizando a biblioteca comercial ChemBridge. A procura de similares a compostos inibidores já conhecidos é um método já conhecido para busca de novas moléculas de funções similares e que inclusive foi o método utilizado para a descoberta de outros inibidores de dinamina (Hill et al. 2009). Os compostos foram selecionados com a porcentagem de similaridade distintas entre cada composto base para ser possível compor uma biblioteca com um número de moléculas derivadas similar entre cada inibidor que foi utilizado como base de pesquisa para o cálculo de *docking*. Portanto as similaridades estruturais selecionadas foram 60% para *dynasore*; 60% para *dyngo-4a*; 60% para *dynola*; 70% para *iminodyn*; 40% para *longChain/MitMAB*; 75% para *mdivi*; 50% para *quinona* e 85% para *Rhodadyn*, resultando em uma biblioteca com 7421 compostos que ao retirar as duplicatas sobraram 6886 compostos, que então foram preparados no programa Glide para a correta protonação dos compostos em pH ótimo da atividade para a família de dinamina $8 \pm 0,5$.

Os cálculos de *docking* foram realizados no melhor sítio predito para cada uma das DLPs, o sítio GTP.

5. Análises das interações moleculares

Durante a criação e desenvolvimento dos inibidores de dinamina, algumas características delas favoreceram a sua capacidade de inibir a enzima, portanto,

para a seleção dos candidatos, esses achados foram levados em consideração junto ao resultado de *docking* quando as moléculas foram selecionadas.

As duas moléculas selecionadas derivadas de *Dynasore* foram a 5318676 (Figura 20), que possui um *docking* score, logo, uma afinidade bastante próxima entre as duas PfDYNs, porém levemente maior para a PfDYN1, o que pode ser explicado pelo fato dela ter realizado mais ligações de hidrogênio ao se ligar com a PfDYN1. A outra molécula foi a 5321707 (Figura 21) que também possuiu uma maior afinidade a PfDYN1, que pode ser explicado pelo mesmo motivo que a primeira mencionada.

A presença do cloro na molécula derivada de *Dynngo-4a* 5367002 (Figura 22) resultou em uma ligação halogênica com a treonina 245 da PfDYN1, o que não ocorreu com a PfDYN2, isso pode explicar em parte o porquê de ela ter tido uma boa afinidade com a PfDYN1 e não ter ligado bem com a PfDYN2, que estava exposto ao solvente. A outra molécula selecionada, 8806659 (Figura 23), também teve uma expressiva maior afinidade a PfDYN1, provavelmente o que explica isso foi o fato das ligações de hidrogênio terem ocorrido de maneira mais bem distribuída para PfDYN1, ao contrário do que ocorreu na PfDYN2, no qual a região onde ocorreu exposição ao solvente estava apenas unido por uma ligação pi-catiônica e apenas uma pequena região houve de fato alguma ligação mais forte.

A molécula 6009726 (Figura 24), derivada da *dynole*, apresentou uma energia de interação maior a PfDYN1, mas com pouca diferença da afinidade apresentada para PfDYN2, que mesmo apresentando mais ligações de hidrogênio, provavelmente por conta de uma grande região exposta ao solvente e que somente teve interação por polaridade com a glutamina 242 pode ter resultado em uma afinidade menor. A outra molécula derivada selecionada foi a 8880132 (Figura 25) interagiu com bastante similaridade entre as duas dinaminas de *P. falciparum* a única diferença é que teve uma ligação de hidrogênio a mais para a PfDYN1.

A molécula derivada de *Iminodyn* 5103008 (Figura 26), teve uma diferença considerável de escores de *docking* entre as duas dinaminas, sendo que ela possui maior afinidade para PfDYN1, mesmo que a PfDYN2 apresente, inclusive, mais ligações de hidrogênio, porém a interação não ocorreu com muitos aminoácidos e uma parte da molécula inclusive não interagiu a nada do sítio ativo da PfDYN2, ao contrário da PfDYN1 no qual a interação foi bastante homogênea, reforçando a importância das interações por hidrofobicidade, polaridade e carga na interação molecular. A molécula 5103018 (Figura 27) apresentou um resultado muito similar para ambas as dinaminas.

Foram escolhidas quatro moléculas derivadas de *Rhododyn*. A molécula 5668109 (Figura 28) apresentou uma alta energia de interação para ambas as dinaminas, porém a quantidade de ligações de hidrogênio e a interação iônica na arginina 50 fez com que houvesse uma maior afinidade a PfDYN1. a molécula 6873032 (Figura 29) também obteve uma boa interação para ambas as dinaminas, porém a interação com a PfDYN1 foi melhor pois o número de

ligações de hidrogênio foi maior além das interações por hidrofobicidade, polaridade e carga ocorreu por toda a molécula, o que não ocorreu na interação com a PfDYN2, que teve o enxofre do núcleo da rodanina exposto ao solvente. A molécula 7181860 (Figura 30) interagiu de maneira similar entre as duas dinaminas, porém interagiu um pouco melhor com a PfDYN2 por ter duas ligações halogênicas e uma interação iônica na lisina 39 da PfDYN2. A última molécula escolhida foi a 7377558 (Figura 31), que possui uma boa afinidade com as duas, mas apresentou maior afinidade a PfDYN2, uma vez que ocorreram interações em todas as regiões da molécula e uma interação iônica na lisina 54 da PfDYN2 havendo apenas uma região com exposição ao solvente que foi exatamente no bromo.

É válido reforçar que ainda é necessário realizar experimentos *in vitro* para confirmar a capacidade inibitória dessas moléculas. Com relação às diferenças de energia de interação entre as moléculas e as dinaminas de *P. falciparum*, caso confirmadas serem suficientemente distintas para realizar uma inibição seletiva, inibindo apenas uma das duas dinaminas de *Plasmodium*, levantam a possibilidade dessas moléculas serem usadas no laboratório para auxiliar na determinação das funções das PfDYNs. O resultado positivo desses testes também permite indagar a possibilidade da utilização de um inibidor de dinamina que seja específico ao *Plasmodium spp.* e que não afete as dinaminas humanas como um possível fármaco antimalárico.

6. Planejamento de fármaco auxiliado por computador (CADD)

A evolução nos estudos genômicos, transcriptômicos e proteômicos e a riqueza dos dados coletados em vários anos de pesquisa permitiu a produção massiva de dados biológicos o que tornou a informatização desses dados uma necessidade (Chen, Huang, and Wu 2017; Shivakumar Keerthikumar 2016; Akalin 2006). A P&D, como já mencionado, é um processo longo e altamente custoso, tendo uma duração média de 13 anos e um custo de 2,6 bilhões de dólares (Rao 2020; Wouters, McKee, and Luyten 2020; DiMasi, Grabowski, and Hansen 2016). Os inúmeros bancos de dados moleculares existentes reúnem milhares de compostos que podem atuar como fármacos, porém é inviável a experimentação com todas essas moléculas.

O CADD surgiu como uma forma de lidar com essa problemática. O avanço tecnológico permitiu o desenvolvimento de hardwares e softwares mais poderosos e que são capazes de lidar com dados cada vez mais densos de maneira rápida e eficiente. Estas ferramentas se tornaram então essenciais para o planejamento e análise de dados, biológicos, químicos ou físicos, que resulta em uma maior eficiência no processo de desenvolvimento de fármacos, além de uma redução de custo e aumento na taxa de sucesso da P&D (Andrade et al. 2019; Drewry et al. 2019; Neves et al. 2018; Xu and Hagler 2002; Macalino et al. 2015).

Esse projeto utilizou técnicas de SBDD para a priorização de compostos estruturalmente similares a inibidores de dinaminas em busca de novos

inibidores específicos para as dinaminas de *P. falciparum*. O primeiro passo do SBDD envolve conhecer a estrutura 3D da macromolécula estudada, como não há cristalografia das PfDYNs, o projeto iniciou, e foi bem sucedido, na construção de um modelo 3D de alta qualidade por meio do servidor AlphaFold (Jumper et al. 2021) com o refinamento estrutural usando o programa GalaxyRefine (Heo, Park, and Seok 2013), obtendo modelos com resoluções que variam de 1,1 a 1,6 Å, o que é considerado pelo MolProbity um modelo de alta qualidade (Davis et al. 2007). Por meio do servidor FTSite (Ngan et al. 2012), obtivemos uma predição de sítio ativo para a PfDYN1 e 2, sendo que os aminoácidos que os compõem, em geral, são conservados evolutivamente, corroborando com a qualidade dos sítios preditos. Após todas essas etapas foi possível realizar o docking molecular a partir da biblioteca de 2134 compostos construída utilizando a biblioteca comercial ChemBridge. O docking realizado com o programa Glide (Friesner et al. 2006; Schrödinger 2021; Halgren et al. 2004) permitiu a seleção de 12 compostos que possuíam afinidade com pelo menos uma das duas dinaminas de *P. falciparum*. Uma inibição específica de cada dinamina permitirá experimentos de determinação funcional, aumentando ainda mais o conhecimento dessas enzimas. Esses compostos selecionados serão testados para saber sua capacidade de inibição das PfDYNs.

VII. Conclusão

No presente trabalho, foram utilizadas abordagens computacionais para o estudo das dinaminas de *P. falciparum*, alvos promissores para desenvolvimento de fármacos contra malária. Os resultados dos modelos tridimensionais das PfDYN1 e PfDYN2 permitiram analisar homologias e diferenças entre dinaminas e seus impactos nas diferentes funções. Essas diferenças estruturais podem dar luz a questões como localização celular e funções diferente de cada uma. Baseado no fato que a função é dependente das estruturas e as interações também dependem dessa estrutura, é possível supor que essas diferenças de estruturas somado com as diferentes interações que elas fazem, devem ocasionar a interação seletiva com membranas de composição diferente ou membranas de compartimentos celulares diferentes. Um inconveniente foi a impossibilidade de obtermos um modelo estrutural da PfDYN3 inteira, pois ela tem uma sequência primária muito grande (alguns servidores não conseguem realizar a predição adequadamente) e devido ao fato dela ser bem diferente da estrutura da DLP cristalizada DNML1 que serviu de molde. Assim realizamos a busca por compostos somente para PfDYN1 e PfDYN2.

A partir dos modelos tridimensionais construídos nesse trabalho e das predições dos sítios ativos dessas proteínas foi possível selecionar através de análise de similaridade estrutural, para geração de uma biblioteca de compostos, e testes de *docking* molecular dessa biblioteca gerada um conjunto de 12 potenciais inibidores de PfDYN1 e PfDYN2. Essas análises ressaltam a

capacidade das técnicas computacionais de otimizar tempo, recurso humano e financeiro para descoberta de novos agentes contra malária.

Futuramente, a inibição de crescimento do parasito por curva de dose-resposta *in vitro*, assim como a inibição enzimática, serão testadas. Espera-se encontrar dentre essas moléculas novas ferramentas de estudo do tráfego intracelular e da formação das organelas de *P. falciparum*, além de novos compostos bioativos com um mecanismo de ação diferente dos que existem hoje, para evitar resistência cruzada e assim criar um novo grupo de fármacos antimaláricos.

VIII. Referências:

- Achan, Jane, Ambrose O. Talisuna, Annette Erhart, Adoke Yeka, James K. Tibenderana, Frederick N. Baliraine, Philip J. Rosenthal, and Umberto D'Alessandro. 2011. "Quinine, an Old Anti-Malarial Drug in a Modern World: Role in the Treatment of Malaria." *Malaria Journal* 10 (1): 144. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144>.
- Acharya, Pragyan, Manika Garg, Praveen Kumar, Akshay Munjal, and K. D. Raja. 2017. "Host–Parasite Interactions in Human Malaria: Clinical Implications of Basic Research." *Frontiers in Microbiology* 8 (MAY): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00889>.
- Adasme, Melissa F., Katja L. Linnemann, Sarah Naomi Bolz, Florian Kaiser, Sebastian Salentin, V. Joachim Haupt, and Michael Schroeder. 2021. "PLIP 2021: Expanding the Scope of the Protein-Ligand Interaction Profiler to DNA and RNA." *Nucleic Acids Research* 49 (W1): W530–34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab294>.
- Agamah, Francis E., Delesa Damena, Michelle Skelton, Anita Ghansah, Gaston K. Mazandu, and Emile R. Chimusa. 2021. "Network-Driven Analysis of Human–Plasmodium Falciparum Interactome: Processes for Malaria Drug Discovery and Extracting in Silico Targets." *Malaria Journal* 20 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03955-0>.
- Ahmadpour, Ehsan, Masoud Foroutan-Rad, Hamidreza Majidani, Sirous Mehrani Moghaddam, Kareem Hatam-Nahavandi, Seyed Abdollah Hosseini, Mohammad Taghi Rahimi, et al. 2019. "Transfusion-Transmitted Malaria: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Open Forum Infectious Diseases* 6 (7): 1–8. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz283>.
- Akalin, Pinar Kondu. 2006. "Introduction to Bioinformatics." *Molecular Nutrition and Food Research* 50 (7): 610–19. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500273>.
- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

- Alves, Fabiana P., Rui R. Durlacher, Maria J. Menezes, Henrique Krieger, Luiz H. Pereira da Silva, and Erney P. Camargo. 2002. "High Prevalence of Asymptomatic Plasmodium Vivax and Plasmodium Falciparum Infections in Native Amazonian Populations." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66 (6): 641–48. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.641>.
- Andrade, Carolina Horta, Bruno Junior Neves, Cleber Camilo Melo-Filho, Juliana Rodrigues, Diego Cabral Silva, Rodolpho Campos Braga, and Pedro Vitor Lemos Cravo. 2019. "In Silico Chemogenomics Drug Repositioning Strategies for Neglected Tropical Diseases." *Current Medicinal Chemistry* 26 (23): 4355–79. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180309114824>.
- Annett, Stephanie. 2021. "Pharmaceutical Drug Development: High Drug Prices and the Hidden Role of Public Funding." *Biologia Futura* 72 (2): 129–38. <https://doi.org/10.1007/s42977-020-00025-5>.
- Antony, Hiasindh Ashmi, and Subhash Chandra Parija. 2016. "Antimalarial Drug Resistance: An Overview." *Tropical Parasitology* 6 (1): 30–41. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.175081>.
- Ariey, Frédéric, Benoit Witkowski, Chanaki Amaratunga, Johann Beghain, Anne-Claire Langlois, Nimol Khim, Saorin Kim, et al. 2014. "A Molecular Marker of Artemisinin-Resistant Plasmodium Falciparum Malaria." *Nature* 505 (7481): 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature12876>.
- Ashley, Elizabeth A., Aung Pyae Phyo, and Charles J. Woodrow. 2018. "Malaria." *The Lancet* 391 (10130): 1608–21. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30324-6).
- Avorn, Jerry. 2015. "The \$2.6 Billion Pill — Methodologic and Policy Considerations." *New England Journal of Medicine* 372 (20): 1877–79. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1500848>.
- Baek, Minkyung, Taeyong Park, Lim Heo, Chiwook Park, and Chaok Seok. 2017. "GalaxyHomomer: A Web Server for Protein Homo-Oligomer Structure Prediction from a Monomer Sequence or Structure." *Nucleic Acids Research* 45 (W1): W320–24. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx246>.
- Baig, Mohammad Hassan, Khurshid Ahmad, Sudeep Roy, Jalaluddin Mohammad Ashraf, Mohd Adil, Mohammad Haris Siddiqui, Saif Khan, Mohammad Amjad Kamal, Ivo Provazník, and Inho Choi. 2016. "Computer Aided Drug Design: Success and Limitations." *Current Pharmaceutical Design* 22 (5): 572–81. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151125000550>.
- Baker, David A. 2010. "Malaria Gametocytogenesis." *Molecular and Biochemical Parasitology* 172 (2): 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019>.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna, and G. H. Mitchell. 2000. "A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium Falciparum Asexual Blood Stages." *Parasitology Today* 16 (10): 427–33. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01755-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01755-5).
- Barbosa, Susana, Amanda B. Gozze, Nathália F. Lima, Camilla L. Batista,

- Melissa da Silva Bastos, Vanessa C. Nicolete, Pablo S. Fontoura, et al. 2014. "Epidemiology of Disappearing Plasmodium Vivax Malaria: A Case Study in Rural Amazonia." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003109>.
- Barros-Barreto, J. 1940. "Malária: Doutrina e Prática." *Rio de Janeiro: Editora a Noite*.
- Batool, Maria, Bilal Ahmad, and Sangdun Choi. 2019. "A Structure-Based Drug Discovery Paradigm." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112783>.
- Berg, Henk Van Den, Gamini Manuweera, and Flemming Konradsen. 2017. "Global Trends in the Production and Use of DDT for Control of Malaria and Other Vector - Borne Diseases." *Malaria Journal*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2050-2>.
- Berman, H. M. 2000. "The Protein Data Bank." *Nucleic Acids Research* 28 (1): 235–42. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- Bezerra, Juliana Maria Trindade, David Soeiro Barbosa, Francisco Rogerlândio Martins-Melo, Guilherme Loureiro Werneck, Érika Martins Braga, Pedro Luiz Taul, and Mariângela Carneiro. 2020. "Changes in Malaria Patterns in Brazil over 28 Years (1990–2017): Results from the Global Burden of Disease Study 2017." *Population Health Metrics* 18 (S1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12963-020-00211-6>.
- Bhagavathula, Akshaya Srikanth, Asim Ahmed Elnour, and Abdulla Shehab. 2016. "Alternatives to Currently Used Antimalarial Drugs: In Search of a Magic Bullet." *Infectious Diseases of Poverty* 5 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0196-8>.
- Bleicher, Konrad H., Hans Joachim Böhm, Klaus Müller, and Alexander I. Alanine. 2003. "Hit and Lead Generation: Beyond High-Throughput Screening." *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (5): 369–78. <https://doi.org/10.1038/nrd1086>.
- Blum, Matthias, Hsin Yu Chang, Sara Chuguransky, Tiago Grego, Swaathi Kandasamy, Alex Mitchell, Gift Nuka, et al. 2021. "The InterPro Protein Families and Domains Database: 20 Years On." *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D344–54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>.
- Boratyn, Grzegorz M., Alejandro A. Schäffer, Richa Agarwala, Stephen F. Altschul, David J. Lipman, and Thomas L. Madden. 2012. "Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST." *Biology Direct* 7: 1–14. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-12>.
- Borrel, Alexandre, Leslie Regad, Henri Xhaard, Michel Petitjean, and Anne Claude Camproux. 2015. "PockDrug: A Model for Predicting Pocket Druggability That Overcomes Pocket Estimation Uncertainties." *Journal of Chemical Information and Modeling* 55 (4): 882–95. <https://doi.org/10.1021/ci5006004>.
- Braga, Rodolpho C, Vinicius M Alves, Arthur C Silva, Marilia N Nascimento, Flavia C Silva, Luciano M Liao, and Carolina H Andrade. 2014. "Virtual

- Screening Strategies in Medicinal Chemistry: The State of the Art and Current Challenges.” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 14 (16): 1899–1912. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140929120749>.
- Brasil, Patrícia, Mariano Gustavo Zalis, Anielle de Pina-Costa, Andre Machado Siqueira, Cesare Bianco Júnior, Sidnei Silva, André Luiz Lisboa Areas, et al. 2017. “Outbreak of Human Malaria Caused by Plasmodium Simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A Molecular Epidemiological Investigation.” *The Lancet Global Health* 5 (10): e1038–46. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9).
- Breeveld, Florence Jv, Stephen Gs Vreden, and Martin P. Grobusch. 2012. “History of Malaria Research and Its Contribution to the Malaria Control Success in Suriname: A Review.” *Malaria Journal* 11: 1–7. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-9522458802>.
- Breinich, Manuela S., David J.P. Ferguson, Bernardo J. Foth, Giel G. van Dooren, Maryse Lebrun, Doris V. Quon, Boris Striepen, et al. 2009a. “A Dynamin Is Required for the Biogenesis of Secretory Organelles in Toxoplasma Gondii.” *Current Biology* 19 (4): 277–86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.039>.
- . 2009b. “A Dynamin Is Required for the Biogenesis of Secretory Organelles in Toxoplasma Gondii.” *Current Biology* 19 (4): 277–86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.039>.
- Briand, V., C. Badaut, and M. Cot. 2009. “Placental Malaria, Maternal HIV Infection and Infant Morbidity.” *Annals of Tropical Paediatrics* 29 (2): 71–83. <https://doi.org/10.1179/146532809X440699>.
- Brickley, Elizabeth B., Natasha Spottiswoode, Edward Kabyemela, Robert Morrison, Jonathan D. Kurtis, Angela M. Wood, Hal Drakesmith, Michal Fried, and Patrick E. Duffy. 2016. “Cord Blood Hepcidin: Cross-Sectional Correlates and Associations with Anemia, Malaria, and Mortality in a Tanzanian Birth Cohort Study.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95 (4): 817–26. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0218>.
- Burley, Stephen K., Charmi Bhikadiya, Chunxiao Bi, Sebastian Bittrich, Li Chen, Gregg V. Crichlow, Cole H. Christie, et al. 2021. “RCSB Protein Data Bank: Powerful New Tools for Exploring 3D Structures of Biological Macromolecules for Basic and Applied Research and Education in Fundamental Biology, Biomedicine, Biotechnology, Bioengineering and Energy Sciences.” *Nucleic Acids Research* 49 (1): D437–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>.
- Callaway, Ewen. 2020. “‘It Will Change Everything’: DeepMind’s AI Makes Gigantic Leap in Solving Protein Structures.” *Nature*. England. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-03348-4>.
- Carlos, Bianca C., Luisa D.P. Rona, George K. Christophides, and Jayme A. Souza-Neto. 2019. “A Comprehensive Analysis of Malaria Transmission in Brazil.” *Pathogens and Global Health* 113 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1581463>.
- Chandre, Fabrice, Haoues Alout, Innocent Dje, Roch Kounbobr Dabire, Vincent

- Corbel, Anna Cohuet, and V Corbel. 2014. "Insecticide Exposure Impacts Vector – Parasite Interactions in Insecticide- Resistant Malaria Vectors."
- Chanez, Anne Laure, Adrian B. Hehl, Markus Engstler, and André Schneider. 2006. "Ablation of the Single Dynamin of *T. Brucei* Blocks Mitochondrial Fission and Endocytosis and Leads to a Precise Cytokinesis Arrest." *Journal of Cell Science* 119 (14): 2968–74. <https://doi.org/10.1242/jcs.03023>.
- Chang, Zengyi. 2016. "The Discovery of Qinghaosu (Artemisinin) as an Effective Anti-Malaria Drug: A Unique China Story." *Science China Life Sciences* 59 (1): 81–88. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4988-z>.
- Charneau, Sébastien, Izabela M. Dourado Bastos, Elisabeth Mouray, Bergmann Morais Ribeiro, Jaime M. Santana, Philippe Grellier, and Isabelle Florent. 2007. "Characterization of PfDYN2, a Dynamin-like Protein of *Plasmodium Falciparum* Expressed in Schizonts." *Microbes and Infection* 9 (7): 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.020>.
- Chehuan, Yonne F., Monica Rf Costa, Jacqueline S. Costa, Maria Gc Alecrim, Fátima Nogueira, Henrique Silveira, Larissa W. Brasil, Gisely C. Melo, Wuelton M. Monteiro, and Marcus Vg Lacerda. 2013. "In Vitro Chloroquine Resistance for *Plasmodium Vivax* Isolates from the Western Brazilian Amazon." *Malaria Journal* 12 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-226>.
- Chen, Chuming, Hongzhan Huang, and Cathy H. Wu. 2017. *Protein Bioinformatics Databases and Resources. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1558. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6783-4_1.
- "CINCHONA BARK AND ITS ALKALOIDS." 1924. *British Medical Journal* 1 (3310): 1023–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20771618>.
- Clayton, April M., Yuemei Dong, and George Dimopoulos. 2014. "The Anopheles Innate Immune System in the Defense against Malaria Infection." *Journal of Innate Immunity* 6 (2): 169–81. <https://doi.org/10.1159/000353602>.
- Cornwell, M. M., A. R. Safa, R. L. Felsted, M. M. Gottesman, and I. Pastan. 1986. "Membrane Vesicles from Multidrug-Resistant Human Cancer Cells Contain a Specific 150- to 170-KDa Protein Detected by Photoaffinity Labeling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (11): 3847–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3847>.
- Cowman, Alan F., Julie Healer, Danushka Marapana, and Kevin Marsh. 2016. "Malaria: Biology and Disease." *Cell* 167 (3): 610–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>.
- Cox-Singh, J., Timothy M E Davis, K.-S. Lee, S. S. G. Shamsul, A. Matusop, S. Ratnam, H. A. Rahman, D. J. Conway, and B. Singh. 2008. "Plasmodium Knowlesi Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening." *Clinical Infectious Diseases* 46 (2): 165–71. <https://doi.org/10.1086/524888>.
- Cutler, David M. 2020. "Are Pharmaceutical Companies Earning Too Much?" *JAMA* 323 (9): 829. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.0351>.

- Datoo, Mehreen S., Magloire H. Natama, Athanase Somé, Ousmane Traoré, Toussaint Rouamba, Duncan Bellamy, Prisca Yameogo, et al. 2021. "Efficacy of a Low-Dose Candidate Malaria Vaccine, R21 in Adjuvant Matrix-M, with Seasonal Administration to Children in Burkina Faso: A Randomised Controlled Trial." *The Lancet* 397 (10287): 1809–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00943-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00943-0).
- Davies, Mark, Michał Nowotka, George Papadatos, Nathan Dedman, Anna Gaulton, Francis Atkinson, Louisa Bellis, and John P. Overington. 2015. "ChEMBL Web Services: Streamlining Access to Drug Discovery Data and Utilities." *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W612–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv352>.
- Davis, Ian W., Andrew Leaver-Fay, Vincent B. Chen, Jeremy N. Block, Gary J. Kapral, Xueyi Wang, Laura W. Murray, et al. 2007. "MolProbity: All-Atom Contacts and Structure Validation for Proteins and Nucleic Acids." *Nucleic Acids Research* 35 (SUPPL.2): 375–83. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm216>.
- Deane, L. 1992. "Os Grandes Marcos Na História Do Controle Da Malária." *Rev Soc Bras Med Trop* out-dez;25.
- DiMasi, Joseph A., Henry G. Grabowski, and Ronald W. Hansen. 2016. "Innovation in the Pharmaceutical Industry: New Estimates of R&D Costs." *Journal of Health Economics* 47: 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>.
- Doolan, Denise L., Carlota Dobaño, and J. Kevin Baird. 2009. "Acquired Immunity to Malaria." *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1): 13–36. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08>.
- Dooren, Giel G. van, Sarah B. Reiff, Cveta Tomova, Markus Meissner, Bruno M. Humbel, and Boris Striepen. 2009. "A Novel Dynamin-Related Protein Has Been Recruited for Apicoplast Fission in *Toxoplasma Gondii*." *Current Biology* 19 (4): 267–76. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.048>.
- Douglas, Nicholas M., Daniel A. Lampah, Enny Kenangalem, Julie A. Simpson, Jeanne R. Poespoprodjo, Paulus Sugiarto, Nicholas M. Anstey, and Ric N. Price. 2013. "Major Burden of Severe Anemia from Non-Falciparum Malaria Species in Southern Papua: A Hospital-Based Surveillance Study." *PLoS Medicine* 10 (12): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001575>.
- Drewry, David H., Carrow I. Wells, William J. Zuercher, and Timothy M. Willson. 2019. "A Perspective on Extreme Open Science: Companies Sharing Compounds without Restriction." *SLAS Discovery* 24 (5): 505–14. <https://doi.org/10.1177/2472555219838210>.
- Du, Zongyang, Hong Su, Wenkai Wang, Lisha Ye, Hong Wei, Zhenling Peng, Ivan Anishchenko, David Baker, and Jianyi Yang. 2021. "The TrRosetta Server for Fast and Accurate Protein Structure Prediction" 16 (December). <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00628-9>.
- Eastman, Richard T., Neekesh V. Dharia, Elizabeth A. Winzeler, and David A. Fidock. 2011. "Piperaquine Resistance Is Associated with a Copy Number Variation on Chromosome 5 in Drug-Pressured *Plasmodium Falciparum*

- Parasites." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (8): 3908–16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01793-10>.
- Ekland, Eric H., and David A. Fidock. 2008. "In Vitro Evaluations of Antimalarial Drugs and Their Relevance to Clinical Outcomes." *International Journal for Parasitology* 38 (7): 743–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.004>.
- Elliott, David A., Michael T. McIntosh, H. Dean Hosgood, Shuo Chen, Gina Zhang, Pavlina Baevova, and Keith A. Joiner. 2008. "Four Distinct Pathways of Hemoglobin Uptake in the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7): 2463–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711067105>.
- Epik, and LLC Schrödinger. n.d. "Schrödinger Release 2022-3: Protein Preparation Wizard."
- Faelber, Katja, York Posor, Song Gao, Martin Held, Yvette Roske, Dennis Schulze, Volker Haucke, Frank Noé, and Oliver Daumke. 2011. "Crystal Structure of Nucleotide-Free Dynamin." *Nature* 477 (7366): 556–62. <https://doi.org/10.1038/nature10369>.
- Ferreira, Leonardo G., Ricardo N. Dos Santos, Glaucius Oliva, and Adriano D. Andricopulo. 2015. *Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies*. *Molecules*. Vol. 20. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- Ferreira, Marcelo U., and Marcia C. Castro. 2016. "Challenges for Malaria Elimination in Brazil." *Malaria Journal* 15 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1335-1>.
- Filho, Franklin Simoes de Santana, Ana Ruth De Lima Arcanjo, Yonne Melo Chehuan, Monica Regina Costa, Flor Ernestina Martinez-Espinosa, Jose Luis Vieira, Maria Das Graças Vale Barbosa, Wilson Duarte Alecrim, and Maria Das Graças Costa Alecrim. 2007. "Chloroquine-Resistant *Plasmodium Vivax*, Brazilian Amazon." *Emerging Infectious Diseases* 13 (7): 1125–26. <https://doi.org/10.3201/eid1307.061386>.
- Fojo, A, S Akiyama, M M Gottesman, and I Pastan. 1985. "Reduced Drug Accumulation in Multiply Drug-Resistant Human KB Carcinoma Cell Lines." *Cancer Research* 45 (7): 3002–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4005839>.
- Ford, Marijn G.J., Simon Jenni, and Jodi Nunnari. 2011. "The Crystal Structure of Dynamin." *Nature* 477 (7366): 561–66. <https://doi.org/10.1038/nature10441>.
- Frevert, Ute, Sabine Engelmann, Sergine Zougbedé, Jörg Stange, Bruce Ng, Kai Matuschewski, Leonard Liebes, and Herman Yee. 2005. "Intravital Observation of *Plasmodium Berghei* Sporozoite Infection of the Liver." *PLoS Biology* 3 (6): 1034–46. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030192>.
- Fried, Michal, and Patrick E. Duffy. 2017. "Malaria during Pregnancy." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (6): 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025551>.

- Friesner, Richard A., Jay L. Banks, Robert B. Murphy, Thomas A. Halgren, Jasna J. Klicic, Daniel T. Mainz, Matthew P. Repasky, et al. 2004. "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy." *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (7): 1739–49. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>.
- Friesner, Richard A., Robert B. Murphy, Matthew P. Repasky, Leah L. Frye, Jeremy R. Greenwood, Thomas A. Halgren, Paul C. Sanschagrin, and Daniel T. Mainz. 2006a. "Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes." *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (21): 6177–96. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>.
- . 2006b. "Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes." *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (21): 6177–96. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>.
- Fröhlich, Chris, Stefan Grabiger, David Schwefel, Katja Faelber, Eva Rosenbaum, Jason Mears, Oliver Rocks, and Oliver Daumke. 2013. "Structural Insights into Oligomerization and Mitochondrial Remodelling of Dynamin 1-like Protein." *The EMBO Journal* 32 (9): 1280–92. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.74>.
- Gagic, Zarko, Dusan Ruzic, Nemanja Djokovic, Teodora Djikic, and Katarina Nikolic. 2020. "In Silico Methods for Design of Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs." *Frontiers in Chemistry* 7 (January): 1–25. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00873>.
- Garavelli, Pietro Luigi, and Elio Corti. 1992. "Chloroquine Resistance in Plasmodium Vivax: The First Case in Brazil." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86 (2): 128. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90535-K](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90535-K).
- Gardner, Malcolm J., Neil Hall, Eula Fung, Owen White, Matthew Berriman, Richard W. Hyman, Jane M. Carlton, et al. 2002. "Genome Sequence of the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Nature* 419 (6906): 498–511. <https://doi.org/10.1038/nature01097>.
- Gaulton, Anna, Anne Hersey, Micha L. Nowotka, A. Patricia Bento, Jon Chambers, David Mendez, Prudence Mutowo, et al. 2017. "The ChEMBL Database in 2017." *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D945–54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1074>.
- Global Malaria Programme: WHO Global. 2021. *World Malaria Report 2021*. Edited by WHO. WHO Regional Office. Vol. 1. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/350147>.
- Goldsmith, K. 1946. "A Controlled Field Trial of SN 7618-5 (Chloroquine) for the Suppression of Malaria." *Journal of the Malaria Institute of India* 6 (3): 311–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20282619>.
- Greenwood, B., K. Marsh, and R. Snow. 1991. "Why Do Some African Children Develop Severe Malaria?" *Parasitology Today* 7 (10): 277–81. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90096-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90096-7).

- Gu, H M, B F Lu, and Z X Qu. 1980. "Antimalarial activities of 25 derivatives of artemisinin against chloroquine-resistant plasmodium berghei. transl." *Acta Pharmacologica Sinica; Vol 1, No 1 (September 1980): Acta Pharmacologica Sinica* 1 (1): 48–50.
- Guedes, Isabella A, Camila S de Magalhães, and Laurent E Dardenne. 2014. "Receptor–Ligand Molecular Docking." *Biophysical Reviews* 6 (1): 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>.
- Guex, Nicolas, and Manuel C. Peitsch. 1997. "SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An Environment for Comparative Protein Modeling." *Electrophoresis* 18 (15): 2714–23. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>.
- Halgren, Thomas A., Robert B. Murphy, Richard A. Friesner, Hege S. Beard, Leah L. Frye, W. Thomas Pollard, and Jay L. Banks. 2004a. "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening." *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (7): 1750–59. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>.
- . 2004b. "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening." *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (7): 1750–59. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>.
- Heo, Lim, Hahnbeom Park, and Chaok Seok. 2013. "GalaxyRefine: Protein Structure Refinement Driven by Side-Chain Repacking." *Nucleic Acids Research* 41 (Web Server issue): 384–88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>.
- Hill, Timothy A., Christopher P. Gordon, Andrew B. McGeachie, Barbara Venn-Brown, Luke R. Odell, Ngoc Chau, Annie Quan, et al. 2009. "Inhibition of Dynamin Mediated Endocytosis by the Dynoles —Synthesis and Functional Activity of a Family of Indoles." *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (12): 3762–73. <https://doi.org/10.1021/jm900036m>.
- Hill, Timothy A., Anna Mariana, Christopher P. Gordon, Luke R. Odell, Mark J. Robertson, Andrew B. McGeachie, Ngoc Chau, et al. 2010. "Iminochromene Inhibitors of Dynamins I and II GTPase Activity and Endocytosis." *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (10): 4094–4102. <https://doi.org/10.1021/jm100119c>.
- Hill, Timothy A., Luke R. Odell, Annie Quan, Ruben Abagyan, Gemma Ferguson, Phillip J. Robinson, and Adam McCluskey. 2004. "Long Chain Amines and Long Chain Ammonium Salts as Novel Inhibitors of Dynamin GTPase Activity." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 14 (12): 3275–78. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.03.096>.
- Holenz, Joerg, and Patrick Stoy. 2019. "Advances in Lead Generation." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 29 (4): 517–24. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.12.001>.
- Howes, Rosalind E., Robert C. Reiner, Katherine E. Battle, Joshua Longbottom, Bonnie Mappin, Dariya Ordanovich, Andrew J. Tatem, et al. 2015. "Plasmodium Vivax Transmission in Africa." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (11): 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004222>.

- Howes, Rosalind E, Mewahyu Dewi, Mariana M Hogg, Katherine E Battle, Carmencita D Padilla, J Kevin Baird, and Simon I Hay. 2012. "G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map" 9 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001339>.
- Hsu, Elisabeth. 2006. "Reflections on the 'discovery' of the Antimalarial Qinghao." *British Journal of Clinical Pharmacology* 61 (6): 666–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02673.x>.
- Huang, Conrad C., Elaine C. Meng, John H. Morris, Eric F. Pettersen, and Thomas E. Ferrin. 2014. "Enhancing UCSF Chimera through Web Services." *Nucleic Acids Research* 42 (W1): 478–84. <https://doi.org/10.1093/nar/gku377>.
- Hussein, Hiba Abi, Alexandre Borrel, Colette Geneix, Michel Petitjean, Leslie Regad, and Anne Claude Camproux. 2015. "PockDrug-Server: A New Web Server for Predicting Pocket Druggability on Holo and Apo Proteins." *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W436–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv462>.
- Hyde, J. 2005. "Drug-Resistant Malaria." *Trends in Parasitology* 21 (11): 494–98. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.020>.
- Imwong, Mallika, Wanassanan Madmanee, Kanokon Suwannasin, Chanon Kunasol, Thomas J. Peto, Rupam Tripura, Lorenz Von Seidlein, et al. 2019. "Asymptomatic Natural Human Infections with the Simian Malaria Parasites Plasmodium Cynomolgi and Plasmodium Knowlesi." *Journal of Infectious Diseases* 219 (5): 695–702. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy519>.
- Ismail, Hanafy M., Victoria E. Barton, Matthew Panchana, Siththivut Charoensutthivarakul, Giancarlo A. Biagini, Stephen A. Ward, and Paul M. O'Neill. 2016. "A Click Chemistry-Based Proteomic Approach Reveals That 1,2,4-Trioxolane and Artemisinin Antimalarials Share a Common Protein Alkylation Profile." *Angewandte Chemie - International Edition* 55 (22): 6401–5. <https://doi.org/10.1002/anie.201512062>.
- Ismail, Hanafy M., Victoria Barton, Matthew Phanchana, Siththivut Charoensutthivarakul, Michael H.L. Wong, Janet Hemingway, Giancarlo A. Biagini, Paul M. O'Neill, and Stephen A. Ward. 2016. "Artemisinin Activity-Based Probes Identify Multiple Molecular Targets within the Asexual Stage of the Malaria Parasites Plasmodium Falciparum 3D7." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (8): 2080–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600459113>.
- Jaffer, Aneesa, Natacha Protopopoff, Franklin W. Mosha, David Malone, Mark W. Rowland, and Richard M. Oxborough. 2015. "Evaluating the Sterilizing Effect of Pyriproxyfen Treated Mosquito Nets against Anopheles Gambiae at Different Blood-Feeding Intervals." *Acta Tropica* 150: 131–35. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.011>.
- Jakubec, David, Petr Skoda, Radoslav Krivak, Marian Novotny, and David Hoksza. 2022. "PrankWeb 3: Accelerated Ligand-Binding Site Predictions for Experimental and Modelled Protein Structures." *Nucleic Acids Research* 50 (W1): W593–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac389>.

- Jendele, Lukas, Radoslav Krivak, Petr Skoda, Marian Novotny, and David Hoksza. 2019. "PrankWeb: A Web Server for Ligand Binding Site Prediction and Visualization." *Nucleic Acids Research* 47 (W1): W345–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz424>.
- John McCarthy and Patrick J. Hayes. 2008. "Some Philosophical Problems From the Standpoint of Artificial Intelligence." *IEEE International Symposium on Spread Spectrum Techniques and Applications*.
- Johnson, Mark, Irena Zaretskaya, Yan Raytselis, Yuri Merezhuik, Scott McGinnis, and Thomas L. Madden. 2008. "NCBI BLAST: A Better Web Interface." *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server issue): 5–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, et al. 2021. "Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold." *Nature* 596 (7873): 583–89. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Karunaweera, Nadira D., G. E. Grau, P. Gamage, R. Carter, and Kamini N. Mendis. 1992. "Dynamics of Fever and Serum Levels of Tumor Necrosis Factor Are Closely Associated during Clinical Paroxysms in Plasmodium Vivax Malaria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8): 3200–3203. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3200>.
- Katsuno, Kei, Jeremy N. Burrows, Ken Duncan, Rob Hooft Van Huijsduijnen, Takushi Kaneko, Kiyoshi Kita, Charles E. Mowbray, Dennis Schmatz, Peter Warner, and B. T. Slingsby. 2015. "Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World." *Nature Reviews Drug Discovery* 14 (11): 751–58. <https://doi.org/10.1038/nrd4683>.
- Keseru, György M., and Gergely M. Makara. 2006. "Hit Discovery and Hit-to-Lead Approaches." *Drug Discovery Today* 11 (15–16): 741–48. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.06.016>.
- Killeen, Gerry F, Aklilu Seyoum, Chadwick Sikaala, Amri S Zomboko, John E Gimnig, Nicodem J Govella, and Michael T White. 2013. "Eliminating Malaria Vectors," 1–10.
- Kishida, H, and S Sugio. 2013. "Crystal Structure of GTPase Domain Fused with Minimal Stalks from Human Dynamain-1-like Protein (Dlpl) in Complex with Several Nucleotide Analogues." *Current Topics in Peptide and Protein Research* 14 (January): 67–77.
- Kiszewski, Anthony, Andrew Mellinger, Andrew Spielman, Pia Malaney, Sonia Ehrlich Sachs, and Jeffrey Sachs. 2004. "A Global Index Representing the Stability of Malaria Transmission." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70 (5): 486–98.
- Ko, Junsu, Hahnbeom Park, Lim Heo, and Chaok Seok. 2012. "GalaxyWEB Server for Protein Structure Prediction and Refinement" 40 (May): 294–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gks493>.
- Koama, Bayili, Moussa Namountougou, Roger Sanou, Sévérin Ndo, Abdoulaye

- Ouattara, Roch K. Dabiré, David Malone, and Abdoulaye Diabaté. 2015. "The Sterilizing Effect of Pyriproxyfen on the Malaria Vector *Anopheles Gambiae*: Physiological Impact on Ovaries Development." *Malaria Journal* 14 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0609-3>.
- Kozakov, Dima, Laurie E. Grove, David R. Hall, Tanggis Bohnuud, Scott E. Mottarella, Lingqi Luo, Bing Xia, Dmitri Beglov, and Sandor Vajda. 2015. "The FTMap Family of Web Servers for Determining and Characterizing Ligand-Binding Hot Spots of Proteins." *Nature Protocols* 10 (5): 733–55. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>.
- Lalremruata, Albert, Magda Magris, Sarai Vivas-Martínez, Maike Koehler, Meral Esen, Prakasha Kempaiah, Sankarganesh Jeyaraj, Douglas Jay Perkins, Benjamin Mordmüller, and Wolfram G. Metzger. 2015. "Natural Infection of *Plasmodium Brasilianum* in Humans: Man and Monkey Share Quartan Malaria Parasites in the Venezuelan Amazon." *EBioMedicine* 2 (9): 1186–92. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.033>.
- Lavecchia, Antonio. 2015. "Machine-Learning Approaches in Drug Discovery: Methods and Applications." *Drug Discovery Today* 20 (3): 318–31. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.012>.
- Li, Huiliang, Zhifu Han, Yan Lu, Yahui Lin, Lianhui Zhang, Yimin Wu, and Heng Wang. 2004. "Isolation and Functional Characterization of a Dynamin-like Gene from *Plasmodium Falciparum*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320 (3): 664–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.010>.
- Li, Yu, Min Wang, and Shilei Wang. 2016. "Effect of Inhibiting Mitochondrial Fission on Energy Metabolism in Rat Hippocampal Neurons during Ischemia/Reperfusion Injury." *Neurological Research* 38 (11): 1027–34. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1215050>.
- Loiola, Carlos Catão Prates, C. J. Mangabeira Da Silva, and Pedro Luiz Tauil. 2002. "Controle Da Malária No Brasil: 1965 a 2001." *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health* 11 (4): 235–44. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892002000400005>.
- Long, Carole A., and Fidel Zavala. 2017. "Immune Responses in Malaria." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (8): a025577. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025577>.
- Ma, Nan, Ziyue Zhang, Fulong Liao, Tingliang Jiang, and Youyou Tu. 2020. "The Birth of Artemisinin." *Pharmacology and Therapeutics* 216: 107658. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107658>.
- Macalino, Stephani Joy Y., Vijayakumar Gosu, Sunhye Hong, and Sun Choi. 2015. "Role of Computer-Aided Drug Design in Modern Drug Discovery." *Archives of Pharmacal Research* 38 (9): 1686–1701. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0640-5>.
- Macia, Eric, Marcelo Ehrlich, Ramiro Massol, Emmanuel Boucrot, Christian Brunner, and Tomas Kirchhausen. 2006. "Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin." *Developmental Cell* 10 (6): 839–50.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.002>.

- Madhavi Sastry, G., Matvey Adzhigirey, Tyler Day, Ramakrishna Annabhimoju, and Woody Sherman. 2013. "Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 27 (3): 221–34. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>.
- Mak, Kit-Kay, and Mallikarjuna Rao Pichika. 2019. "Artificial Intelligence in Drug Development: Present Status and Future Prospects." *Drug Discovery Today* 24 (3): 773–80. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.11.014>.
- Marques, Marly M., Monica R.F. Costa, Franklin S. Santana Filho, José L.F. Vieira, Margareth T.S. Nascimento, Larissa W. Brasil, Fátima Nogueira, et al. 2014. "Plasmodium Vivax Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1): 342–47. <https://doi.org/10.1128/AAC.02279-12>.
- Marsh, K., and S. Kinyanjui. 2006. "Immune Effector Mechanisms in Malaria." *Parasite Immunology* 28 (1–2): 51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x>.
- Marsh, Kevin, Dayo Forster, Catherine Waruiru, Isiah Mwangi, Maria Winstanley, Victoria Marsh, Charles Newton, et al. 1995. "Indicators of Life-Threatening Malaria in African Children." *New England Journal of Medicine* 332 (21): 1399–1404. <https://doi.org/10.1056/nejm199505253322102>.
- Mavoko, Hypolite Muhindo, Carolyn Nabasumba, Raquel Inocência da Luz, Halidou Tinto, Umberto D'Alessandro, Andrew Kambugu, Vito Baraka, Anna Rosanas-Urgell, Pascal Lutumba, and Jean Pierre Van geertruyden. 2017. "Efficacy and Safety of Re-Treatment with the Same Artemisinin-Based Combination Treatment (ACT) Compared with an Alternative ACT and Quinine plus Clindamycin after Failure of First-Line Recommended ACT (QUINACT): A Bicentre, Open-Label, Phase 3, Randomise." *The Lancet Global Health*. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30236-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30236-4).
- Mawson, Anthony R. 2013. "The Pathogenesis of Malaria: A New Perspective." *Pathogens and Global Health* 107 (3): 122–29. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000084>.
- McCluskey, Adam, James A. Daniel, Gordana Hadzic, Ngoc Chau, Emma L. Clayton, Anna Mariana, Ainslie Whiting, et al. 2013. "Building a Better Dynasore: The Dyngo Compounds Potently Inhibit Dynamamin and Endocytosis." *Traffic* 14 (12): 1272–89. <https://doi.org/10.1111/tra.12119>.
- Melatti, Carmen, Manuela Pieperhoff, Leandro Lemgruber, Ehmke Pohl, Lilach Sheiner, and Markus Meissner. 2019. "A Unique Dynamamin-Related Protein Is Essential for Mitochondrial Fission in Toxoplasma Gondii." Edited by Kami Kim. *PLOS Pathogens* 15 (4): e1007512. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007512>.
- Mercereau-Pujalon, O., and D. Ménard. 2010. "Plasmodium Vivax and the Duffy Antigen: A Paradigm Revisited." *Transfusion Clinique et Biologique* 17 (3): 176–83. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2010.06.005>.

- Meshnick, Steven R., Abraham Thomas, Allen Ranz, Cai Min Xu, and Hua Zhen Pan. 1991. "Artemisinin (Qinghaosu): The Role of Intracellular Hemin in Its Mechanism of Antimalarial Action." *Molecular and Biochemical Parasitology* 49 (2): 181–89. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90062-B](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90062-B).
- Miller, Louis H, and Xinzhuan Su. 2011. "Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden The Promise of Project 523." *Cell* 146 (6): 855–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.024.Artemisinin>.
- Milner, Danny A. 2018. "Malaria Pathogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>.
- Mistry, Jaina, Sara Chuguransky, Lowri Williams, Matloob Qureshi, Gustavo A. Salazar, Erik L.L. Sonnhammer, Silvio C.E. Tosatto, et al. 2021. "Pfam: The Protein Families Database in 2021." *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D412–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.
- Molina-cruz, Alvaro, Martine M Zilversmit, Daniel E Neafsey, Daniel L Hartl, and Carolina Barillas-mury. 2016. "Mosquito Vectors and the Globalization of Plasmodium Falciparum Malaria," no. September: 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035211>.
- Moreno-Pérez, Darwin A., Jhennifer A. Ruíz, and Manuel A. Patarroyo. 2013. "Reticulocytes: Plasmodium Vivax Target Cells." *Biology of the Cell* 105 (6): 251–60. <https://doi.org/10.1111/boc.201200093>.
- Morris, Garrett M, and Marguerita Lim-Wilby. 2008. "Molecular Docking." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 443: 365–82. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19.
- Moxon, Christopher A., Matthew P. Gibbins, Dagmara McGuinness, Danny A. Milner, and Matthias Marti. 2020. "New Insights into Malaria Pathogenesis." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 15: 315–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032640>.
- Mremi, Alex, James J. Yahaya, Mramba Nyindo, and Edson Mollel. 2021. "Transfusion-Transmitted Infections and Associated Risk Factors at the Northern Zone Blood Transfusion Center in Tanzania: A Study of Blood Donors between 2017 and 2019." *PLoS ONE* 16 (3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249061>.
- Mwananyanda, Lawrence, Christopher J. Gill, William Macleod, Geoffrey Kwenda, Rachel Pieciak, Zachariah Mupila, Rotem Lapidot, et al. 2021. "Covid-19 Deaths in Africa: Prospective Systematic Postmortem Surveillance Study." *The BMJ* 372: 9–13. <https://doi.org/10.1136/bmj.n334>.
- Naing, Cho, Maxine A. Whittaker, Victor Nyunt Wai, and Joon Wah Mak. 2014. "Is Plasmodium Vivax Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003071>.
- Neves, Bruno J., Rodolpho C. Braga, Cleber C. Melo-Filho, José Teófilo Moreira-Filho, Eugene N. Muratov, and Carolina Horta Andrade. 2018. "QSAR-Based Virtual Screening: Advances and Applications in Drug Discovery." *Frontiers in Pharmacology* 9 (NOV): 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01275>.

- Neves, Bruno Junior, Melina Mottin, José Teofilo Moreira-Filho, Bruna Katiele de Paula Sousa, Sabrina Silva Mendonca, and Carolina Horta Andrade. 2021. "Best Practices for Docking-Based Virtual Screening." In *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design*, 75–98. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822312-3.00001-1>.
- Ngan, Chi Ho, David R. Hall, Brandon Zerbe, Laurie E. Grove, Dima Kozakov, and Sandor Vajda. 2012. "FitSite: High Accuracy Detection of Ligand Binding Sites on Unbound Protein Structures." *Bioinformatics* 28 (2): 286–87. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr651>.
- O'Neill, Paul M., Victoria E. Barton, and Stephen A. Ward. 2010. "The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues." *Molecules* 15 (3): 1705–21. <https://doi.org/10.3390/molecules15031705>.
- Oliveira-ferreira, Joseli, Marcus V G Lacerda, Patrícia Brasil, José L B Ladislau, Pedro L Tauil, and Cláudio Tadeu Daniel-ribeiro. 2010. "Malaria in Brazil : An Overview Review," 1–15.
- Olotu, Ally, Greg Fegan, and Juliana Wambua. 2016. "Seven-Year Efficacy of RTS , S / AS01 Malaria Vaccine among Young African Europe PMC Funders Group Seven-Year Efficacy of RTS , S / AS01 Malaria Vaccine among Young African Children." *New England Journal of Medicine* 374 (26): 2519–29. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515257.Seven-Year>.
- Papadopoulos, Jason S., and Richa Agarwala. 2007. "COBALT: Constraint-Based Alignment Tool for Multiple Protein Sequences." *Bioinformatics* 23 (9): 1073–79. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm076>.
- Parroche, Peggy, Fanny N. Lauw, Nadege Goutagny, Eicke Latz, Brian G. Monks, Alberto Visintin, Kristen A. Halmen, et al. 2007. "Malaria Hemozoin Is Immunologically Inert but Radically Enhances Innate Responses by Presenting Malaria DNA to Toll-like Receptor 9." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (6): 1919–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608745104>.
- Partnership. 2015. "Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, Controlled Trial." *The Lancet* 386 (9988): 31–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8).
- Paul, Steven M., Daniel S. Mytelka, Christopher T. Dunwiddie, Charles C. Persinger, Bernard H. Munos, Stacy R. Lindborg, and Aaron L. Schacht. 2010. "How to Improve RD Productivity: The Pharmaceutical Industry's Grand Challenge." *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (3): 203–14. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>.
- Paulsen, Janet L., and Amy C. Anderson. 2009. "Scoring Ensembles of Docked Protein:Ligand Interactions for Virtual Lead Optimization." *Journal of Chemical Information and Modeling* 49 (12): 2813–19. <https://doi.org/10.1021/ci9003078>.
- Pham, Thai Binh, Celine Hien Phong, Jared B. Bennett, Kristy Hwang, Nijole Jasinskiene, Kiona Parker, Drusilla Stillinger, John M. Marshall, Rebeca

- Carballar-Lejarazú, and Anthony A. James. 2019. *Experimental Population Modification of the Malaria Vector Mosquito, Anopheles Stephensi*. *PLoS Genetics*. Vol. 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008440>.
- Phillips, Margaret A., Jeremy N. Burrows, Christine Manyando, Rob Hooft Van Huijsduijnen, Wesley C. Van Voorhis, and Timothy N.C. Wells. 2017. "Malaria." *Nature Reviews Disease Primers* 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.
- Pinzi, Luca, and Giulio Rastelli. 2019. "Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- Pizzi, E., and C. Frontali. 2001. "Low-Complexity Regions in Plasmodium Falciparum Proteins." *Genome Research* 11 (2): 218–29. <https://doi.org/10.1101/gr.1522R>.
- Pradel, G., and M. Schlitzer. 2010. "Antibiotics in Malaria Therapy and Their Effect on the Parasite Apicoplast." *Current Molecular Medicine* 10 (3): 335–49. <https://doi.org/10.2174/156652410791065273>.
- Praefcke, Gerrit J.K., and Harvey T. McMahon. 2004. "The Dynamin Superfamily: Universal Membrane Tubulation and Fission Molecules?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (2): 133–47. <https://doi.org/10.1038/nrm1313>.
- Price, Ric N., Lorenz von Seidlein, Neena Valecha, Francois Nosten, J. Kevin Baird, and Nicholas J. White. 2014. "Global Extent of Chloroquine-Resistant Plasmodium Vivax: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet Infectious Diseases* 14 (10): 982–91. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70855-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70855-2).
- Price, Ric N., Anne Catrin Uhlemann, Alan Brockman, Rose McGready, Elizabeth Ashley, Lucy Phaipun, Rina Patel, et al. 2004. "Mefloquine Resistance in Plasmodium Falciparum and Increased Pfmpr1 Gene Copy Number." *Lancet* 364 (9432): 438–47. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16767-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16767-6).
- Prieto-Martínez, Fernando D., Edgar López-López, K. Eurídice Juárez-Mercado, and José L. Medina-Franco. 2019. "Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives." *In Silico Drug Design: Repurposing Techniques and Methodologies*, no. 3: 19–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816125-8.00002-X>.
- Raja, Thamayanthi Nada, Ting Huey Hu, Khamisah Abdul Kadir, Dayang Shuaisah Awang Mohamad, Nawal Rosli, Lolita Lin Wong, King Ching Hii, Paul Cliff Simon Divis, and Balbir Singh. 2020. "Naturally Acquired Human Plasmodium Cynomolgi and P. Knowlesi Infections, Malaysian Borneo." *Emerging Infectious Diseases* 26 (8): 1801–9. <https://doi.org/10.3201/eid2608.200343>.
- Ramaprasad, Abhinay, Arnab Pain, and Timothy Ravasi. 2012. "Defining the Protein Interaction Network of Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Genomics* 99 (2): 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.11.006>.
- Rao, Anita. 2020. "Strategic R&D Investment Decisions in the Pharmaceutical

- Industry." *Marketing Science*, no. September: 1–31. <http://www.ssrn.com/abstract=2652755>.
- Reubold, Thomas F., Katja Faelber, Nuria Plattner, York Posor, Katharina Ketel, Ute Curth, Jeanette Schlegel, et al. 2015. "Crystal Structure of the Dynamin Tetramer." *Nature* 525 (7569): 404–8. <https://doi.org/10.1038/nature14880>.
- Riehm, H, and J L Biedler. 1971. "Cellular Resistance to Daunomycin in Chinese Hamster Cells in Vitro." *Cancer Research* 31 (4): 409–12.
- Robertson, Mark J., Gordana Hadzic, Joseph Ambrus, D. Yuri Pomè, Emily Hyde, Ainslie Whiting, Anna Mariana, et al. 2012. "The Rhodadyns, a New Class of Small Molecule Inhibitors of Dynamin Gtpase Activity." *ACS Medicinal Chemistry Letters* 3 (5): 352–56. <https://doi.org/10.1021/ml200284s>.
- Roersch van der Hoogte, Arjo, and Toine Pieters. 2014. "Science in the Service of Colonial Agro-Industrialism: The Case of Cinchona Cultivation in the Dutch and British East Indies, 1852-1900." *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 47 (PA): 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2014.05.019>.
- Rogerson, Stephen J., Meghna Desai, Alfredo Mayor, Elisa Sicuri, Steve M. Taylor, and Anna M. van Eijk. 2018. "Burden, Pathology, and Costs of Malaria in Pregnancy: New Developments for an Old Problem." *The Lancet Infectious Diseases* 18 (4): e107–18. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30066-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30066-5).
- Saikia, Surovi, and Manobjyoti Bordoloi. 2019. "Molecular Docking: Challenges, Advances and Its Use in Drug Discovery Perspective." *Current Drug Targets* 20 (5): 501–21. <https://doi.org/10.2174/1389450119666181022153016>.
- Salentin, Sebastian, Sven Schreiber, V. Joachim Haupt, Melissa F. Adasme, and Michael Schroeder. 2015. "PLIP: Fully Automated Protein-Ligand Interaction Profiler." *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W443–47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>.
- Santana, Marli Stela, Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, Maria Das Graças Vale Barbosa, Wilson Duarte Alecrim, and Maria Das Graças Costa Alecrim. 2009. "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in an Endemic Area for Malaria in Manaus: A Cross-Sectional Survey in the Brazilian Amazon." *PLoS ONE* 4 (4): 4–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005259>.
- Santos, Karina B., Isabella A. Guedes, Ana L.M. Karl, and Laurent E. Dardenne. 2020. "Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-Peptide Data Set." *Journal of Chemical Information and Modeling* 60 (2): 667–83. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00905>.
- Schneider, Gisbert, and Hans Joachim Böhm. 2002. "Virtual Screening and Fast Automated Docking Methods." *Drug Discovery Today* 7 (1): 64–70. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)02091-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)02091-8).
- Schrödinger, LLC. 2015. "The {PyMOL} Molecular Graphics System,

Version~2.4.”

———. 2021a. “Schrödinger Release 2022-3: Glide.”

———. 2021b. “Schrödinger Release 2022-3: LigPrep.”

———. 2021c. “Schrödinger Release 2022-3: Maestro.”

Shin, Woong-Hee, Gyu Rie Lee, Lim Heo, Hasup Lee, and Chaok Seok. 2014. “Prediction of Protein Structure and Interaction by GALAXY Protein Modeling Programs.” *Bio Design* 2: 01–11. http://www.bdjn.org/Journal_File_Dir/Sub/j_sub_pdf_file_f69ad773_.pdf.

Shivakumar Keerthikumar. 2016. “Chapter 12 Bioinformatics Methods to Deduce Biological” 1549 (October 2017): 1–3. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6740-7>.

Shrader, William D., Akiko Amagata, Adam Barnes, Gregory M. Enns, Andrew Hinman, Orion Jankowski, Viktoria Kheifets, et al. 2011. “ α -Tocotrienol Quinone Modulates Oxidative Stress Response and the Biochemistry of Aging.” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.04.085>.

Singh, Balbir, and Cyrus Daneshvar. 2013. “Human Infections and Detection of Plasmodium Knowlesi.” *Clinical Microbiology Reviews* 26 (2): 165–84. <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-12>.

Singh, Balbir, Lee Kim Sung, Asmad Matusop, Anand Radhakrishnan, Sunita SG Shamsul, Janet Cox-Singh, Alan Thomas, and David J Conway. 2004. “A Large Focus of Naturally Acquired Plasmodium Knowlesi Infections in Human Beings.” *The Lancet* 363 (9414): 1017–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15836-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4).

Sinka, Marianne E, Michael J Bangs, Sylvie Manguin, Yasmin Rubio-palis, Theeraphap Chareonviriyaphap, Maureen Coetzee, Charles M Mbogo, et al. 2012. “A Global Map of Dominant Malaria Vectors,” no. January 2008: 1–11.

Skovsgaard, Torben. 1978. “Mechanism of Cross-Resistance between Vincristine and Daunorubicin in Ehrlich Ascites Tumor Cells.” *Cancer Research* 38 (12): 4722–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/719649>.

Skrzypek, Ruth, and Richard Callaghan. 2017. “The ‘Pushmi-Pullyu’ of Resistance to Chloroquine in Malaria.” *Essays in Biochemistry* 61 (1): 167–75. <https://doi.org/10.1042/EBC20160060>.

Slater, A. F. G., and A. Cerami. 1992. “Inhibition by Chloroquine of a Novel Haem Polymerase Enzyme Activity in Malaria Trophozoites.” *Nature* 355 (6356): 167–69. <https://doi.org/10.1038/355167a0>.

Sonnhammer, Erik L.L., Sean R. Eddy, and Richard Durbin. 1997. “Pfam: A Comprehensive Database of Protein Domain Families Based on Seed Alignments.” *Proteins: Structure, Function and Genetics* 28 (3): 405–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199707\)28:3<405::AID-PROT10>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199707)28:3<405::AID-PROT10>3.0.CO;2-L).

Souza, Patrícia Feitosa, Diego Ricardo Xavier, Martha Cecilia Suarez Mutis,

- Jurema Corrêa da Mota, Paulo Cesar Peiter, Vanderlei Pascoal de Matos, Mônica de Avelar Figueiredo Mafra Magalhães, and Christovam Barcellos. 2019. "Spatial Spread of Malaria and Economic Frontier Expansion in the Brazilian Amazon." Edited by Luzia Helena Carvalho. *PLOS ONE* 14 (6): e0217615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217615>.
- Ssentongo, Paddy, Djibril M. Ba, Anna E. Ssentongo, Jessica E. Ericson, Ming Wang, Duanping Liao, and Vernon M. Chinchilli. 2020. "Associations of Malaria, HIV, and Coinfection, with Anemia in Pregnancy in Sub-Saharan Africa: A Population-Based Cross-Sectional Study." *BMC Pregnancy and Childbirth* 20 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12884-020-03064-x>.
- Stanway, Rebecca R., Tina Witt, Bernd Zobiak, Martin Aepfelbacher, and Volker T. Heussler. 2009. "GFP-Targeting Allows Visualization of the Apicoplast throughout the Life Cycle of Live Malaria Parasites." *Biology of the Cell* 101 (7): 415–35. <https://doi.org/10.1042/bc20080202>.
- Stocks, Paul A., Patrick G. Bray, Victoria E. Barton, Mohammed Al-Helal, Michael Jones, Nuna C. Araujo, Peter Gibbons, et al. 2007. "Evidence for a Common Non-Heme Chelatable-Iron-Dependent Activation Mechanism for Semisynthetic and Synthetic Endoperoxide Antimalarial Drugs." *Angewandte Chemie International Edition* 46 (33): 6278–83. <https://doi.org/10.1002/anie.200604697>.
- Straimer, Judith, Nina F. Gnädig, Benoit Witkowski, Chanaki Amaratunga, Valentine Duru, Arba Pramundita Ramadani, Mélanie Dacheux, et al. 2015. "K13-Propeller Mutations Confer Artemisinin Resistance in Plasmodium Falciparum Clinical Isolates." *Science* 347 (6220): 428–31. <https://doi.org/10.1126/science.1260867>.
- Sullivan, David J., Ilya Y. Gluzman, David G. Russell, and Daniel E. Goldberg. 1996. "On the Molecular Mechanism of Chloroquine's Antimalarial Action." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (21): 11865–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11865>.
- Suresh, Niraja, and Kasturi Haldar. 2018. "Mechanisms of Artemisinin Resistance in Plasmodium Falciparum Malaria." *Current Opinion in Pharmacology* 42 (October): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.06.003>.
- Ta, Thuy H., Shamilah Hisam, Marta Lanza, Adela I. Jiram, Norparina Ismail, and José M. Rubio. 2014. "First Case of a Naturally Acquired Human Infection with Plasmodium Cynomolgi." *Malaria Journal* 13 (1): 68. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-68>.
- Tauil, Pedro, and Tadeu, Cláudio T. Daniel-Ribeiro. 1998. "Some Aspects of Epidemiology and Control of Malaria in Brazil ." *Research and Reviews in Parasitology* 58 (4): 163–67. <https://www.researchgate.net/publication/308308527>.
- Tilley, Leann, Judith Straimer, Nina F. Gnädig, Stuart A. Ralph, and David A. Fidock. 2016. "Artemisinin Action and Resistance in Plasmodium Falciparum." *Trends in Parasitology* 32 (9): 682–96. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.010>.

- Torres, Pedro H.M., Ana C.R. Sodero, Paula Jofily, and Floriano P. Silva-Jr. 2019. "Key Topics in Molecular Docking for Drug Design." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18): 1–29. <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>.
- Travassos, Mark A, and Miriam K Laufer. 2009. "Resistance to Antimalarial Drugs: Molecular, Pharmacologic, and Clinical Considerations." *Pediatric Research* 65 (5 Part 2): 64R-70R. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181a0977e>.
- Tse, Edwin G., Marat Korsik, and Matthew H. Todd. 2019. "The Past, Present and Future of Anti-Malarial Medicines." *Malaria Journal* 18 (1): 93. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2724-z>.
- Tu, Youyou. 2011. "The Discovery of Artemisinin (Qinghaosu) and Gifts from Chinese Medicine." *Nature Medicine* 17 (10): 1217–20. <https://doi.org/10.1038/nm.2471>.
- Tunyasuvunakool, Kathryn, Jonas Adler, Zachary Wu, Tim Green, Michal Zielinski, Augustin Židek, Alex Bridgland, et al. 2021. "Highly Accurate Protein Structure Prediction for the Human Proteome." *Nature* 596 (7873): 590–96. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>.
- Varadi, Mihaly, Stephen Anyango, Mandar Deshpande, Sreenath Nair, Cindy Natassia, Galabina Yordanova, David Yuan, et al. 2022. "AlphaFold Protein Structure Database: Massively Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models." *Nucleic Acids Research* 50 (D1): D439–44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.
- Vasconcelos, Beatriz Maia, Flávia Maclina da Silva Picanço, Álvaro André Santos Castanho, Sayara Teixeira Potter Rosa, Ana Reiry Marques, Wanessa de Nazaré Rodrigues Moraes, Arley Henrique Rocha Neves, and Samara de Castro Martins. 2020. "Aspectos Epidemiológicos Da Malária Na Amazônia Legal, Brasil, 2000 a 2013." *Brazilian Journal of Health Review* 3 (3): 5230–43. <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n3-099>.
- Verhoef, Julie M. J., Markus Meissner, and Taco W. A. Kooij. 2021. "Organelle Dynamics in Apicomplexan Parasites." Edited by Louis M. Weiss. *MBio* 12 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01409-21>.
- Vermeulen, Marion, Nico Lelie, Charl Coleman, Wendy Sykes, Genevieve Jacobs, Ronel Swanevelder, Michael Busch, et al. 2019. "Assessment of HIV Transfusion Transmission Risk in South Africa: A 10-Year Analysis Following Implementation of Individual Donation Nucleic Acid Amplification Technology Testing and Donor Demographics Eligibility Changes." *Transfusion* 59 (1): 267–76. <https://doi.org/10.1111/trf.14959>.
- Vijaykumar, Matam, Ramachandra S. Naik, and D. Channe Gowda. 2001. "Plasmodium Falciparum Glycosylphosphatidylinositol-Induced TNF- α Secretion by Macrophages Is Mediated without Membrane Insertion or Endocytosis." *Journal of Biological Chemistry* 276 (10): 6909–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100007200>.
- Volkamer, Andrea, Daniel Kuhn, Friedrich Rippmann, and Matthias Rarey. 2012.

- “Dogsitescorer: A Web Server for Automatic Binding Site Prediction, Analysis and Druggability Assessment.” *Bioinformatics* 28 (15): 2074–75. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts310>.
- Vries, Peter J. De, and Tran K. Dien. 1996. “Clinical Pharmacology and Therapeutic Potential of Artemisinin and Its Derivatives in the Treatment of Malaria.” *Drugs* 52 (6): 818–36. <https://doi.org/10.2165/00003495-199652060-00004>.
- Wang, Jigang, Chong Jing Zhang, Wan Ni Chia, Cheryl C.Y. Loh, Zhengjun Li, Yew Mun Lee, Yingke He, et al. 2015. “Haem-Activated Promiscuous Targeting of Artemisinin in Plasmodium Falciparum.” *Nature Communications* 6: 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms10111>.
- Wassmer, Samuel Crocodile, and Georges Emile Raymond Grau. 2017. “Severe Malaria: What’s New on the Pathogenesis Front?” *International Journal for Parasitology* 47 (2–3): 145–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.08.002>.
- Waterhouse, Andrew, Martino Bertoni, Stefan Bienert, Gabriel Studer, Gerardo Tauriello, Rafal Gumieny, Florian T Heer, et al. 2018. “SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes.” *Nucleic Acids Research* 46 (W1): W296–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- Webster, Wesley A.J., and Geoffrey I. McFadden. 2009. “Organelle Division: Dynamin-Related Proteins in Apicomplexans.” *Current Biology* 19 (8): R334–36. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.044>.
- Wellems, Thomas E., and Christopher V. Plowe. 2001. “Chloroquine-Resistant Malaria.” *The Journal of Infectious Diseases* 184 (6): 770–76. <https://doi.org/10.1086/322858>.
- White, N. J. 2008. “Qinghaosu (Artemisinin): The Price of Success.” *Science* 320 (5874): 330–34. <https://doi.org/10.1126/science.1155165>.
- White, Nicholas J. 2018. “Anaemia and Malaria 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences.” *Malaria Journal* 17 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2509-9>.
- Wijesekera, S. K., R. Carter, L. Rathnayaka, and K. N. Mendis. 1996. “A Malaria Parasite Toxin Associated with Plasmodium Vivax Paroxysms.” *Clinical and Experimental Immunology* 104 (2): 221–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.07699.x>.
- Williams, Christopher J, Jeffrey J Headd, Nigel W Moriarty, Michael G Prisant, Lizbeth L Videau, Lindsay N Deis, Vishal Verma, et al. 2017. “MolProbity: More and Better Reference Data for Improved All-Atom Structure Validation” 27: 293–315. <https://doi.org/10.1002/pro.3330>.
- Willingham, Mark C., Marilyn M. Cornwell, Carol O. Cardarelli, Michael M. Gottesman, and Ira Pastan. 1986. “Single Cell Analysis of Daunomycin Uptake and Efflux in Multidrug-Resistant and -Sensitive KB Cells: Effects of Verapamil and Other Drugs.” *Cancer Research* 46 (11): 5941–46.
- Wouters, Olivier J., Martin McKee, and Jeroen Luyten. 2020. “Estimated

- Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018.” *Jama* 323 (9): 844–53. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>.
- Xu, Jun, and Arnold Hagler. 2002. “Chemoinformatics and Drug Discovery.” *Molecules* 7 (8): 566–600. <https://doi.org/10.3390/70800566>.
- Yang, Jing, Yingke He, Yinbao Li, Xing Zhang, Yin-kwan Wong, Shengnan Shen, Tianyu Zhong, Jianbin Zhang, Qian Liu, and Jigang Wang. 2020. “Advances in the Research on the Targets of Anti-Malaria Actions of Artemisinin.” *Pharmacology & Therapeutics* 216 (January): 107697. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107697>.
- Yang, Xin, Yifei Wang, Ryan Byrne, Gisbert Schneider, and Shengyong Yang. 2019. “Concepts of Artificial Intelligence for Computer-Assisted Drug Discovery.” *Chemical Reviews* 119 (18): 10520–94. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00728>.
- Zhang, Yang. 2008. “I-TASSER Server for Protein 3D Structure Prediction.” *BMC Bioinformatics* 9 (1): 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>.
- Zhou, Hong Chang, Yu Hui Gao, Xiang Zhong, and Heng Wang. 2009. “Dynamin like Protein 1 Participated in the Hemoglobin Uptake Pathway of Plasmodium Falciparum.” *Chinese Medical Journal* 122 (14): 1686–91. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.14.015>.
- Zimmerman, Peter A., Marcelo U. Ferreira, Rosalind E. Howes, and Odile Mercereau-Pujalon. 2013. “Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to Plasmodium Vivax.” In *Advances in Parasitology*, 81:27–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00002-3>.
- Zuck, Meghan, Laura S. Austin, Samuel A. Danziger, John D. Aitchison, and Alexis Kaushansky. 2017. “The Promise of Systems Biology Approaches for Revealing Host Pathogen Interactions in Malaria.” *Frontiers in Microbiology* 8 (NOV): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02183>.