



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Dissertação de Mestrado

FARAH CAMILA MURTADHA

**Utilização da APEX2 para marcação de proteínas
mitocondriais de *Plasmodium falciparum* associada a
predições *in silico* e *data mining***

Orientador:
Dr. Sébastien Olivier Charneau
Universidade de Brasília (UnB)
Departamento de Biologia Celular (CEL)

Brasília – DF
Junho
2023

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

FARAH CAMILA MURTADHA

**Utilização da APEX2 para marcação de proteínas
mitocondriais de *Plasmodium falciparum* associada a
predições *in silico* e *data mining***

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, associado à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular, na área de concentração de Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador:
Dr. Sébastien Olivier Charneau
Universidade de Brasília (UnB)
Departamento de Biologia Celular (CEL)

Brasília – DF
Junho
2023

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

MM984u Murtadha, Farah Camila
Utilização da APEX2 para marcação de proteínas
mitocondriais de Plasmodium falciparum associada a predições
in silico e data mining / Farah Camila Murtadha; orientador
Sébastien Charneau. -- Brasília, 2023.
83 p.

Tese (Mestrado em Patologia Molecular) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. Malária. 2. APEX2. 3. Biotinilação. 4. P. falciparum.
5. predições in silico e data mining. I. Charneau,
Sébastien, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília

Membro 1: Profa. Dra. Flávia Nader Motta

Faculdade Ceilândia, Universidade de Brasília

Membro 2: Dra. Clênia dos Santos Azevedo

Ministério da Saúde

Suplente: Dr. Lucas Silva de Oliveira

Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília

Local: Ambiente virtual

Data: 30/06/2023

Horário: 9h30min

AGRADECIMENTOS

À Pós-graduação por ter dado todos os recursos possíveis para a realização deste trabalho.

As pessoas do grupo Patogênese Molecular (antigo Malária Molecular), por terem sido ótimos parceiros de trabalho, em especial ao meu orientador **Sébastien Charneau**, na qual tornou tudo isso possível. Sébastien é uma pessoa extremamente tranquila e em muitas vezes que eu estava estressada por motivos que envolviam o laboratório, ao conversar com ele, ele me passava essa tranquilidade dele, sendo essencial em muitos momentos.

À **Lucas e Marcos**, que foram meus parceiros de laboratório, mesmo quando eu era PIBIC, não havia diferenciação no trabalho, fazíamos tudo de igual para igual, o que tornava o meu trabalho mais fácil, já que eu não me sentia subestimada, muito pelo contrário, muitas vezes eles diziam confiar em mim “de olhos fechados”. Isso fez com que eu pegasse muita confiança na bancada, levando a minha independência no laboratório, a ponto de ir realizar meus experimentos sozinha e sem medo. Se não fosse por isso, era provável de eu não ter pensado no mestrado, dessa forma, essa etapa do meu PIBIC foi essencial para o início da minha jornada.

A todos os professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) por sempre estarem unidos e se ajudando. Apesar dos vários grupos que compõem o laboratório, não há nenhum grupo que seja 100% independente, o que faz com que trabalhem juntos e sempre ajudando o outro. Além de claro, de todas as confraternizações que tivemos, nas quais fazem com que os grupos se aproximassem mais.

Ao LIPH (Laboratório de interação Parasito-Hospedeiro), principalmente a professora **Izabela** na qual permitia que utilizássemos o espaço e equipamentos presentes no laboratório, sempre que precisávamos, deixando o meu projeto muito mais tranquilo de ser realizado, já que sabemos que o laboratório tem pessoas de confiança e que possam nos ajudar sempre que precisarmos, assim como nós ajudamos o pessoal do LIPH sempre quando necessário. Nós sabemos e entendemos que é muito difícil trabalhar sozinho, e mesmo que tenhamos um grupo, muitas vezes precisamos de ajuda externa e o LIPH conseguiu ser muito parceiro nesse quesito.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Flávia Nader Motta, Dra. Clênia dos Santos Azevedo e Dr. Lucas Silva de Oliveira, por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora.

À Dr^a. Thuany de Moura Cordeiro e à Juliana Penteado, da Fundação Hemocentro de Brasília (FHB), pelo provisionamento de hemocompetentes para a realização das nossas atividades de pesquisa.

Aos meus pais e ao meu irmão por terem me apoiado durante toda essa jornada do mestrado, especialmente em relação à rotina do laboratório. Muitas vezes era difícil para eles, compreenderem a minha necessidade de ir ao laboratório em dia de feriado, finais de semana, muitas vezes, ter que chegar muito cedo ou ir embora muito tarde, e mesmo sem entender bem o que se passava no laboratório, eles sempre me apoiaram e me deram forças para continuar realizando um bom trabalho.

A todas as amizades que construí no laboratório, desde a época da iniciação científica. Devido a rotina intensa, principalmente durante a pandemia, estávamos sempre nos apoiando, o que tornava o laboratório um ambiente mais agradável de se estar.

As minhas amizades pessoais, **Marisa Borges** e **Giullia Costa** que estão comigo há muitos anos e mesmo não fazendo parte diretamente do laboratório, contribuíram com todo apoio para que eu finalizasse este trabalho, além de estarem presentes em todas as maiores conquistas que tive na minha vida.

Ao **Leonardo Jordão**, que foi essencial para a finalização deste trabalho, me acompanhando no laboratório durante os finais de semana, feriados, nas noites de escritas, além de todo apoio que tive para que eu continuasse com o trabalho, principalmente na reta final deste.

A todos aqueles que fizeram parte da minha jornada e que não foi especificado.

AGRADECIMENTOS AS INTITUIÇÕES E FOMENTADORES

Esta dissertação foi desenvolvida 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 desse estudo, da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pela sala de Espectrometria de Massa do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), que forneceu também verbas para o desenvolvimento desse projeto. Agradecemos a Fundação Hemocentro de Brasília e Hemoclínica – Clínica de Hematologia e Hemoterapia Ltda pelo fornecimento de hemocomponentes, parcerias indispensáveis para a realização de pesquisas pelo grupo.

À Joyce Sucupira, da Hemoclínica – Clínica de Hematologia e Hemoterapia Ltda., pela parceria instituída, disponibilidade e presteza em realizar o provisionamento complementar de hemocompetentes para a realização das nossas atividades de pesquisa.

Às agências de fomento, sem às quais, não teríamos a possibilidade de realizar as atividades de pesquisa: CAPES: (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPDF (Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal) e FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos).

Aos fornecedores dos insumos utilizados para as nossas atividades de pesquisa, agradeço a presteza e seriedade.

RESUMO

A malária possui como agentes etiológicos os protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo que a espécie responsável pelos casos clínicos mais graves é o *P. falciparum*. Em 2021, foram registrados 247 milhões de casos de malária, sendo que o continente africano foi responsável por, aproximadamente, 95% dos casos. A espécie predominante nesta região é a *P. falciparum*, responsável pelos sintomas mais graves da doença, além disso, ao longo dos anos são registrados resistência deste parasita aos antimaláricos de referência, tornando uma preocupação sanitária. Dessa forma, estudar o parasita se torna necessário. A fim de compreender melhor uma das organelas essenciais para a sobrevivência do parasita, o presente trabalho objetivou utilizar a APEX2 para marcar, através da biotinylation, as proteínas mitocondriais de *P. falciparum*. Esta metodologia irá catalisar a reação de biotinylation de proteínas de compartimentos celulares de interesse, permitindo uma análise detalhada e fidedigna do conteúdo proteômico, através do enriquecimento das proteínas biotiniladas, utilizando um substrato (biotina-fenol) e um agente oxidante (peróxido de hidrogênio). O ensaio de biotinylation das proteínas foi realizada após a obtenção de parasitas transfectados com o plasmídeo de expressão episomal contendo a sequência codificadora para APEX2 fusionada a um peptídeo de trânsito não-consenso de uma proteína mitocondrial. Através da análise por *Western Blot* e estreptavidina-*blot*, foi observado que tanto a expressão da HA-APEX2 e marcação por biotinylation ocorreram. No entanto, a citolocalização da APEX2 por imunofluorescência, ocorreu de forma difusa em todo o corpo celular do parasita, portanto, concluiu-se que a HA-APEX2 não foi endereçada à mitocôndria de *P. falciparum*. Além da mitocôndria, o *P. falciparum*, possui outra organela plastidial com características *plant-like*, denominada apicoplasto. Por alguma razão, ainda desconhecida, ambas as organelas apresentam uma inter-relação bioquímica na biossíntese do grupo heme. Por esse motivo, as estratégias de predição *in silico* e *data mining* das proteínas mitocondriais e de apicoplasto, foram empregadas para compor os subproteomas preditos de ambas as organelas. No total, foram preditas 708 proteínas mitocondriais e 781 proteínas pertencentes ao apicoplasto de *P. falciparum*. Após uma comparação entre os bancos de dados, observou-se uma sobreposição de 108 proteínas. Para as proteínas mitocondriais, foram preditas proteínas referentes à cadeia transportadora de elétrons, e para as proteínas de apicoplasto, foram listadas proteínas pertencentes à via *de novo* de biossíntese de ácidos graxos do tipo II (FASII). Esta análise de bioinformática reforça as evidências amplamente conhecidas, acerca da biologia de ambas as organelas de *P. falciparum*. Além disso, foram listadas algumas proteínas nas quais já são estudadas para serem potenciais alvos de antimaláricos. Devido a marcação inespecífica da mitocôndria pela HA-APEX2, uma nova sequência está em fase de sub-clonagem para posterior transfecção. O intuito principal da realização das predições de ambas as organelas, está fundamentada nas características já expostas de ambas as organelas. Desse modo, um panorama detalhado acerca das características bioquímicas da mitocôndria e do apicoplasto já foi estabelecido, para auxiliar nas futuras análises proteômicas.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium falciparum*, mitocôndria, APEX2, biotinylation, predições *in silico*, *data mining*.

ABSTRACT

Malaria is a disease whose etiological agents are protozoa of the genus *Plasmodium*, and the species responsible for the most severe clinical cases is *P. falciparum*. In 2021, 247 million cases of malaria were recorded, with the African continent accounting for approximately 95% of cases. The predominant species in this region is *P. falciparum*, responsible for the most severe symptoms of the disease. In addition, over the years resistance of this parasite to reference antimalarials has been recorded, making it a health concern. Thus, studying the parasite becomes necessary. In order to better understand one of the essential organelles for the survival of the parasite, the present work aimed to use APEX2 to mark, through biotinylation, the mitochondrial proteins of *P. falciparum*. This methodology will catalyze the biotinylation reaction of proteins from cellular compartments of interest, allowing a detailed and reliable analysis of the proteomic content, through the enrichment of biotinylated proteins, using a substrate (biotin-phenol) and an oxidizing agent (hydrogen peroxide). The protein biotinylation assay was carried out after obtaining parasites transfected with the episomal expression plasmid containing an APEX2 coding sequence fused to a non-consensus transit peptide of a mitochondrial protein. Through Western Blot and streptavidin-blot analysis, it was observed that both HA-APEX2 expression and biotinylation labeling occurred. However, the cytolocalization of APEX2 by immunofluorescence occurred diffusely throughout the cell body of the parasite, therefore, it was concluded that HA-APEX2 was not specifically addressed in the mitochondrion of *P. falciparum*. In addition to mitochondrion, *P. falciparum* has another plastid organelle with plant characteristics, called apicoplast. For some reason still unknown, both organelles have a biochemical interrelationship in the biosynthesis of the heme group. For this reason, *in silico* prediction strategies and data mining of mitochondrial and apicoplast proteins were employed to compose the predicted subproteomes of both organelles. In total, 708 mitochondrial proteins and 78 proteins belonging to the apicoplast of *P. falciparum* were predicted. After a comparison between the databases, an overlap of 108 proteins was observed. For mitochondrial proteins, proteins related to the electron transport chain were predicted, and for apicoplast proteins, proteins belonging to the *de novo* pathway of type II protein biosynthesis (FASII) were listed. This bioinformatics analysis reinforces widely known evidence about the biology of both *P. falciparum* organelles. In addition, some proteins that are already studied to be potential targets of antimalarials were listed. Due to the nonspecific labeling of mitochondrion by HA-APEX2, a new sequence is in the process of being sub-cloned for further transfection. The main purpose of making predictions for both organelles is based on the already exposed characteristics of both organelles. Thus, a detailed overview of the biochemical characteristics of mitochondrion and apicoplast has already been established, to assist in future proteomic analyses.

Key Words: malaria, *Plasmodium falciparum*, mitochondrion, APEX2, biotinylation, *in silico* prediction, data mining.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Aspectos gerais e epidemiologia da malária.....	12
1.2. O vetor da malária: aspectos gerais e controle vetorial.....	13
1.3. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp.	14
1.4. A relação da mitocôndria e o apicoplasto de <i>P. falciparum</i> : aspecto gerais e alvo de antimaláricos	23
1.5. A vacina contra a malária e sua implementação.....	26
1.6. Resistência aos antimaláricos	27
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2. Etapas metodológicas concluídas	32
3. JUSTIFICATIVA	33
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. Cultura de <i>P. falciparum</i> e comitê de ética.....	34
4.2. Construção dos plasmídeos.....	34
4.3. Ensaio de transfecção em <i>P. falciparum</i>	36
4.4. Ensaio de biotinylação	37
4.5. Lise eritrocitária seletiva e lise dos parasitas.....	38
4.6. Imunoprecipitação com uso de <i>beads</i> magnéticas anti-HA.....	38
4.7. SDS-PAGE, <i>Western Blot</i> e estreptavidina- <i>blot</i>	38
4.8. Ensaio de imunofluorescência (IFA)	39
4.9. Predições <i>in silico</i> e mineração de dados dos subproteomas preditos de mitocôndria e apicoplasto	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Construção do plasmídeo	42
5.2. Validação da expressão da HA-APEX2 e do ensaio de biotinylação.....	43
5.3. Ensaio de imunofluorescência para validação da expressão da HA- APEX2 na mitocôndria de <i>P. falciparum</i> e da biotinylação das proteínas.....	45
5.4. Predições <i>in silico</i> e <i>data mining</i> do subproteoma da mitocôndria e apicoplasto de <i>P. falciparum</i> : em busca do elo perdido	49
5.4.1. A cadeia transportadora de elétrons e a sua relevância biológica com a mitocôndria de <i>P. falciparum</i>	52

5.4.2. A biossíntese de ácidos graxos do tipo II e a sua relação biológica com o apicoplasto de <i>P. falciparum</i>	60
5.4.3. A interrelação entre a mitocôndria e o apicoplasto: o que esperar?..	67
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	70
7. REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais e epidemiologia da malária

A malária é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* spp. e transmitida pela fêmea do mosquito de gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo (World Health Organization, 2022b). São conhecidas 5 (cinco) principais espécies de *Plasmodium* spp. capazes de infectarem o hospedeiro humano, são eles, o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (Prudêncio et al., 2006), sendo que, o *P. falciparum* é responsável pela forma mais grave da doença e pelas maiores taxas de mortalidade global (World Health Organization, 2021a).

Existem, atualmente, 84 (oitenta e quatro) países endêmicos da malária no mundo (**Figura 1**) (World Health Organization, 2022e). Eles estão localizados em regiões denominadas pela OMS de Sudeste Asiático, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental, Américas e região Africana (World Health Organization, 2021e). Os países com o maior número de casos das regiões citadas acima são Índia, Indonésia e Mianmar, para a região do Sudeste Asiático; Sudão, Somália e Iêmen, para a região do Mediterrâneo Oriental; Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão e Camboja, para a região do Pacífico Oriental; Venezuela, Brasil e Colômbia para a região das Américas; e a Nigéria, a República Democrática do Congo e a Uganda, para a região Africana. Vale ressaltar que a denominação dessas regiões é padronizada pela OMS (World Health Organization, 2022e).

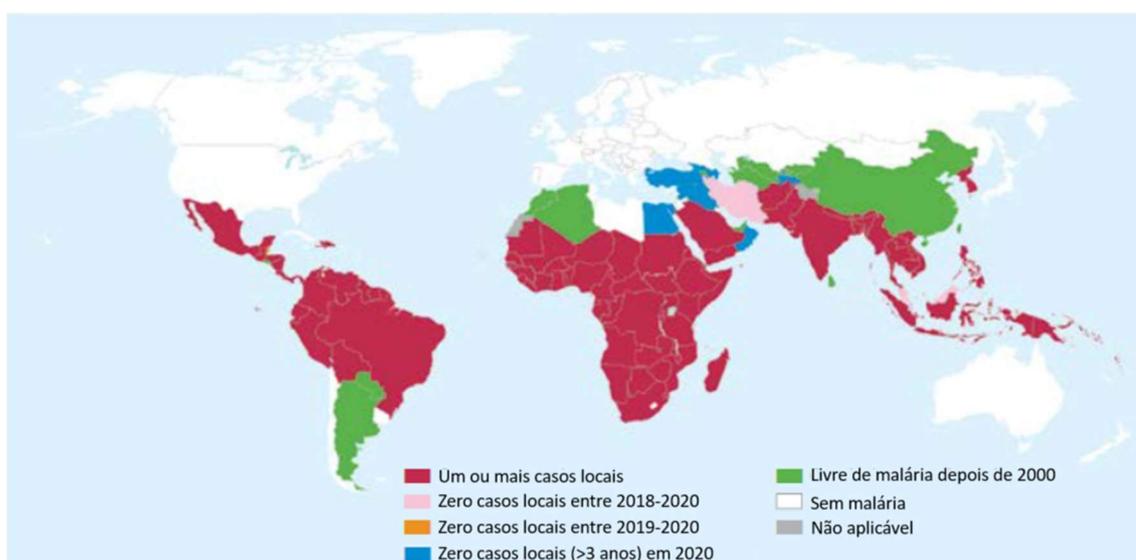


Figura 1. Países que registraram casos de malária entre 2000 e 2020. Os países que são considerados livres da malária, são aqueles que em 3 (três) anos consecutivos não apresentaram casos de malária local. **Fonte:** World Health Organization (2021e).

Em 2021, foram registrados 241 milhões de casos, sendo que a Região Africana foi responsável por aproximadamente, 95% do número total, seguido pela Região do Mediterrâneo Oriental, com 2,5%. O Sudeste Asiático, registrou 2% do número total de casos, o Pacífico Ocidental, aproximadamente 0,8% e as Américas 0,2%. Nesse mesmo ano, foram registradas 619 mil mortes e 96% delas ocorreram na Região Africana, sendo que 80% dessas mortes ocorreram em crianças abaixo de 5 anos de idade. A segunda região que registrou mais mortes, foi a Região do Mediterrâneo Oriental, que registrou 12 mil mortes (2% do total), das quais, 80% ocorreram no Sudão. Tanto na Região Africana, quanto no Sudão, a espécie predominante do agente etiológico é o *P. falciparum* (World Health Organization, 2021e).

Entre os anos 2000 e 2019, o número de casos e de mortes por malária reduziram consideravelmente, porém, em 2020, devido à pandemia de covid-19, esses números voltaram a subir (Weiss et al., 2021; World Health Organization, 2021e). No primeiro ano da pandemia (2020), o número de casos aumentou cerca de 6% e o número de mortes aumentou em 12% (World Health Organization, 2021e). Alguns dos fatores que podem ter ocasionado este cenário foi o sobrecarregamento do sistema de saúde, fazendo com que os pacientes infectados por malária não conseguissem ter acesso aos cuidados primários, levando ao agravamento da doença, e a diminuição da quantidade de profissionais para as intervenções necessárias, além das dificuldades na distribuição de redes tratadas com inseticidas e ao acesso aos tratamentos com antimaláricos (Weiss et al., 2021). Esses números são preocupantes para a Organização Mundial da Saúde (OMS), que alerta que a interrupção dos serviços de saúde pública, mesmo que de forma moderada, em uma população que está em alto risco de infecção, faz com que as taxas em relação à doença aumentem consideravelmente (World Health Organization, 2021e).

1.2. O vetor da malária: aspectos gerais e controle vetorial

As cinco espécies de *Plasmodium* spp. responsáveis pela infecção em humanos são transmitidas pelas fêmeas de aproximadamente 70 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* spp. (Molina-Cruz et al., 2016), sendo que 41 delas são consideradas vetores dominantes (do inglês, *dominant vectors species* – DVS) e estão distribuídas entre as Américas, Europa, Oriente Médio, África e Ásia (Sinka et al., 2012).

Os DVS são classificados assim, devido a sua abundância local, o hábito de picar humanos, alta longevidade, ou qualquer outra combinação de fatores que aumentam a sua capacidade de realizar o repasto sanguíneo (Hay et al., 2010). A Região Africana é a área

de maior taxa de transmissão devido à combinação desses fatores (World Health Organization, 2021a) e as espécies de anofelinos que dominam a região são: *Anopheles arabiensis*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus* (Sinka et al., 2012; Molina-Cruz et al., 2016).

O controle vetorial é um componente indispensável para as estratégias de controle da malária de acordo com a OMS (World Health Organization, 2021c). As principais medidas tomadas para tal, são a distribuição de telas tratadas com inseticidas (do inglês, *insecticide-treated nets* – ITNs) e pulverização residual interna (do inglês, *indoor residual spraying* – IRS). Apesar das duas medidas serem mais eficazes quando utilizadas em conjunto, a maior parte dos países endêmicos não possuem um financiamento suficiente para sustentação de ambas (Ngufor et al., 2015; World Health Organization, 2021c). Ao longo dos anos, o vetor tem apresentado resistência aos inseticidas recomendados pela OMS, levantando um alerta para os países endêmicos (World Health Organization, 2021e).

Os inseticidas de referência da OMS são: piretróides, ésteres fosfatos (organofosfatos), carbamatos e organoclorados. Nos últimos 10 anos, 78 países endêmicos relataram resistência vetorial há pelo menos um desses inseticidas, e, desses, 29 informaram resistência aos quatro grupos. Uma medida alternativa, realizada pela própria OMS é a utilização da combinação de inseticidas, sendo eles o piretróide conjugado ao butóxido de piperonila (*pyrethroid-PBO*). Esta combinação já foi implementada em 32 países endêmicos, sendo que 29 deles apresentaram resultados positivos (World Health Organization, 2021e).

1.3. Ciclo biológico do *Plasmodium* spp.

O ciclo do *Plasmodium* spp. é dividido entre o hospedeiro vertebrado (hospedeiro humano) e invertebrado (a fêmea do mosquito *Anopheles* spp.) (**Figura 2**) (CDC, 2020).

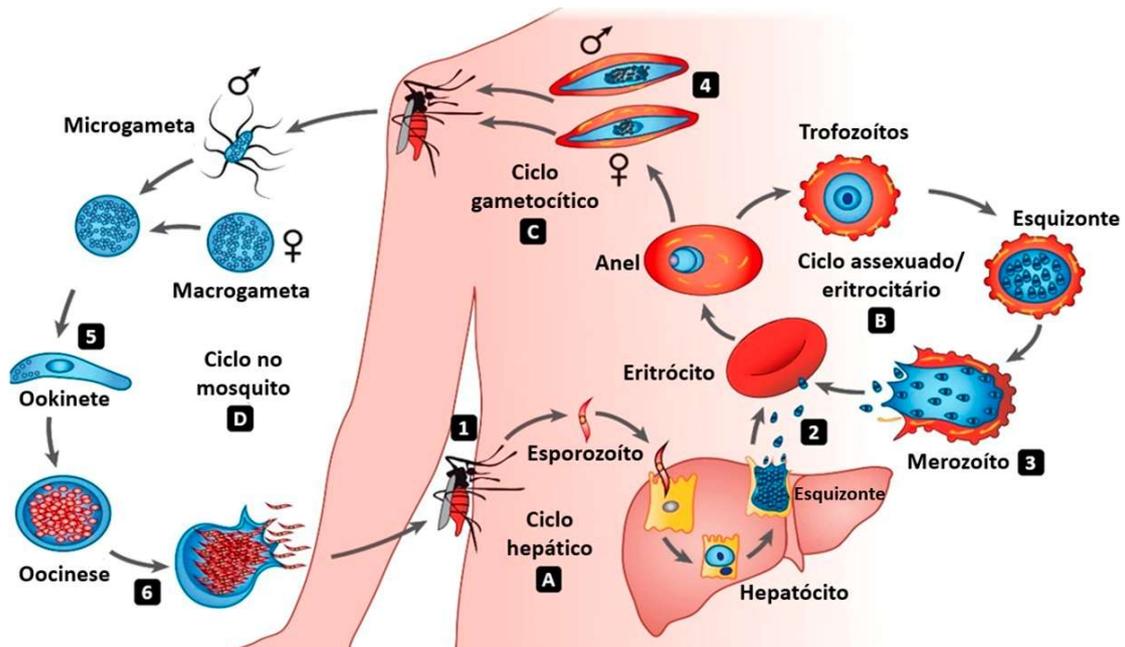


Figura 2. Ciclo Biológico de *Plasmodium* spp. O parasita possui um ciclo heteroxênico, ou seja, parte dele ocorre no hospedeiro invertebrado (mosquito), de forma sexuada, e outra parte ocorre no hospedeiro vertebrado (humano), de forma assexuada. O ciclo se inicia com a ingestão dos esporozoítos (1), dando início ao estágio hepático (A), na qual, serão formados os merozoítos (2) que irão invadir os eritrócitos na corrente sanguínea, iniciando o ciclo assexuado eritrocitário (B), responsáveis pelos sintomas do paciente infectado. O parasita, após a invasão eritrocitária, poderá se desenvolver sexualmente, iniciando o estágio sexuado/gametocítico (C) formando os gametas femininos e masculinos (4) que irão estar disponíveis para a ingestão do mosquito anofelino não-infectado. O desenvolvimento do parasita no mosquito (D) ocorre de forma sexuada e após a fecundação dos gametas o parasita se desenvolve em oocinetes e em seguida, ocorre a formação da oocinose e o desenvolvimento dos esporozoítos, na qual serão liberados ainda no intestino do mosquito, porém, irão migrar para as glândulas salivares do mesmo e reiniciar o ciclo no hospedeiro vertebrado (humano).

Durante o repasto sanguíneo, o mosquito infectado injeta sua saliva, que possui vasodilatadores e anticoagulantes (Hulden and Hulden, 2011), facilitando a injeção dos esporozoítos na circulação do hospedeiro humano (Cowman et al., 2012; Laurens, 2019). O esporozoíto possui forma alongada e tem como principais características: alta motilidade por deslizamento e alta capacidade de migração pelos hepatócitos (Hulden and Hulden, 2011). Além disso, sua seletividade com os hepatócitos pode envolver interações específicas entre proteínas da superfície do esporozoíto e das células hepáticas (Prudêncio et al., 2006). Acredita-se que essa interação é realizada pela proteína circunsporozoíta (CSP), uma proteína da superfície do esporozoíto na qual, presumivelmente, interage com proteoglicanos presentes na superfície dos hepatócitos (Prudêncio et al., 2006; Wang et al., 2020).

Os esporozoítos invadem os hepatócitos através das células de Kupffer, células fagocíticas especializadas do sistema fagocitário mononuclear, encontradas na superfície

luminal dos sinusoides hepáticos (Dixon et al., 2013) (**Figura 3A**), e, então, migram por algumas células hepáticas antes de se estabelecer e formar um vacúolo parasitóforo (VP) (Prudêncio et al., 2006). Dentro do VP, o parasita começa a se multiplicar assexuadamente, formando um esquizonte com múltiplos merozoítos (**Figura 3B**) (Laurens, 2019; Voleman and Dolezál, 2019). O fator que desencadeia a liberação dos merozoítos a partir dos hepatócitos ainda não é bem elucidado, porém sabe-se que esse processo não é realizado pela ruptura do hepatócito, e, sim pela formação de vesículas contendo merozoítos (merossomos) (**Figura 3C**). Esses merossomos podem conter milhares de merozoítos, e migram até o espaço sinusoidal do fígado e se rompem ao chegarem nos capilares, liberando os merozoítos para a corrente sanguínea (Prudêncio et al., 2006; Srivastava and Mishra, 2022).

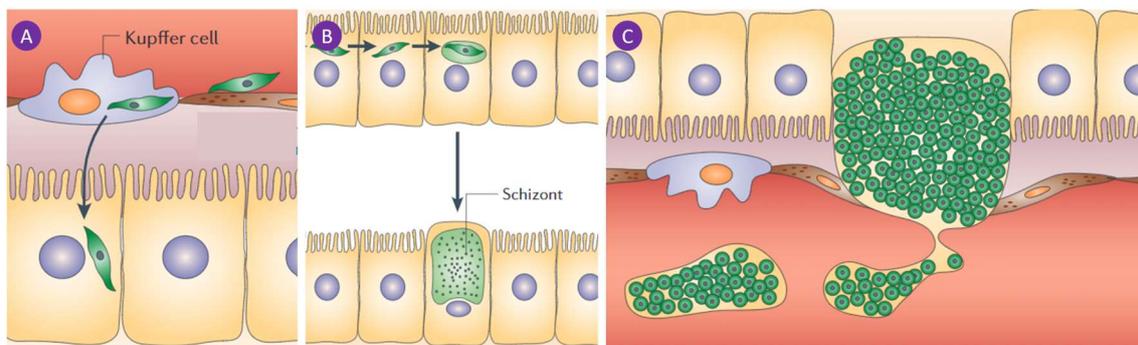


Figura 3. Representação dos esporozoítos no estágio pré-eritrocitário (ou fase hepática) do parasita. (A) Os esporozoítos invadem as células de Kupffer e a utiliza para chegar nos hepatócitos. (B) Já nos hepatócitos, o esporozoíto migra de célula em célula até se estabelecer e formar um vacúolo parasitóforo, se dividindo em um esquizonte, contendo milhares de merozoítos. (C) Após a esquizogonia hepática, ocorre a liberação dos merozoítos via merossomos na circulação sanguínea. **Fonte:** Prudêncio et al. (2006) adaptado.

Em algumas espécies de *Plasmodium* spp., como o *P. vivax* e o *P. ovale*, o esporozoíto pode permanecer dormente nos hepatócitos, ou seja, ele não completa o ciclo imediatamente (CDC, 2020). Essas células dormentes são chamadas de hipnozoítos, e, podem ficar dormentes por meses ou até mesmo anos (Hulden and Hulden, 2011). Não há estudos que comprovem, por definitivo, o mecanismo biológico de ativação e inativação do estágio de dormência do parasito. Porém, estudos preliminares, apontam que o relapso ocorre com repasto sanguíneo de uma anofelina não-infectada (Hulden and Hulden, 2011; White, 2011).

O estágio hepático, também chamado de estágio pré-eritrocítico, não possui patologia clínica, ou seja, o indivíduo infectado não apresenta sintomas nesse estágio (Cowman et al., 2012). Por esse motivo, e para evitar que o parasita entre no estágio sintomático eritrocítico, este estágio constitui um bom alvo para o desenvolvimento de

novos antimaláricos, e, principalmente, no desenvolvimento de vacinas (Casares et al., 2010).

A partir da ruptura dos merossomos e a liberação dos merozoítos na circulação sanguínea, inicia-se o ciclo assexuado eritrocitário (CDC, 2020). O merozoíto é a forma invasiva do parasita e é a única forma do parasita que está vulnerável à ação do sistema imunológico do indivíduo (Bannister et al., 2000; Dijkman et al., 2021). Sua morfologia é composta por uma proeminência apical, que dispõe de organelas diretamente ligadas à invasão eritrocítica, como por exemplo, as róptrias, os micronemas e os grânulos densos (Liffner et al., 2021) (**Figura 4**). O merozoíto também possui uma mitocôndria, um apicoplasto e um núcleo localizado em sua parte basal, próximo ao citoesqueleto, na qual possui os microtúbulos e os anéis polares ancoradas a ele, que são responsáveis pelo formato do merozoíto (Bannister et al., 2000; Evers et al., 2021).

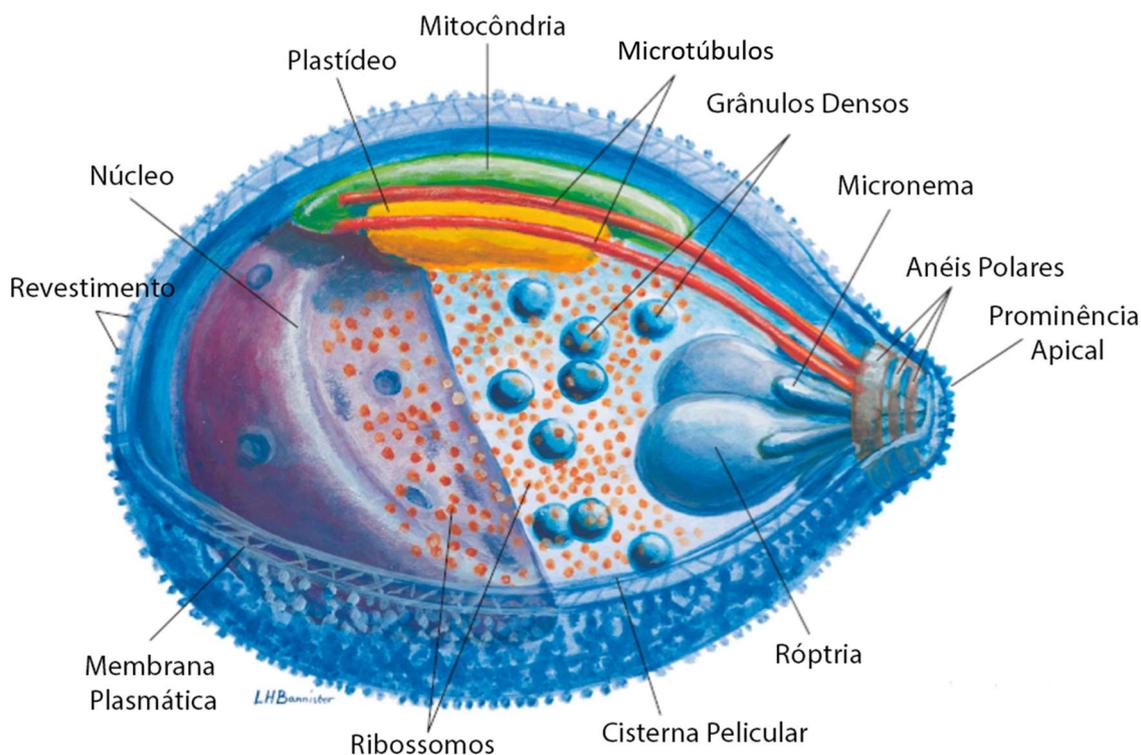


Figura 4. Morfologia tridimensional de um merozoíto de *P. falciparum*. As organelas que formam a proeminência apical de indivíduos do filo Apicomplexa: micronema, róptrias, grânulos densos e anéis polares. A representação de uma unidade de mitocôndria e apicoplasto é uma característica do grupo. O citoesqueleto, dá forma ao merozoíto e possui duas estruturas ancoradas à ele responsáveis pelo formato do merozoíto: microtúbulos e os anéis polares. **Fonte:** Bannister et al. (2000) adaptado.

A invasão celular, ocorre em três etapas: pré-invasão, invasão ativa e equinocitose (Cowman et al., 2016). A pré-invasão é a interação inicial do merozoíto com o eritrócito. Este primeiro contato pode ocorrer em qualquer ponto da superfície do merozoíto e a

partir desse momento, inicia-se uma reorientação para que a proeminência apical esteja em contato direto com a membrana da hemácia (**Figura 5**) (Wright and Rayner, 2014).

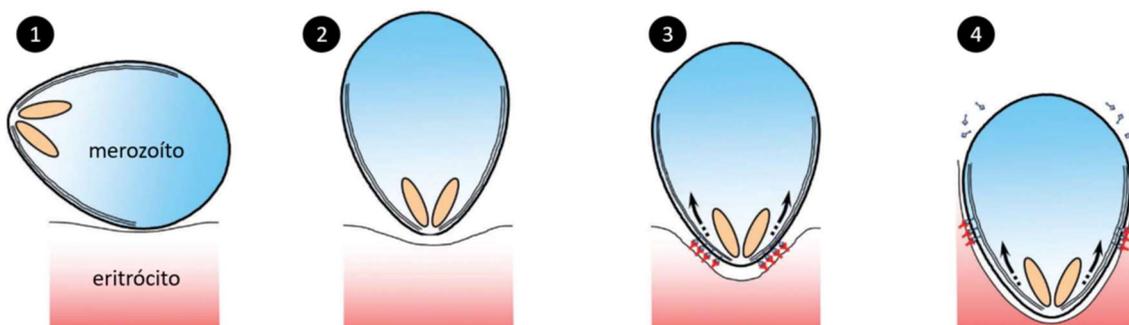


Figura 5. Fases da invasão do merozoíto. (1) O primeiro contato do merozoíto com o eritrócito. (2) Reorientação do merozoíto, para que sua parte apical fique em contato direto com a hemácia e inicie a invasão. (3) Formação da junção (*tight junction*) que auxilia o parasita a invadir a passar pela membrana eritrocitária. (4) Invasão ativa do merozoíto. **Fonte:** Wright and Rayner (2014).

A invasão ativa se inicia, logo após a formação da *tight junction* e, com o auxílio do motor actina-miosina, o parasita se estabelece na célula (Riglar et al., 2011; Weiss et al., 2015). Durante o processo de internalização do parasita, as róptrias secretam conteúdos ricos em lipídeos, os quais possivelmente, possuem relação com a estabilização da membrana do vacúolo parasitífero (Riglar et al., 2011). Um antígeno encontrado nos micronemas, denominado AMA1 (do inglês *apical membrane antigen 1*), consiste em uma proteína que se acredita ser responsável por auxiliar na reorientação e no processo de invasão do merozoíto (Riglar et al., 2011; Weiss et al., 2015; Antonelli et al., 2020).

Após o estabelecimento do parasita na célula hospedeira, os grânulos densos são secretados, dando início a exportação de proteínas para os glóbulos vermelhos infectados (GVI). Além disso, é nesse estágio que ocorre a equinocitose, processo em que a célula hospedeira é modulada e fica com aspecto estrelado (Riglar et al., 2011; Weiss et al., 2015). Após alguns minutos, a célula volta ao seu formato bicôncavo (Weiss et al., 2015). A partir do momento em que os parasitas já estão estabelecidos dentro das hemácias, inicia-se o ciclo assexuado eritrocitário do parasita, o qual se reinicia depois de 48h, com a liberação de novos merozoítos (**Figura 6**) (Laurens, 2019). Vale ressaltar que, desde a injeção dos esporozoítos, até o início do ciclo eritrocitário, são aproximadamente 16 dias (Casares et al., 2010; Antonelli et al., 2020). O ciclo eritrocitário tem grande importância, no que se diz respeito a patologia clínica, sendo o único estágio na qual o paciente apresenta sintomas (Laurens, 2019).

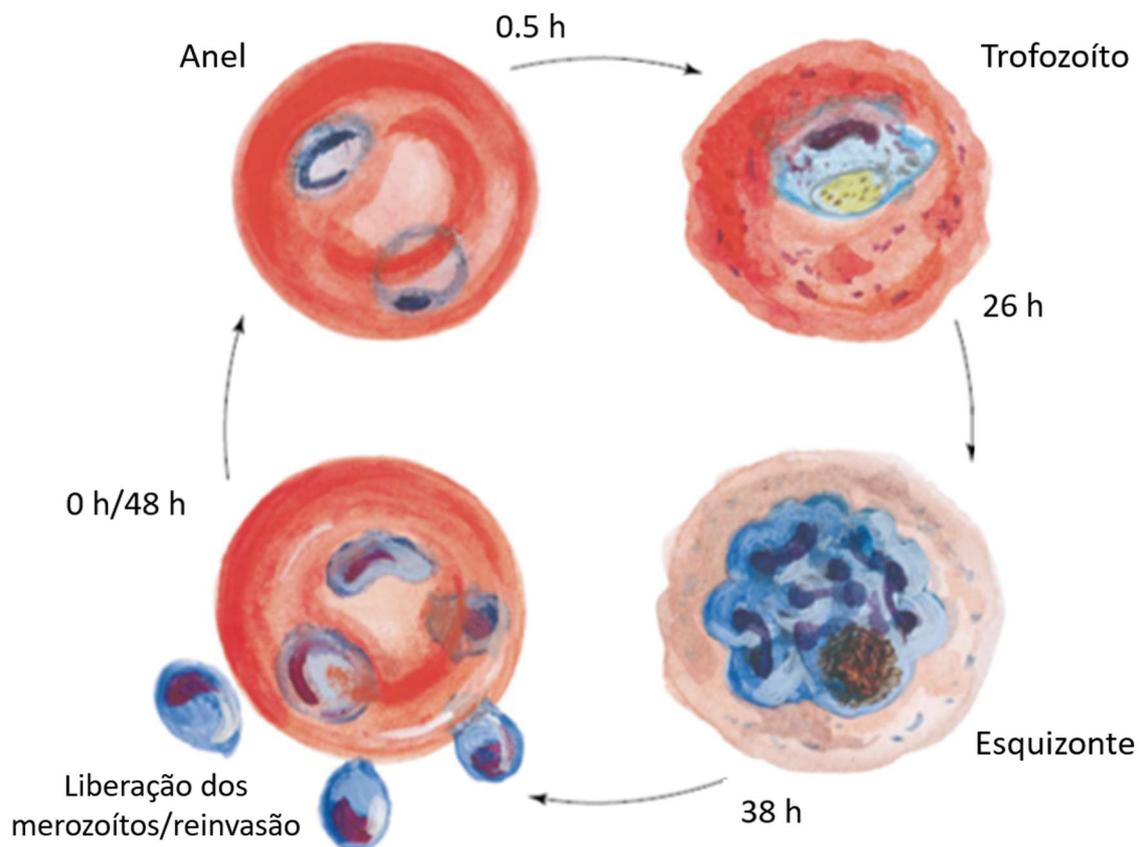


Figura 6. Representação das fases do ciclo assexuado eritrocítico do parasita. O ciclo completo tem duração de aproximadamente, 48 horas, na qual se reinicia a partir do momento em que os merozoítos invadem um novo eritrócito. Após a invasão eritrocitária pelo merozoíto, o parasita inicia seu ciclo pelo estágio em anel, ou trofozoíto jovem, na qual ocorre já na primeira hora. A partir da 26ª hora do ciclo, o parasita amadurece e entra no estágio de trofozoíto, em seguida, o parasita entra no estágio de esquizonte, na qual novos merozoítos são formados, aproximadamente, durante a sua 38ª hora do ciclo. Após as 48 horas do ciclo, os merozoítos são liberados na circulação para a invasão dos novos merozoítos. **Fonte:** Bannister et al. (2000) adaptado.

Ao se estabelecer totalmente no interior do eritrócito, o merozoíto assume uma forma achatada, fina e discoidal, conhecido como anel, ou trofozoíto imaturo (Bannister et al., 2000). Nessa fase, o parasita possui uma baixa atividade metabólica e para facilitar o seu desenvolvimento, o parasita ingere fragmentos do citosol do GVI para um vacúolo digestivo acidificado onde ocorrerá a digestão da hemoglobina. A liberação do heme nesse processo, gera produtos reagentes insolúveis, os quais são neutralizados pela formação de β -hematina, que se recristalizam em hemozoína quimicamente inertes, formando assim, o que é conhecido como pigmento da malária. Os cristais de hemozoína são formados durante todo o ciclo assexuado do parasita. Nessa fase também, se inicia a exportação de proteínas do parasita para a membrana da GVI (Bannister et al., 2000; Antonelli et al., 2020; Banas et al., 2021).

Cerca de 26 horas após o início do estágio de anel, o parasita entra no estágio de trofozoíto, que tem diferença basicamente morfológica em comparação ao estágio anterior. No trofozoíto, o vacúolo digestivo acidificado aumenta consideravelmente de tamanho, porque é a fase na qual a digestão da hemoglobina está em seu ápice (Banas et al., 2021). Nesse estágio, há também, um aumento na exportação de proteínas para a membrana eritrocitária, através de estruturas conhecidas como *Maurer's clefts*, as quais possuem papel importante no tráfego de proteínas para a membrana da GVI. Este tráfego de proteínas, facilita o transporte de proteínas associadas com a formação de proeminências membranares conhecidas como *knobs*, atribuindo às hemácias propriedades citoaderentes (Bannister et al., 2000; Banas et al., 2021).

Ao final do estágio de trofozoíto, a digestão da hemoglobina finaliza e o vacúolo digestivo acidificado é atrofiado, porém a exportação de proteínas para a membrana eritrocitária continua (Bannister et al., 2000; Banas et al., 2021). Nesse momento, o estágio de esquizogonia se inicia, onde há migração das organelas para os centros de merozoítos ocorre em uma ordem específica, sendo que o núcleo, a mitocôndria e o apicoplasto, são as últimas. Após o estabelecimento das organelas, a segmentação dos merozoítos é realizada por um anel de constrição (Bannister et al., 2000). Não se sabe exatamente, como que esse mecanismo funciona, já que o parasita não apresenta um homólogo para a proteína miosina II, que compõe o anel de actomiosina, responsável pela citocinese na maioria das células eucarióticas (Morano and Dvorin, 2021).

Ao final da fase de esquizonte, ocorre a ruptura da membrana do vacúolo parasitóforo, seguida da ruptura da membrana eritrocitária para a liberação dos merozoítos. Acredita-se que essa ruptura é acionada por secreções realizadas pelos próprios merozoítos (Bannister et al., 2000; Antonelli et al., 2020; Matz et al., 2020). Vale ressaltar que a liberação dos merozoítos ocorre após 48 horas depois da invasão eritrocitária (CDC, 2020).

Um dos principais sintomas, e comumente o primeiro a aparecer no paciente, é a febre causada pelas altas taxas de citocinas pró-inflamatórias liberadas na circulação devido ao rompimento dos esquizontes. Outro sintoma regular em pacientes infectados é a anemia moderada, causada pela ação dos macrófagos que eliminam as hemácias infectadas e pela ruptura dos esquizontes (Antonelli et al., 2020).

O *P. falciparum* é a espécie responsável pelos casos mais graves da malária (Oleinikov, 2022). Essa espécie tem como uma das principais características, modelar as GVIs expressando ligantes na membrana eritrocitária, que confere uma característica

adesiva (Yam et al., 2017). Essa característica, faz com que as GVIs consigam se ligar em células endoteliais, células do sistema imunológico, e estruturas sanguíneas, como as plaquetas, de maneira que o fluxo sanguíneo é diminuído, causando lesões nos endotélios e obstruções vasculares, e inflamações nos órgãos vitais (Milner, 2018; Moxon et al., 2019; Antonelli et al., 2020; Pontes et al., 2021; Oleinikov, 2022). Esse fenômeno, é conhecido como “sequestro de eritrócitos” (**Figura 7**), visto que as GVIs saem da circulação sanguínea (Milner, 2018). A causa dessa característica adesiva e ao sequestro não são bem compreendidos, porém, já se sabe que a proteína *PfEMP1* (do inglês, *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*) tem responsabilidade na ligação do eritrócito com receptores presentes no endotélio, tais como: CD36 (glicoproteína plaquetária 4), CAM1 (molécula de adesão intracelular 1), CSA (sulfato de condroitina A) e o receptor CR1 (receptor complementar 1), sendo que este último, se liga diretamente à *PfEMP1* para a iniciação do processo de *rosetting* (ou formação de rosetas) (Yam et al., 2017).

As GVIs por *P. falciparum* também se aderem a outras hemácias não-infectadas, formando “rosetas” (**Figura 7**) (Milner, 2018; Antonelli et al., 2020; Oleinikov, 2022). As rosetas, junto com o sequestro eritrocitário, causam sintomas como hipóxia cerebral, devido a obstrução do fluxo sanguíneo, e, conseqüentemente, a baixa oxigenação cerebral, além da obstrução dos órgãos, levando a insuficiência renal e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SADRA), por exemplo (Pontes et al., 2021; Oleinikov, 2022). Acredita-se que as rosetas sejam cruciais para o desenvolvimento do *P. falciparum* no hospedeiro, por dois principais motivos: (i) a sua formação está associada com o entendimento de que as GVIs podem ser rodeadas por eritrócitos não-infectados, portanto, protegendo as GVIs do sistema imunológico do paciente; (ii) além de garantir o egresso e re-invasão dos merozoítos sejam realizados, já que o merozoíto, ao sair da GVIs não estará sujeito ao sistema imunológico (Yam et al., 2017).

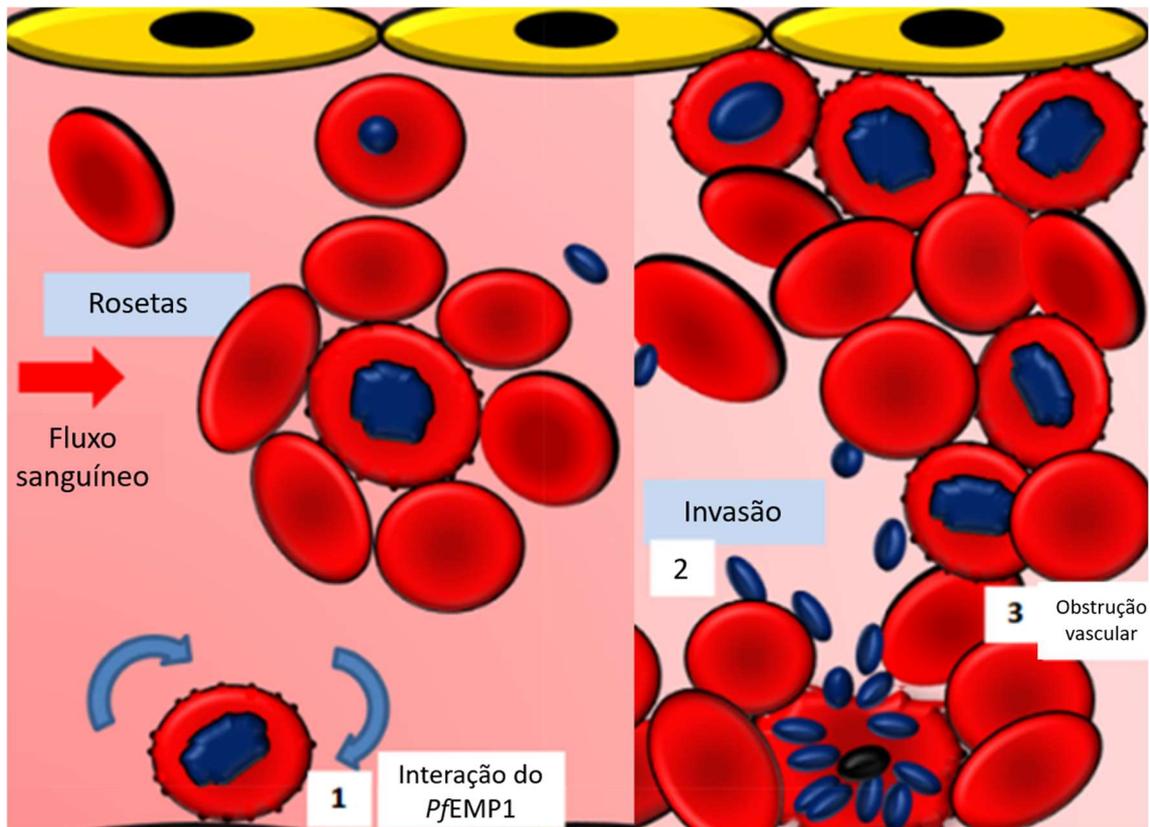


Figura 7. Representação do sequestro eritrocitário e da formação de rosetas. A característica aderente das membranas das GVI, faz com que elas saiam da circulação sanguínea, se aderindo aos epitélios locais (1) além de formar um aglomerado de hemácias, chamadas de rosetas, que também, podem causar obstrução vascular (3). O parasita se beneficia das rosetas, já que os merozoítos não precisam percorrer grandes distâncias para a invasão (2). As rosetas também protegem as GVI do sistema imunológico do indivíduo infectado. **Fonte:** Yam et al. (2017) adaptado.

Estudos sobre o estágio eritrocitário são de extrema importância, tendo em vista que, é nessa fase que o hospedeiro humano começa a apresentar sintomas (Moxon et al., 2019; Antonelli et al., 2020). Os sintomas considerados leves, são febres periódicas, dores de cabeça, calafrios, dores musculares, vômitos e em alguns casos icterícia leve e letargia (Antonelli et al., 2020), podendo evoluir para um quadro mais grave, como insuficiência renal, anemia severa, icterícia mais acentuada, sintomas parecidos com sepse, problemas respiratórios, edema cerebral, no caso de mulheres grávidas, obstrução da placenta e coma seguido de óbito (Cowman et al., 2012; Antonelli et al., 2020; Matz et al., 2020; Pontes et al., 2021). O indivíduo infectado não necessariamente apresenta sintomas na ruptura dos primeiros esquizontes, mas sim, ao longo do aumento da parasitemia (Milner, 2018; Laurens, 2019).

Os pacientes infectados por *P. vivax* não costumam apresentar sintomas graves, porém, a preocupação se torna os hipnozoítos, que podem causar relapsos no paciente caso o tratamento do mesmo não seja realizado da forma correta (Milner, 2018). O

sequestro eritrocitário e as rosetas não são fenótipos exclusivos de *P. falciparum*, já que existem estudos que demonstram a presença desses fenômenos em pacientes infectados com *P. vivax*, porém, não é o suficiente para causar os sintomas graves (Antonelli et al., 2020).

O ciclo eritrocitário também possui uma fase sexuada, a gametogênese, na qual, após a invasão eritrocitária, alguns merozoítos se desenvolvem em gametócitos femininos (macrogametócitos) ou masculinos (microgametócitos) (Laurens, 2019; Voleman and Doležal, 2019). Esses gametas, ainda imaturos, percorrem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, até serem ingeridos pela fêmea do *Anopheles* spp. no repasto sanguíneo. No intestino do mosquito, os gametócitos são maturados e se fecundam, formando o zigoto, que irá se desenvolver em oocinetos e depois se maturar em oocistos. Os oocistos abrigam vários esporozoítos, que serão liberados no intestino do mosquito e irão migrar até as glândulas salivares. Uma vez nas glândulas salivares do mosquito, os esporozoítos conseguem ser injetados no hospedeiro humano no próximo repasto sanguíneo do anofelino, reiniciando o ciclo biológico do *Plasmodium* spp. (CDC, 2020).

1.4. A relação da mitocôndria e o apicoplasto de *P. falciparum*: aspecto gerais e alvo de antimaláricos

A mitocôndria é uma organela de origem simbiótica e, assim como outras organelas de mesma origem, vêm apresentando evoluções junto com sua célula hospedeira, principalmente no que se refere à perda e transferência de genes (Painter et al., 2007). Em cada organismo eucariótico, esse processo ocorreu de forma diferente e no caso dos indivíduos do filo Apicomplexa, essa evolução resultou em uma única mitocôndria por organismo, sendo ela a menor conhecida até então (Painter et al., 2007; Mather and Vaidya, 2008). Em *Plasmodium* spp., a mitocôndria está associada ao apicoplasto, organela que também tem origem simbiótica e está presente em outros indivíduos do mesmo filo (Voleman and Doležal, 2019). Para garantir que ambas as organelas se instalem em cada célula filha durante a segregação nuclear, elas se dividem ao mesmo tempo, fixando-se próximas ao núcleo celular (Van Dooren et al., 2006; Mather and Vaidya, 2008; Voleman and Doležal, 2019).

Pelo fato das espécies do gênero *Plasmodium* spp. possuírem um ciclo de vida que alterna entre ciclo assexuado (hospedeiro vertebrado) e sexuada (hospedeiro invertebrado), as exigências metabólicas variam de acordo com o estágio no qual o parasita se encontra, o que pode acarretar diferenças nas funções e até mesmo, na estrutura

das organelas como por exemplo, a presença das cristas mitocondriais dos gametócitos e a ausência delas nas fases assexuadas do parasita (Evers et al., 2021). Essa característica, pode ser considerada como uma consequência do metabolismo energético do parasita, que em sua fase intra-eritrocitária é curiosamente reduzida (Voleman and Dolezál, 2019).

A mitocôndria de *Plasmodium* spp. possui duas membranas, uma externa e outra interna, assim como a maioria dos eucariotos, porém a sua estrutura interna e sua principal função diferem em alguns aspectos dos demais organismos eucarióticos (Mather and Vaidya, 2008). Para a maioria dos eucariotos, a mitocôndria é a fonte principal de adenosina trifosfato (ATP), produzida pela cadeia transportadora de elétrons (CTE), a qual se localiza na parte interna da membrana interna da organela (Chinnery and Schon, 2003). Já em *Plasmodium* spp., em sua fase eritrocitária assexuada, já se sabe que sua fonte principal de ATP vem da via glicolítica anaeróbica (Srivastava et al., 1997; MacRae et al., 2013; Penkler et al., 2015), onde o piruvato, é convertido em lactato pela lactato desidrogenase (Uyemura et al., 2004; Mather and Vaidya, 2008). Dessa forma, vale ressaltar que, neste estágio, a mitocôndria do parasita não realiza o ciclo do ácido cítrico (Uyemura et al., 2004).

A CTE, na fase eritrocitária assexuada de *Plasmodium*, é fonte primária de gradiente eletroquímico de prótons (Uyemura et al., 2004) e sabe-se que ela é composta pelos complexos II ao IV, os mesmos presentes na mitocôndria da maioria dos eucariotos (Mather and Vaidya, 2008). O complexo I é ausente, porém é compensado por uma unidade única de NADH:ubiquinona desidrogenase (NADH₂) e se assemelha com o que é encontrado em plantas e fungos (Mather and Vaidya, 2008; Evers et al., 2021). A enzima NADH₂, por ser ausente no hospedeiro humano, tornou-se um potencial alvo para antimaláricos (Degli, 1998), porém, estudos mais recentes realizaram experimentos envolvendo o *knockout* desta enzima e foi constatado que não houve interrupção do desenvolvimento do parasita, concluindo que a NADH₂ não é essencial para o parasita (Ke et al., 2019).

Apesar da baixa atividade da CTE do parasita, ela é crucial para a sua sobrevivência e isso já foi demonstrado em estudos anteriores, onde a inibição do complexo III pela hidroxi-naftoquinona foi letal ao parasita, dando origem à produção do antimalárico atovaquona (Fry and Pumey, 1992). O complexo III, também conhecido como complexo do citocromo *bc*₁, catalisa o transporte de elétrons do ubiquinol para o citocromo c e esse processo faz parte da via de regeneração da ubiquinona (ou coenzima Q), a qual é essencial para a via *de novo* da biossíntese de pirimidinas do parasita (Painter

et al., 2007; Evers et al., 2021). A inibição desta via, causa um colapso do potencial da membrana mitocondrial se tornando fatal (Painter et al., 2007; Barton et al., 2010; MacRae et al., 2013). Apesar da mitocôndria de mamífero também apresentar o complexo III, a quantidade da droga utilizada para a inibição do parasita, não apresenta danos às células do hospedeiro (Mather et al., 2005).

Outra organela vital ao parasita é o apicoplasto, um plastídio não-fotossintético, presente nos indivíduos do grupo Apicomplexa. Sua origem vem de uma endossimbiose secundária, muito provavelmente proveniente de uma cianobactéria que evoluiu e perdeu sua atividade fotossintética (Ralph et al., 2004; Dahl and Rosenthal, 2008). Apesar de sua função não ser totalmente conhecida, ela tem papéis importantes como a síntese de ácidos graxos, síntese do grupo heme, síntese de isoprenóides e de precursores de *clusters* de proteínas ferro-enxofre na fase eritrocitária assexuada (Ralph et al., 2004; Lim and McFadden, 2010; Biddau and Sheiner, 2019). Além disso, o fato de ser uma organela altamente especializada característica do filo Apicomplexa, a torna um ótimo potencial para possíveis alvos terapêuticos (Ralph et al., 2004; Okada et al., 2022).

Alguns antibióticos como a doxiciclina e a clindamicina, inibem a tradução de proteínas no apicoplasto, impedindo o desenvolvimento desta organela nos merozoítos em formação (Okada et al., 2022). Esses antibióticos causam o *delayed death* do parasita, ou seja, na presença desses antibióticos, o parasita consegue completar o seu ciclo e realizar a reinvasão dos merozoítos, já em seu segundo ciclo, os merozoítos se desenvolvem sem a presença do apicoplasto, sendo incapazes de realizar uma segunda reinvasão, interrompendo o ciclo do parasita, sendo um fator limitante para a aplicação clínica desses antibióticos (Dahl and Rosenthal, 2008; Okada et al., 2022). Existem algumas especulações de que o apicoplasto está relacionado com a viabilidade de infecção do parasita, estando diretamente relacionado com o vacúolo parasitóforo ou que algum recurso é reestabelecido pela organela durante a invasão celular (Ralph et al., 2004).

A mitocôndria e o apicoplasto compartilham a via de biossíntese do grupo heme, se iniciando na mitocôndria, com a formação do δ -aminolevulanato (ALA) pela enzima δ -aminolevulanato sintase (ALAS); em seguida, a ALA é convertida em porfobilinogênio pela enzima δ -aminolevulanato desidratase (ALAD ou HemB), no citoplasma, que por sua vez, é convertido em hidroximetilbilano pela enzima porfobilinogênio desaminase (HemC) no apicoplasto (Ralph et al., 2004). Apesar de não haver uma compreensão completa de como funciona tal via no parasita, é importante ressaltar que esta peculiaridade metabólica da interrelação de ambas as organelas, levanta questionamentos

em relação a possíveis outras vias que podem ser (ou não) também compartilhadas, e, possivelmente ainda não caracterizadas. Estas características fazem da mitocôndria e o apicoplasto alvos de grande relevância biológica, na descoberta de possíveis alvos antimaláricos.

1.5. A vacina contra a malária e sua implementação

A produção de uma vacina eficaz contra a malária pode ser considerada como um enorme desafio, pois o parasita possui um ciclo biológico bastante complexo (IPEA, 2021). A RTS,S/AS01 (Mosquirix®) é a primeira e, atualmente, a única vacina contra a malária, recomendada pela OMS. Criada em 1987 por uma colaboração entre *Glaxo Smith Kline* (GSK) e *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR), tem como mecanismo induzir a produção de anticorpos contra a proteína circunsporozoíta (do inglês, *circumsporozoite protein*, CSP), presente na superfície dos esporozoítas de *P. falciparum*, impedindo que ele infecte os hepatócitos (Laurens, 2019). As vacinas contra a malária são classificadas de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasita em que ela atua, podendo ser pré-eritrocítico, intra-eritrocítico e bloqueadores de transmissão; no caso da Mosquirix®, trata-se de uma vacina pré-eritrocítica (Casares et al., 2010; Laurens, 2019). A ideia da vacina pré-eritrocítica é fazer com que o parasita dentro do hepatócito seja detido, impedindo que a fase eritrocitária (o estágio sintomático da doença), se inicie (Weiss et al., 2015).

A Mosquirix® foi implementada em 2019, pelo Programa de Implementação à Vacina Contra a Malária da OMS, em três países que possuem uma taxa de transmissão de *P. falciparum* em uma escala entre média e alta localizados na África Subsaariana, Gana, Quênia e Malawi (World Health Organization, 2022c, 2022a). Inicialmente, o programa teve como objetivo dar acesso às crianças dessas regiões, a pelo menos, uma estratégia de prevenção à doença, ou seja, estarem dormindo debaixo de ITNs ou terem sido vacinadas. Em 2022, foi relatado que nos três países pilotos, cerca de 2/3 das crianças que não tinham acesso às ITNs receberam, pelo menos, a primeira dose da vacina (World Health Organization, 2022a), e, no total, foram registradas mais de 1 milhão de crianças vacinadas (World Health Organization, 2022d).

Desde 2019, foi observado uma redução de 30% na mortalidade de crianças, nos países onde a vacinação foi implementada, mesmo em regiões onde há ampla distribuição de ITNs e amplo acesso ao tratamento antimalárico (World Health Organization, 2021d). Com isso, a OMS divulgou em outubro de 2021, a implementação definitiva da vacina

Mosquirix® nas regiões africanas, onde a transmissão da doença causada por *P. falciparum* é considerada média e/ou alta (IPEA, 2021; World Health Organization, 2021d).

Em setembro de 2022, Dattoo e colaboradores publicaram um estudo demonstrando que, uma outra vacina contra a malária, possui uma eficiência de 80% de proteção contra a doença (Dattoo et al., 2022). A vacina conhecida como R21/Matrix-M é pré-eritrocítica, assim como a Mosquirix®, foi desenvolvida pela Universidade de Oxford, da Inglaterra e é, atualmente, produzida pelo *Serum Institute of India*, na Índia. A vacina R21 consiste em uma partícula vírus-like, baseada na porção C-terminal da proteína circumsporozoíta da cepa NF54 de *P. falciparum*, fusionada à porção N-terminal da HBsAg, um antígeno do vírus da Hepatite B (Moorthy and Binka, 2021)

O grupo de pesquisa que realizou estes estudos estão otimistas para implementar a vacina R21/Matrix-M no ano de 2023, além disso, a OMS publicou em 2013, que um dos objetivos almejados em relação à malária é a produção de uma vacina com eficácia de pelo menos 75% (Malaria Vaccine Funders Group, 2013), o que já foi atingido por Dattoo et al. (2022).

1.6. Resistência aos antimaláricos

Os fármacos mais comuns têm como alvo a fase eritrocitária do parasita (Suresh and Halder, 2018). A artemisinina e seus derivados (artesanato, arteméter, dihidroartemisinina [DHA]) são utilizados na linha de frente em combinação com outros antimaláricos como uma estratégia de “combinação terapêutica baseada em artemisinina” ou simplesmente ACTs (do inglês, *artemisinin-based combination therapy*) para pacientes infectados, principalmente, por *P. falciparum* em estágio não-avançado (World Health Organization, 2021b). Esse fármaco, possui atividade em quase todas as fases eritrocíticas de *P. falciparum* (anel, trofozoíto e esquizonte) e sexuada (gametócitos imaturos), além de diminuir a parasitemia do paciente (Fairhurst et al., 2012; World Health Organization, 2021b). O ferro do grupamento heme da hemoglobina é responsável por fazer a clivagem na ligação endoperóxida da artemisinina, produzindo radicais livres do oxigênio e radicais de carbono, sendo que seus intermediários, são tóxicos para o parasita, levando a morte do mesmo (Fairhurst and Dondorp, 2016; Naß and Efferth, 2019).

Outro antimalárico de referência, a atovaquona, tem como mecanismo bloquear a regeneração da ubiquinona, que é essencial para a cadeia transportadora de elétrons

(Painter et al., 2007; Evers et al., 2021). Sem a ubiquinona, o elétron não é transportado para o citocromo c, que faz parte do complexo III, ou complexo citocromo *bc* (Barton et al., 2010; MacRae et al., 2013) e, conseqüentemente, a mitocôndria se instabiliza e então sofre um colapso, causando a morte do parasita. Vale ressaltar que a mitocôndria, mesmo não sendo a fonte principal de energia, para o parasita, possui um papel essencial na biossíntese de pirimidinas, tornando-se crucial para o desenvolvimento do parasita (Vaidya and Mather, 2005). Apesar do hospedeiro humano também possuir o complexo III, já se sabe que ambas são estruturalmente diferentes, sendo assim, o fármaco não é capaz de causar danos à mitocôndria humana (Nixon et al., 2013).

Infelizmente, a OMS já vêm sendo reportada sobre a resistência parcial à artemisinina em duas partes do mundo: na sub-região de Grande Mekong, no sudeste asiático e na África Oriental, principalmente na Uganda e Ruanda (Balikagala et al., 2021; World Health Organization, 2021b). Há também, registros de resistência à atovaquona devido a uma mutação na proteína do citocromo b (Maude et al., 2014). Nos anos 50, a cloroquina foi o primeiro antimalárico a apresentar resistência em *P. falciparum*. Posteriormente, foram reportadas resistências a quase todas as outras drogas como a sulfadoxina/pirimetamina, mefloquina, halofantrina e quinina (CDC, 2018). A resistência aos antimaláricos de referência é uma das maiores preocupações e uma das maiores ameaças para o controle da doença (Cottrell et al., 2014).

1.7. A tecnologia de marcação por proximidade baseada na APEX2: aspectos gerais e aplicações

A primeira técnica de identificação por biotinylation dependente de proximidade (BioID), foi realizada por Roux et al. (2012). Os autores se basearam na DamID, uma técnica utilizada para marcação de sequências de DNA, em células eucarióticas, por meio da metilação catalisada pela enzima Dam fusionada a uma proteína de ligação ao DNA. Dessa forma, os autores buscaram por uma marcação específica, incomum em proteínas, para que seja possível o isolamento e a identificação dessas proteínas marcadas (Roux et al., 2012).

A BioID consiste na fusão da biotina ligase (BirA) de *Escherichia coli* a uma proteína de interesse. Após a incubação das amostras com a biotina, a reação de biotinylation ocorre com a formação de uma ligação amida entre a BirA e um resíduo de lisina (K). Ressalta-se que esta reação ocorre em um raio de aproximadamente 10 nm (**Figura 8**) (Roux et al., 2012; Kimmel et al., 2021). Apesar da metodologia já ter tido

resultados, a BirA foi otimizada, para aumentar a sua atividade de biotinylação, originando a BirA* (Kimmel et al., 2021).

BioID

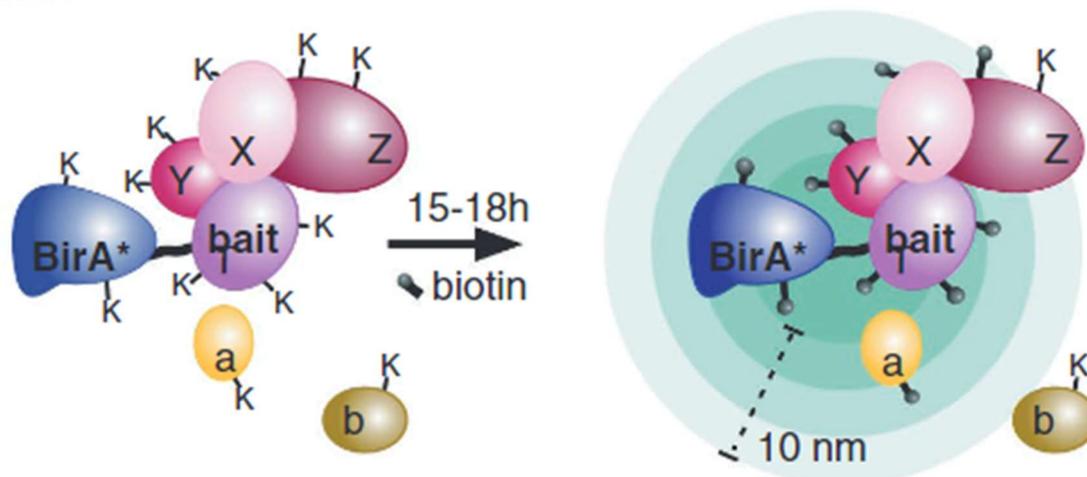


Figura 8. Biotinylação das proteínas pela metodologia BioID. A biotinylação das proteínas próximas a proteínas de interesse (*bait*) ocorre com a presença da biotina no ambiente e é realizada pela BirA*. **Legenda:** Y, X e Z são proteínas que interagem com a proteína de interesse. K representa um resíduo de lisina, em que a biotina poderá se ligar. As letras **a** e **b** são proteínas que estão próximas à proteína de interesse (*bait*). **Fonte:** (Kimmel et al., 2021) adaptado.

A metodologia de biotinylação dependente de proximidade, pode ser utilizada para marcação de proteínas de um compartimento celular específico, sendo assim, a enzima que realizará a marcação é fusionada a um peptídeo sinal, na qual irá endereçar a proteína de interesse ao compartimento (Kimmel et al., 2021).

Outra técnica utilizada para biotinylação por proximidade é a ascorbato peroxidase (APEX), na qual foi desenvolvida por Martell e colaboradores (2012) a fim de obter imagens por microscopia eletrônica do citoplasma de células de mamífero. Os autores perceberam que a *horseradish peroxidase* (HRP), uma peroxidase comumente utilizada para tal metodologia, não possuía atividade catalítica naquele ambiente, já que o citoplasma das células de mamífero apresenta baixas concentrações de cálcio e a HRP é dependente dele para a sua reação de oxidação. Dessa forma, foi introduzida a APEX, para obtenção das imagens nesses ambientes em que há escassez de cálcio (Martell et al., 2012; Rhee et al., 2013b; Han et al., 2019). A APEX é uma heme peroxidase que possui 28 kDa e é derivada de uma peroxidase de planta, citosólica de classe I (Martell et al., 2012; Rhee et al., 2013a; Lam et al., 2015; Han et al., 2019).

Para obtenção de uma imagem através da microscopia eletrônica, geralmente, a APEX é fusionada a uma proteína de interesse, funcionando como isca para parceiros de

interação ou fusionada a um peptídeo sinal, para um determinado compartimento celular. Em seguida, essas células são fixadas em uma lâmina e então são adicionadas uma solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A reação se dá pela polimerização e deposição local do DAB pela APEX. Por fim, o ósmio eletrodenso é recrutado, dando o contraste para a imagem da microscopia (Lam et al., 2015).

Rhee e colaboradores (2013) utilizaram essa metodologia para um mapeamento proteômico da matriz mitocondrial de uma célula HEK 293 (células do rim de embrião humano). Os pesquisadores reforçam que já existia um proteoma deste compartimento, porém, havia uma baixa quantidade de proteínas listadas. Para a reação de biotinylation pela APEX, foi adicionada, em uma cultura de células *in vitro*, biotina-fenol e H₂O₂. A APEX catalisa a reação de oxidação da biotina fenol, liberando radicais fenólicos, os quais possuem meia-vida curta (< 1ms), um baixo raio de alcance (< 20nm) e reagem facilmente com aminoácidos ricos em elétrons como a tirosina, triptofano, histidina e cisteína, portanto, os radicais fenólicos se ligam às proteínas que estão nas proximidades (**Figura 9**) (Lam et al., 2015). Após a reação, as proteínas são isoladas, utilizando *beads* de estreptavidina ou anticorpos anti-biotina para identificação através da espectrometria de massas *shotgun label-free* (Rhee et al., 2013; Lam et al., 2015; Udeshi et al., 2017; Kim et al., 2018; Han et al., 2019).

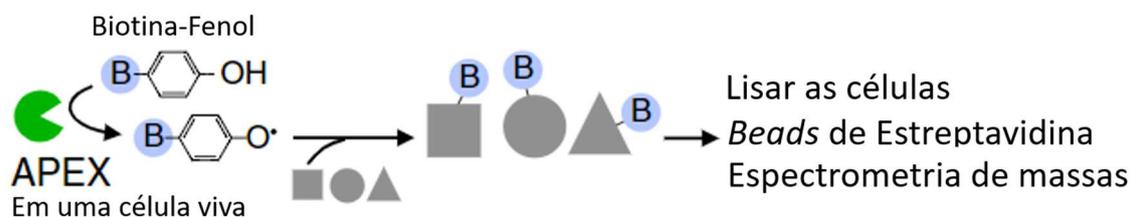


Figura 9. Esquema da utilização da APEX para biotinylation das proteínas. A cultura é tratada com biotina-fenol e então é adicionado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para que a reação seja realizada pela peroxidase. Após a reação de biotinylation, é necessário realizar uma lise celular e, em seguida, isolar as proteínas marcadas utilizando *beads* de estreptavidina. O objetivo final, é identificar as proteínas marcadas em um espectrômetro de massas. **Fonte:** Lam et al. (2015) adaptado.

Apesar da implementação da metodologia, foi observada uma limitação no que se diz respeito a baixa sensibilidade da APEX para catalisar a reação de oxidação. Isso significa que, quando a APEX é pouco expressa, a reação não ocorre e, em contrapartida, quando ela é altamente expressa, se torna prejudicial para a célula viva, causando agregações das organelas, por exemplo (Lam et al., 2015). Com isso, Lam e colaboradores (2015), fizeram um estudo para otimizar a sensibilidade da APEX. Os autores utilizaram

as plataformas *Yeast display*, de engenharia proteica, e FACS, que realiza a classificação de células ativadas por fluorescência, utilizado para isolar grupos de células utilizando marcadores fluorescentes, para identificar possíveis candidatos. E então, foi selecionado um mutante que possuía uma variante na posição A134P, localizada adjacente ao sítio de ligação do substrato aromático da APEX. Ao realizar os testes de biotinylation, utilizando a APEX mutante (APEX2), nas células HEK, foi observado que o mutante apresentou maior atividade de biotinylation em relação à APEX.

A APEX2 então se tornou uma metodologia de marcação por proximidade utilizada principalmente para identificação de proteínas, com uma resolução temporal-espacial, tendo em vista que sua reação ocorre de forma rápida e não alcança compartimentos e/ou complexos proteicos distantes de onde a APEX2 foi direcionada (Rhee et al., 2013b; Lobingier et al., 2017a).

Vélez-Ramírez e colaboradores (2021) utilizaram a APEX2 para um mapeamento proteômico do flagelo de *Trypanosoma brucei*, devido à sua importância na viabilidade, infecção e transmissão do parasita. Em busca de uma melhor compreensão da questão espaço-temporal da biotinylation realizada pela APEX2, os autores a endereçaram para dois compartimentos diferentes, a ponta do flagelo e uma porção mais distante. O resultado foi dois proteomas bastante distintos entre eles, indicando que a biotinylation ocorreu apenas nos domínios específicos em que a APEX2 foi endereçada, mesmo sem a presença de uma barreira física. Uma comparação entre os resultados obtidos e a literatura foi realizada para a confirmação de que as proteínas identificadas pertenciam aos domínios estudados (Vélez-Ramírez et al., 2021).

Outro estudo no qual o mapeamento proteômico realizado, utilizou-se da APEX foi o trabalho de Seidi e colaboradores (2018), que buscaram realizar o proteoma da matriz mitocondrial de *Toxoplasma gondii*, comparando a técnica da APEX com a técnica de BioID. Os autores identificaram cerca de 400 proteínas mitocondriais utilizando a APEX, enquanto, para a técnica de BioID, foram identificadas 208 proteínas. Os autores reforçam que ambas as técnicas são grandes potenciais para a elucidação do proteoma de Apicomplexos, principalmente no que diz respeito a organelas e sub-compartimentos de organelas, como por exemplo, o espaço intermembranar da mitocôndria.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Implementar a abordagem APEX2 para realizar a marcação através da biotinylation das proteínas mitocondriais de *P. falciparum*; e utilizar ferramentas *in silico* e *data mining* para realizar uma predição dos subproteomas de mitocôndria e apicoplasto.

2.2. Etapas metodológicas concluídas

- (i) Obter as construções dos plasmídeos que endereçam a APEX2 à mitocôndria (pCC1-SP(TrxR)-HA-APEX2) e citosol (pCC1-HA-APEX2);
- (ii) Realizar a transfecção com uso da plataforma Amaxa II Nucleofector II AAD-1001N (Lonza), para a obtenção dos parasitas mutantes com o vetor pCC1-SP(TrxR)-HA-APEX2;
- (iii) Validar da expressão da HA-APEX2 a partir dos parasitas mutantes com uso de anti-HA e/ou anti-APEX2;
- (iv) Validar a biotinylation das proteínas mitocondriais com o uso de estreptavidina-HRP;
- (v) Avaliar a marcação de HA-APEX2 e da biotinylation das proteínas mitocondriais por microscopia de fluorescência;
- (vi) Avaliar a marcação de diferentes MitoTracker na linhagem tipo selvagem 3D7 de *P. falciparum*;
- (vii) Utilizar os algoritmos MitoFates e TargetP para as predições *in silico* e as plataformas UniProt e PlasmoDB para anotações de proteínas mitocondriais;
- (viii) Utilizar as plataformas UniProt e PlasmoAP (ferramenta do PlasmoDB), e referências na literatura para as anotações das proteínas do apicoplasto;
- (ix) Utilizar o KEGG e GO *terms* para as análises funcionais das proteínas anotadas de ambas as organelas.

3. JUSTIFICATIVA

A malária ainda é considerada uma das grandes preocupações da saúde pública mundial, de acordo com a OMS, além disso, isolados de *P. falciparum*, espécie responsável pelos casos mais grave de malária, vem apresentando resistência aos tratamentos de linha de frente contra a malária, tornando a busca e validação por novos alvos de antimaláricos cada vez mais desafiadora, além disso, o aumento de casos de anofelinos resistentes aos principais inseticidas, tais como os piretróides, ésteres fosfatos (organofosfatos), carbamatos e organoclorados, elevam ainda mais a preocupação e os questionamentos de como tratar a malária e/ou conter a proliferação vetorial (World Health Organization, 2021e).

A Malarone, uma combinação entre a atovaquona e o antifolato proguanil, é um antimalárico de referência atualmente, utilizada desde o início dos anos 2000 (Ke et al., 2019), na qual tem como principal alvo a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria de *P. falciparum* (Uyemura et al., 2004; Ke et al., 2019), além disso, já se sabe que os antibióticos doxiciclina e a clindamicina, atuam inibindo a tradução de proteínas do apicoplasto (Dahl and Rosenthal, 2008; Okada et al., 2022). Talvez, por serem organelas plastidiais a mitocôndria e o apicoplasto de *P. falciparum* possuem uma interrelação física e bioquímica, chegando a compartilhar intermediários da via *de novo* de biossíntese do heme (Ralph et al., 2004).

Diante das evidências de que a mitocôndria e o apicoplasto são potenciais alvos para antimaláricos a caracterização bioquímica por meio da utilização da técnica de biotinilação por proximidade utilizando APEX2, seguida de análise proteômica por espectrometria de massas, possibilitará uma compreensão mais ampla acerca da biologia da mitocôndria de *P. falciparum*. Através desse entendimento refinado, propiciado pelas abordagens utilizadas, será possível ampliar as opções, ou até mesmo, sugerir alvos antimaláricos em breve para maiores estudos.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultura de *P. falciparum* e comitê de ética

A linhagem 3D7 de *P. falciparum* foi cultivada em eritrócitos humanos tipo A+ ou O+ em meio RPMI 1640 (Gibco™) suplementado com 10% de soro humano inativado ou 0,5% de AlbuMAX II Lipid Rich BSA (Thermo Scientific), 4 g/L de glicose, 2 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), 25 mM de HEPES, 25 mg/L de gentamicina e 50 mg/L hipoxantina (Trager and Jensen, 1976). Para a seleção dos mutante foi adicionado 1,25 nM da droga WR99210 (Jacobus Pharmaceuticals Inc.*). As culturas foram condicionadas em estufas a 37°C com saturação de 5% de CO₂.

O uso de eritrócitos e plasma de doadores humanos para a cultura parasitária foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/UnB) Parecer 4.562.740 de 26 de fevereiro de 2021 e pela Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde do Distrito Federal (FEPECS/SES-DF) Parecer 4.659.331 de 19 de abril de 2021. As retiradas das bolsas de concentrado de hemácias e plasma dos doadores humanos são realizadas periodicamente nas instituições parceiras: Fundação Hemocentro de Brasília e Hemoclínica de Brasília.

4.2. Construção dos plasmídeos

Duas construções foram desenhadas e obtidas a fim de obter mutantes expressando APEX2 no citosol do parasita (controle) e endereçando APEX2 para a mitocôndria. A construção contendo HA-APEX2 endereçada à mitocôndria de *P. falciparum* foi baseada nos primeiros 76 resíduos de aminoácidos da tiorredoxina redutase (TrxR), já demonstrado que possui alta capacidade de marcar a mitocôndria do parasita (Kehr et al., 2010). O peptídeo sinal foi fusionado *upstream* à sequência da APEX2, sendo que para cada construção foi adicionado um *tag* de hemaglutinina (HA) na região N-terminal, após a sequência do peptídeo sinal. As sub-clonagens foram realizadas com o uso do vetor pCC1. Para a construção do plasmídeo que expressa a APEX2 citosólica, nenhum peptídeo sinal foi utilizado. Ambos os plasmídeos possuem a marca de seleção hDHFR (do inglês, *human dihydrofolate reductase*), que confere resistência a droga anti-folato WR99210 (Jacobus Pharmaceuticals Inc.*). Os insertos foram sintetizados (GeneArt, Thermo Scientific) e clonados em vetores comerciais pMAT, flanqueados por *XhoI* e *Sall*.

Para o procedimento de subclonagem, as enzimas de restrição *Xho*I (Promega) e *Sal*I (Promega) foram utilizadas, conforme instruções do fabricante. Após a digestão dos vetores, os insertos foram analisados em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8), com a excisão manual dos mesmos. Após a excisão, as bandas do gel contendo os insertos foram extraídas com o uso do kit de purificação PureLink™ PCR Purification (Invitrogen™). Para o procedimento de ligação dos insertos HA(cito)-APEX2 (APEX2 de expressão citosólica) e SP(TrxR)-HA-APEX2 (APEX2 endereçada a mitocôndria), no vetor de expressão pCC1, foi necessário realizar uma digestão prévia do vetor pCC1-*empty* para retirar o gene da citosina deaminase permitindo a linearização do vetor.

A ligação dos insertos ao vetor pCC1 foi realizada com o uso da enzima T4 DNA ligase (Promega), conforme instruções do fabricante. Após a ligação, os vetores contendo os insertos (pCC1-HA(cito)-APEX2 e pCC1-SP(TrxR)-HA-APEX2) foram inseridos em células competentes de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen™) através do método de transformação por choque térmico e plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich). Após a incubação, em estufa bacteriológica, a 37°C, as colônias referentes aos clones positivos da transformação foram cultivadas em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e submetidos ao protocolo de Miniprep (Sambrook et al., 1989) com posterior digestão com as enzimas de restrição *Xho*I e *Sal*I, para averiguar se a ligação foi eficiente.

Após a confirmação da ligação, os clones positivos foram submetidos a um ensaio de digestão com uso da enzima de restrição *Hind*III (Promega) para averiguar se o inserto se ligou ao vetor pCC1 na orientação correta (5' → 3'). Em paralelo, os plasmídeos foram sequenciados e os insertos foram verificados através das plataformas ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) ou Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) a partir do alinhamento das sequências obtidas de todos os plasmídeos. A plataforma ExPASy (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) foi utilizada para obter as sequências reversas-complementares para o alinhamento dos *contigs* obtidos dos oligonucleotídeos anti-sense.

4.3. Ensaio de transfecção em *P. falciparum*

O ensaio de transfecção foi padronizado para ser realizado com o uso de parasitas na fase de esquizonte segmentado (42 - 44 h), denominado por PEMS (do inglês, *parasitophorous-enclosed merozoite structures*) (Fang et al., 2018; Hoeijmakers et al., 2019; Jonscher et al., 2019; Wilde et al., 2019; Birnbaum et al., 2020). Para tal, as culturas foram previamente sincronizadas com 5% (w/v) de sorbitol (Sigma-Aldrich) (Lambros and Vanderberg, 1979). Após atingir uma parasitemia de aproximadamente $\geq 10\%$ de esquizontes, foi realizada a separação dos esquizontes com uso de um gradiente de 63% (v/v) de Percoll® (GE Healthcare) (Kramer et al., 1982).

Os esquizontes recuperados foram transferidos para um frasco T75 contendo 2% (v/v) de hematócrito, para o ensaio de re-invasão em uma janela de 2-3 h. Após este período, as culturas foram novamente sincronizadas com 5% (w/v) de sorbitol (Sigma-Aldrich). Desse modo, as culturas seguiram uma janela síncrona de desenvolvimento, permitindo uma melhor obtenção de PEMS para o ensaio de transfecção. Todos os plasmídeos purificados (pCC1-HA_(cito)-APEX2 e pCC1-SP_(TRXR)-HA-APEX2), foram obtidos em colunas de Maxiprep, conforme as instruções do fabricante (QIAGEN).

Para esterilizar os plasmídeos utilizados para a transfecção, os mesmos foram precipitados com o uso de 3 volumes (v/v) de etanol e 10% do volume correspondente a 100 µg de DNA plasmidial com 3 M de acetato de sódio (C₂H₃NaO₂) pH 5,2 (Green and Sambrook, 2017). Após a precipitação, os sedimentos de DNA foram lavados com etanol 70% gelado. Após a secagem dos sedimentos em fluxo laminar, os mesmos foram ressuspensos com cerca de 15-20 µL de tampão TE (Tris-EDTA) pH 7,5 e estocados a -20°C até o dia do uso.

Após 3-4 ciclos de desenvolvimento dos parasitas previamente sincronizados, e com a obtenção de uma parasitemia de 10-15% de esquizontes, um novo gradiente de 63% (v/v) de Percoll® (GE Healthcare) foi realizado para recuperar estes parasitas dentro da janela de 2-3 h. Os esquizontes recuperados foram submetidos ao tratamento com 10 µM do inibidor de protease E-64 (Sigma-Aldrich) por mais 4-6 h, a fim de obter os PEMS. Uma parasitemia elevada é necessária, pois para este protocolo, utiliza-se cerca de 15-20 µL de GVIs. Este volume deve corresponder a aproximadamente $1 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ de GVIs. A contagem foi realizada com uso da câmara de Malassez e microscópio óptico.

Em paralelo, uma preparação da solução Nucleofector™ Kit 2 (Lonza, catalog number: VMI-1021), contendo 85 µL da solução *basic nucleofector solution 2* e 15 µL

da solução *supplement 3* foi realizada. Foi adicionado esta preparação da solução *Nucleofector*TM para cada DNA previamente preparado em tampão TE, incubando-o por 30 min em temperatura ambiente. Após o período de incubação com E-64, os parasitas PEMS foram recuperados com uma centrifugação a 900 x g, por 5 min (desaceleração de 4), e todo o sobrenadante foi removido. Os sedimentos de PEMS foram gentilmente ressuspendidos com a preparação da solução *Nucleofector*TM. O volume total (PEMS em solução *Nucleofector*TM com o DNA plasmidial) foi imediatamente transferido para uma cubeta de eletroporação.

O uso do programa U-033 do equipamento Amaxa II Nucleofector II AAD-1001N (Lonza) foi utilizado para realizar a eletroporação. Após o choque elétrico, os parasitas foram imediatamente transferidos para tubos de 1,5 mL contendo 500 µL de meio RPMI 1640 (GibcoTM) suplementado com 0,5% de AlbuMAX II (Thermo Scientific) e 300 µL de hemácias frescas previamente aquecidas e homogeneizadas a 37°C, e submetidos a uma agitação de 1100 rpm por 20 min. Este processo facilita a liberação dos merozoítos transfectados, aumentando a taxa de re-invasão (Boyle et al., 2010). Após o período de incubação, transferiu-se imediatamente este volume para um frasco T25 contendo 200 µL de hemácias frescas e 10 mL meio RPMI 1640 (GibcoTM) suplementado com 0,5% de AlbuMAX II (Thermo Scientific) (5% (v/v) de hematócrito final) previamente preparado e acondicionada a 37°C.

As garrafas foram gaseificadas com uma mistura de gases (6% de CO₂, 5% de O₂ e 89% de N₂) e acondicionadas em estufas a 37°C durante todo o período de seleção dos parasitas. Após 24 h, a pressão seletiva com a droga WR99210 (Jacobus Pharmaceuticals Inc.*) foi iniciada. Durante os 10 primeiros dias, os meios de cultura foram trocados diariamente e a cada 7 dias foram adicionadas hemácias frescas. Os esfregaços sanguíneos foram realizados rotineiramente, até que 3-4 semanas pós-transfecção os primeiros parasitas foram observados.

4.4. Ensaio de biotinição

As culturas dos parasitas mutantes foram submetidas ao ensaio de biotinição com o uso de 250 µM de biotina-fenol (Adipogen, CDX-B0270, biotinyl-tyramide), incubado por 30 min a 37°C em uma estufa com saturação de 5% de CO₂, seguido do uso de 10 mM de H₂O₂ (GE Healthcare), incubado por apenas 1 min para realizar a biotinição das proteínas. Para interromper a reação de biotinição, as células foram lavadas 2 vezes, com uma solução *quencher* (10 mM de azida de sódio, 10 mM de

ascorbato de sódio e 5 mM de Trolox) em PBS (Rhee et al., 2013a; Lee et al., 2016; Lobingier et al., 2017b). Diversas condições foram utilizadas para analisar a expressão da HA-APEX2 e a potencial biotinylation dos compartimentos celulares: (i) ausência de biotina-fenol/ausência de H₂O₂ (BP-/H₂O₂-); (ii) ausência de biotina-fenol/presença de H₂O₂ (BP-/H₂O₂+); (iii) presença de biotina-fenol/ausência de H₂O₂ (BP+/H₂O₂-); e, (iv) presença de biotina-fenol/ presença de H₂O₂ (BP+/H₂O₂+).

4.5. Lise eritrocitária seletiva e lise dos parasitas

Após a reação de biotinylation, os parasitas mutantes foram extraídos por lise eritrocitária seletiva utilizando 0,15% (w/v) de saponina (Sigma-Aldrich) em PBS, sendo posteriormente solubilizados em tampão de lise RIPA contendo 50 mM de Tris-HCl pH 7,0 (Invitrogen™), 150 mM de NaCl (Sigma-Aldrich), 0,1% (w/v) de SDS (Invitrogen™), 0,5% (w/v) de deoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), inibidor de protease (cOmplete™, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche), 10 mM de azida de sódio (Sigma-Aldrich), 10 mM de ascorbato de sódio (Sigma-Aldrich) e 5 mM de Trolox (Sigma-Aldrich).

4.6. Imunoprecipitação com uso de *beads* magnéticas anti-HA

O extrato de proteínas foi submetido ao ensaio de imunoprecipitação para enriquecer a HA-APEX2. Para isso, foram utilizados 25 µL de *beads* magnéticas anti-HA (catalog number: 88836, Pierce™, Thermo Scientific) inicialmente lavadas com TBS-T (137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 24,8 mM de Tris e 0,05% (v/v) de Tween-20). As *beads* foram separadas do sobrenadante, com o uso de uma *rack* magnética *MagJET separation rack* (Thermo Scientific). Em seguida, a amostra foi adicionada às *beads* e incubada por 30 minutos sob leve agitação. Após o período de incubação, o *flowthrough* foi separado com o uso da *rack* magnética *MagJET separation rack*. As *beads* foram lavadas novamente com TBS-T seguida de água ultrapura. Para a eluição das amostras, foram utilizadas 30 µL de 0,1 M de glicina pH 2,0 com uma incubação de 5-10 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionado 15 µL de 1 M Tris-HCl pH 8,5 para neutralização das amostras.

4.7. SDS-PAGE, *Western Blot* e estreptavidina-*blot*

Os extratos proteicos, obtidos após a lise com RIPA, foram analisados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose (Amersham™) e corados com 0,1%

(w/v) Ponceau S (Sigma-Aldrich) em 5% (v/v) de ácido acético (Sigma-Aldrich). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 3 vezes com tampão TBS-T (137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 24,8 mM de Tris e 0,1% (v/v) de Tween-20) e então bloqueadas utilizando 5% (w/v) de leite desnatado durante 1h30min. A validação dos mutantes foi realizada utilizando os anticorpos primários de camundongo anti-HA (Sigma-Aldrich, diluição 1:5.000) e soro anti-APEX2 (diluição 1:100) e após a incubação por 16 h, foi adicionado o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo IgG conjugado com a HRP (*horseradish peroxidase*) (Invitrogen™, diluição 1:10.000) para ambas as membranas. Para as proteínas biotinizadas foi utilizado a estreptavidina-HRP (Invitrogen™, diluição 1:10.000). Os anticorpo primários específicos de *P. falciparum*: (i) anti-PDI8 (uma proteína do retículo endoplasmático) em coelho, e anti-EXP2 (uma proteína do vacúolo parasitóforo) em camundongo foram utilizados para o *loading control*, e após a incubação, foi utilizado os anticorpos secundários de asno anti-coelho IgG-HRP (*horseradish peroxidase*) (Invitrogen™, diluição 1:10.000) e cabra anti-camundongo IgG-HRP (*horseradish peroxidase*) (Invitrogen™, diluição 1:10.000). Após as devidas incubações, todas as membranas de nitrocelulose foram expostas no filtro de quimioluminescência do fotodocumentador Fusion Solo 6X Basic (Vilber), para a obtenção das imagens.

4.8. Ensaio de imunofluorescência (IFA)

Após a validação dos parasitas mutantes quanto a expressão da HA-APEX2 e biotinição das proteínas potencialmente mitocondriais observado por *Western Blot* e estreptavidina-*blot*, os parasitas foram submetidos a uma análise por microscopia confocal à laser. Alíquotas de 1mL de GVIs foram centrifugadas por *spin down*, e, incubada com 200 nM MitoTracker™ Deep Red FM (Invitrogen™), e com as seguintes concentrações do MitoTracker Orange CMTMRos (Invitrogen™): 25 nM, 50 nM, 100 nM e 400 nM, diluídos em meio RPMI incompleto pré-aquecido por 30min a 37°C. Após o período de incubação, foi realizado um *spin down* das GVIs tratadas com MitoTracker™, seguida da lavagem com meio RPMI incompleto. Após um novo *spin down*, os esfregaços foram realizados das células preparadas na presença e/ou ausência de BP ou H₂O₂.

Para a fixação das células, foi utilizado cerca de 100-200uL da solução 3,7% (v/v) de formaldeído (Sigma-Aldrich, catalog number 252549) em PBS e incubado por 15 min. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS. Para a permeabilização das

células, foi adicionado 100-200uL de uma solução 0,1% (v/v) de Triton X-100 em PBS e incubado por 15 minutos. Em seguida foi realizado o bloqueio das células utilizando 5% (w/v) de leite desnatado em PBS e incubado overnight a 4°C em uma câmara úmida (Charneau et al., 2007).

Para averiguar a expressão da HA-APEX2 foi utilizado o anticorpo anti-HA de camundongo (Sigma Aldrich, titulação: 1:5,000) O anticorpo primário anti-*Pf*PDI8 (titulação 1:250) de coelho foi usado para marcar uma proteína do retículo endoplasmático de *P. falciparum* (Mouray et al., 2007). Os seguintes anticorpos secundários acoplados ao AlexaFluor foram usados: cabra anti-camundongo AlexaFluor 555 (Invitrogen™, A21424, titulação 1:800), cabra anti-coelho AlexaFluor 488 (Invitrogen™, A11034, titulação 1:800) e asno anti-coelho AlexaFluor 546 (Invitrogen™, A10040, titulação 1:800). O uso dos anticorpos secundários se deu de acordo com as preparações dos anticorpos primários. O uso do estreptavidina-AlexaFluor488 (Invitrogen™, S11223, titulação 1:800) se deu, respeitando a regra do comprimento de onda dos demais anticorpos usados. Todos os anticorpos foram preparados em 1% (w/v) de leite desnatado em PBS. No escuro, foi adicionado uma gota do *ProLong Gold Antifade reagent with DAPI* (Invitrogen™, P36941). Para cada poço uma lamínula 20x20mm foi usada para cobrir o poço e selada com esmalte (Charneau et al., 2007). As amostras foram analisadas utilizando TCS SP5 *Scanning Confocal Laser Microscope* (Leica Microsystems, Germany).

4.9. Predições *in silico* e mineração de dados dos subproteomas preditos de mitocôndria e apicoplasto

Foram realizadas análises *in silico* para predizer os subproteomas da mitocôndria e apicoplasto de *P. falciparum*. O levantamento das proteínas de mitocôndria foi realizado utilizando as plataformas: (i) MitoFates (<https://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>), uma plataforma que possui um algoritmo que realiza a predição de proteínas mitocondriais utilizando um método de predição para o peptídeo sinal (ou pré-sequências) N-terminais e seus sítios de clivagem (Fukasawa et al., 2015). O algoritmo ainda utiliza a combinação das características bioquímicas das proteínas (composição de aminoácidos e propriedades físico-químicas) para auxiliar nesse processo de predição. A ferramenta disponibiliza uma busca para plantas, fungos e metazoa e; (ii) TargetP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>), que é um algoritmo que busca proteínas em plastídios (Armenteros et al., 2019). Esta plataforma aponta para

peptídeos de trânsito pelo padrão da sequência dos resíduos de aminoácidos, baseando-se, sobretudo, na alanina na posição 2. Para ambas as plataformas foi utilizada como referência o bando de dados do proteoma de *P. falciparum* cepa 3D7 obtido pelo UniProt (<https://www.uniprot.org/>) em sequência FASTA. Além disso, foram utilizadas as informações relacionadas a “GO terms” associados a mitocôndria disponibilizadas no PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/app/>) e o UniProt (<https://www.uniprot.org/>), como estratégia de *data mining*.

Para o levantamento de proteínas do apicoplasto, foram utilizadas as plataformas do UniProt (<https://www.uniprot.org/>) para a mineração das proteínas com “GO terms” associados ao apicoplasto. A ferramenta de predição PlasmoAP disponibilizada pelo PlasmoDB (<https://plasmodb.org/plasmo/app/plasmoap>) foi adicionalmente incorporada à análise para realizar a mineração das proteínas já anotadas como pertencentes do apicoplasto de *P. falciparum*. Além disso, dois artigos de referência tratando-se de uma meticulosa predição *in silico* (Ralph et al 2004) e mapeamento proteômico do apicoplasto utilizando BioID (Boucher et al 2018), foram utilizados na comparação do proteoma total predito de apicoplasto. As comparações entre os bancos de dados foram realizadas na plataforma “*Bionformatics & Evolutionary Genomics*” (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) oriundo a partir de cada fonte, resultando em diversos diagramas de Venn.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Construção do plasmídeo

Para a expressão episomal da APEX2 na mitocôndria foi elaborada uma construção, utilizando o vetor pCC1, contendo o gene de resistência ao antifolato WR99210, diidrofolato redutase humana (do inglês, *human dihydrofolate reductase* – hDHFR), regulado pelo promotor 5' CAM e terminador 3'UTR hrp2. Um peptídeo de trânsito não-consenso, designado como peptídeo sinal (ou do inglês, *signal peptide* ou SP) para a enzima tiorredoxina redutase (TrxR), foi escolhido para endereçar HA-APEX2 para a mitocôndria de *P. falciparum*, conforme descrito anteriormente (Kehr et al., 2010) (**Figura 10**). Além disso, uma construção sem o SP foi obtida para a expressão da APEX2 de forma citosólica, como controle da localização da expressão da APEX2.



Figura 10. Esquema representativo do vetor pCC1. O inserto da HA-APEX2 com o peptídeo sinal localizado no sentido 5' – 3', assim como o gene de resistência à droga WR99210, diidrofolato redutase humana.

As construções SP(TrxR)-HA-APEX2 (endereçando HA-APEX2 para a mitocôndria) e HA-APEX2 (expressão citosólica) foram obtidas e purificadas a partir de bactérias competentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen™). No intuito de validar os plasmídeos, eles foram digeridos utilizando as enzimas de restrição *XhoI* e *SalI*, que flanqueiam os insertos contendo HA-APEX2. Observou-se que, para ambas as construções HA-APEX2 (coluna 4) e SP(TrxR)-HA-APEX2 (conlunas 7 e 9), houve clones que apresentaram uma ligação eficiente do inserto ao vetor pCC1, respectivamente (**Figura 11A**).

Para identificar se a ligação desses insertos se encontra na orientação correta (5' → 3') foi realizada uma análise a partir do uso da enzima de restrição *HindIII*. Essa análise foi realizada observando o tamanho dos fragmentos, após a digestão, utilizando gel de agarose 1%. Para estimar o tamanho dos fragmentos em ambas as orientações, foi realizado simulações utilizando a plataforma online WebCutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). Os tamanhos dos fragmentos esperados, caso a orientação das ligações estivesse errada (3' → 5'), seriam de 4,7 kb e 2,5 kb, enquanto, caso estivessem na orientação correta (5' → 3'), seriam de 3,9 kb e 3,4 kb.

Percebeu-se que os fragmentos, para ambas as construções SP(TrxR)-HA-APEX2 e HA-APEX2, apresentaram tamanhos próximos a 3,9 kb e 3,4 kb, indicando que a orientação da ligação dos insertos estava correta (**Figura 11B**). Os plasmídeos também foram sequenciados pelo método de Sanger, utilizando *primers sense* e *anti-sense*, dentro da sequência da própria APEX2. Após a análise e alinhamento das sequências, constatou-se que a sequência estava correta.

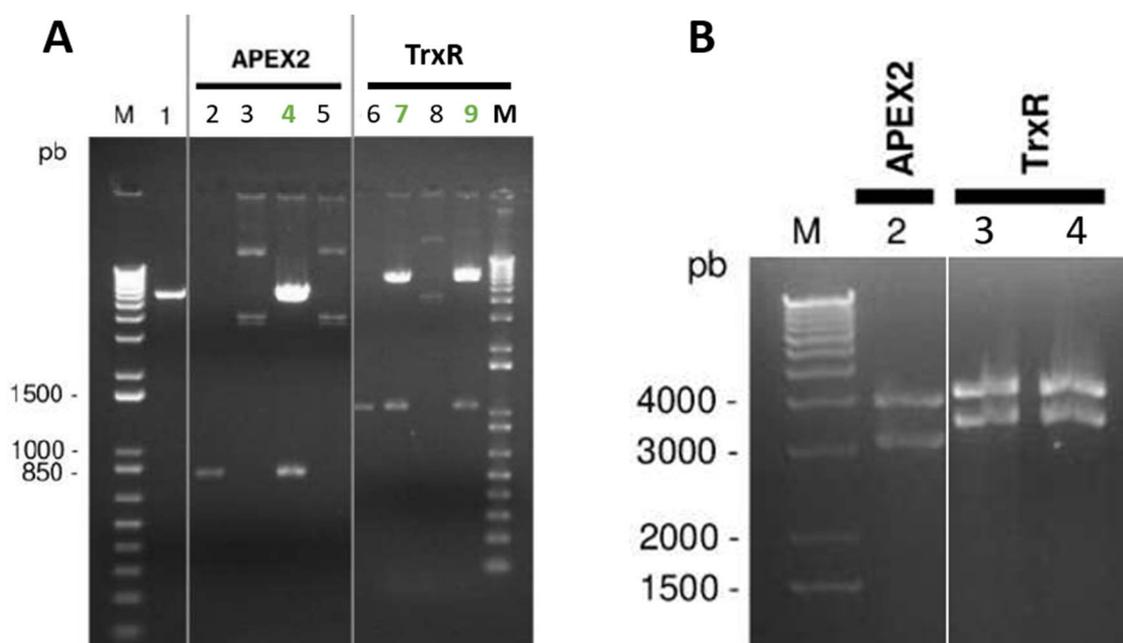


Figura 11. Validação da orientação dos plasmídeos SP(TrxR)-HA-APEX2 e HA-APEX2. (A) Digestão usando *XhoI* e *SalI*, após as sub-clonagens em pCC1. **M:** marcador 1kb Plus (Thermo Scientific); (1) corresponde ao vetor pCC1 vaziao linearizado por *XhoI* e *SalI*; (2) inserto, correspondendo ao tamanho aproximado esperado da sequências HA-APEX2. Observa-se que o clone do poço 4 (HA-APEX2), apresentou ligação eficiente. (6) Inserto correspondendo ao tamanho aproximado esperado da sequência TrxR-HA-APEX, demonstrando que os clones 7 e 9 (SP_(TrxR)-HA-APEX2) apresentaram a ligação. (B) Digestão com *HindIII* para identificação dos tamanhos dos fragmentos. Todas as construções apresentaram a liberação dos fragmentos com tamanhos aproximados de 3,2 kb e 3,9 kb.

5.2. Validação da expressão da HA-APEX2 e do ensaio de biotinição

Após a obtenção dos mutantes, por meio da transfecção do plasmídeo SP(TrxR)-HA-APEX2 utilizando a linhagem selvagem 3D7 de *Plasmodium falciparum*, foi realizado o ensaio de biotinição para a marcação das proteínas mitocondriais. Após a reação de biotinição, foi realizado o ensaio de imunoprecipitação, utilizando *beads* magnéticas conjugadas com anti-HA (Pierce™), com a finalidade de enriquecer a HA-

APEX2 e verificar através de *Western Blot* sua expressão na linhagem mutante. Paralelamente, um estreptavidina-*blot* também foi realizado, para verificar se a metodologia de biotinição ocorreu corretamente, marcando as proteínas da mitocôndria de *P. falciparum*, com o uso de estreptavidina-HRP (Invitrogen™).

Observa-se que as marcações do anticorpo anti-HA ocorreram apenas nos poços referentes às amostras eluídas. A HA-APEX tem, aproximadamente, 29 kDa e a marcação ocorrida, se encontra acima do marcador referente à 25 kDa, corroborando o esperado (**Figura 12A, seta azul**). Observa-se uma marcação logo abaixo, quase alinhado com o marcador, que possivelmente trata-se da degradação da proteína ou até mesmo uma marcação inespecífica do anticorpo utilizado (**Figura 12, asterisco vermelho**).

Além disso, foi realizado um *Western Blot* utilizando o soro policlonal anti-APEX2 (Oliveira, 2021). Observa-se, na **Figura 12B**, que a amostra referente à APEX2 purificada se encontra mais acima, já que é a proteína recombinante purificada com uma cauda de 6 histidinas (6xHIS), de tamanho 30 kDa (Carneiro, 2019).

Após a validação da expressão da HA-APEX2, foram realizados *Western Blot* para os *loading controls* utilizando anticorpos policlonais de compartimentos específicos de *P. falciparum*, como a *PfPDI8*, presente no retículo endoplasmático (Mahajan et al., 2006) (**Figura 12C**) e *PfEXP2*, presente no vacúolo parasitóforo (Jonsdottir et al., 2021) (**Figura 12D**). O resultado do *Western Blot* foi conforme o esperado, tendo em vista que o tamanho da proteína *PfPDI8* é de 58kDa e da *PfEXP2* é de 33,4kDa, as marcações aparentam estar nas alturas correspondentes.

A **Figura 12E** mostra o estreptavidina-*blot* realizado utilizando estreptavidina-HRP (Invitrogen™) para a validação da biotinição. Observa-se que o poço da direita, referente à condição positiva (presença de biotina-fenol e H₂O₂), em ambas as imagens, apresenta uma marcação significativamente mais intensa, em comparação ao poço da esquerda, que representa a condição negativa (ausência de biotina-fenol/presença de H₂O₂). Dessa forma, pode-se concluir que a metodologia de marcação através da APEX2, realiza a biotinição nas condições ideais de tratamento.

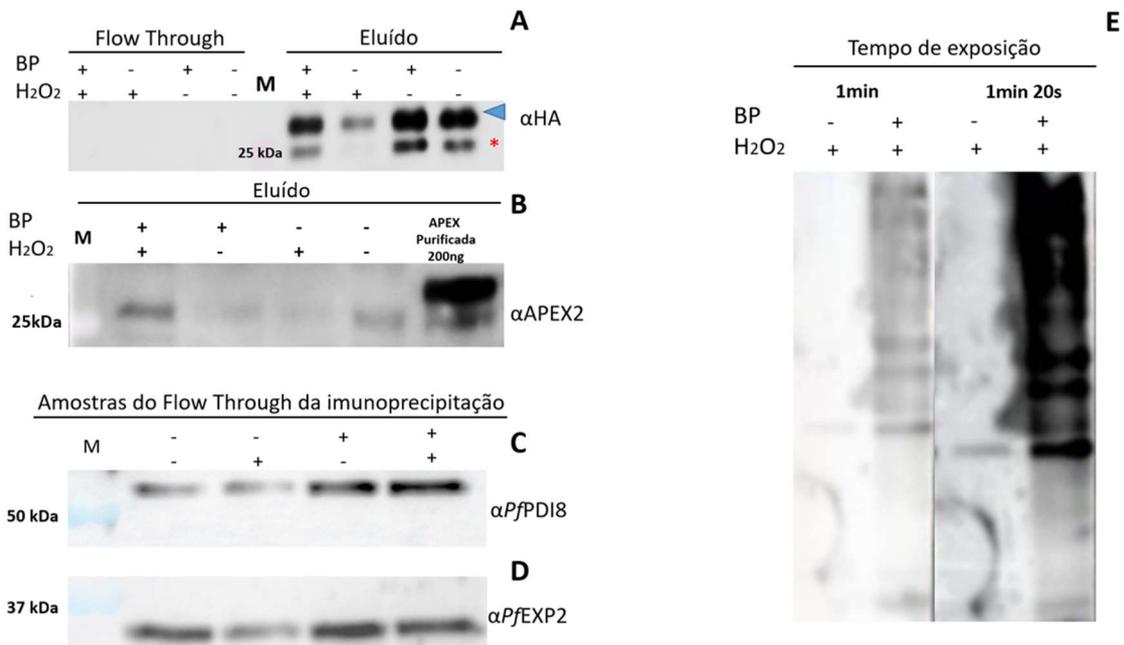


Figura 12. Western Blot e estreptavidina-blot confirmatórios da metodologia de marcação através da biotinylation mediada por APEX2 em *P. falciparum*. (A) Western Blot utilizando a amostra eluída da imunoprecipitação usando *beads* magnéticas conjugadas com anti-HA realizado utilizando anticorpo anti-HA. (B) Western Blot da amostra eluída da imunoprecipitação, realizado utilizando soro policlonal anti-APEX2. (C e D) Western Blot do *loading control*, utilizando anticorpo policlonal anti-*PfPDI8* e anti-*PfEXP2*, respectivamente. (E) Estreptavidina-HRP blot, demonstrando que ocorreu a biotinylation das proteínas, demonstradas no poço referente à condição positiva (presença de H₂O₂ e BP). **Legenda:** M: marcador, BP: Biotina-Fenol, (+): Presença, (-): Ausência.

5.3. Ensaio de imunofluorescência para validação da expressão da HA-APEX2 na mitocôndria de *P. falciparum* e da biotinylation das proteínas

Paralelamente ao ensaio de biotinylation, foram preparadas lâminas para as análises em microscopia confocal a laser. No total, foram utilizadas 4 (quatro) marcações na preparação das células: DAPI (marcação nuclear), estreptavidina-AF488 (marcação das proteínas biotinylation presentes na mitocôndria), asno anti-coelho AF546 (acoplado ao anticorpo primário anti-PDI8, que marca uma proteína no retículo endoplasmático de *P. falciparum*) e MitoTracker Deep Red (marcação da mitocôndria).

Observa-se na **Figura 13** que, a marcação do DAPI ocorreu conforme o esperado, para ambas as condições apresentadas, onde é possível observar que se trata de parasitas na fase assexuada de trofozoíto/esquizonte, devido a característica de múltiplos núcleos marcados para cada hemácia infectada (**Figuras 13**). Apesar do uso do anticorpo anti-*PfPDI8*, utilizado como *loading control* na **Figura 12C**, não é possível observar com

clareza se houve uma marcação no retículo endoplasmático (RE) de *P. falciparum*. Esperava-se uma marcação periférica ao núcleo, que poderia indicar uma marcação do RE. Apesar que, na **Figura 13B**, é possível notar uma leve marcação periférica na região onde seria o núcleo, possivelmente sugerindo que há a necessidade de padronizar a titulação do anticorpo usado para o ensaio.

Além disso, houve um padrão inesperado na marcação da mitocôndria de *P. falciparum* pelo uso do MitoTracker™ Deep Red. A marcação ocorre dentro do vacúolo digestivo (**Figura 13A, setas vermelhas**), o que não condiz com a localização da mitocôndria, sendo ela posicionada lateralmente ao núcleo (Van Dooren et al., 2006; Korkor et al., 2020; Lamb et al., 2022).

Quanto ao ensaio de biotinição, é possível observar que na **Figura 13A**, a condição negativa (ausência de biotina fenol e presença de H₂O₂), não demonstra nenhuma marcação da estreptavidina-AF488, diferentemente do apresentado na **Figura 13B**, a qual representa a condição positiva (presença de biotina fenol e H₂O₂), demonstrando que a biotinição das proteínas ocorreu. Apesar da marcação da estreptavidina-AF488 ter ocorrido conforme o esperado, houve uma inconsistência no padrão da marcação, tendo em vista que aparenta ter sido uma marcação citosólica e não mitocondrial, como esperado.

Ao reanalisar a sequência do plasmídeo utilizado, notou-se um erro na sequência do peptídeo de trânsito (TrxR) que inviabilizou a localização correta da HA-APEX2. A sequência sintetizada não possuía os 76 resíduos de aminoácidos na qual realizaria o endereçamento HA-APEX. Entretanto, um novo plasmídeo contendo o peptídeo de trânsito baseado no gene da tiorredoxina redutase (TrxR) (Kehr et al., 2010), já foi obtido e os experimentos de sub-clonagem já estão em andamento.

Devido às inconsistências da marcação do MitoTracker, foram realizados testes utilizando o MitoTracker Orange CMTMRos, na qual possui um comprimento de onda diferente do testado anteriormente, com as concentrações 25 nM, 50 nM, 100 nM e 400 nM. Os testes foram realizados apenas na linhagem selvagem 3D7 de *P. falciparum*. Apesar de ter sido realizado o teste nas concentrações acima de MitoTracker Orange CMTMRos, foi possível notar um padrão de marcação lateral ao núcleo, indicando a marcação mitocondrial (Van Dooren et al., 2006; Korkor et al., 2020; Lamb et al., 2022), apenas com o uso de 400 nM de MitoTracker Orange CMTMRos (**Figura 14**). Em contraste, este padrão não é observado na **Figura 13** reforçando a suposição de que uma marcação inespecífica ocorreu com o uso do MitoTracker™ Deep Red.

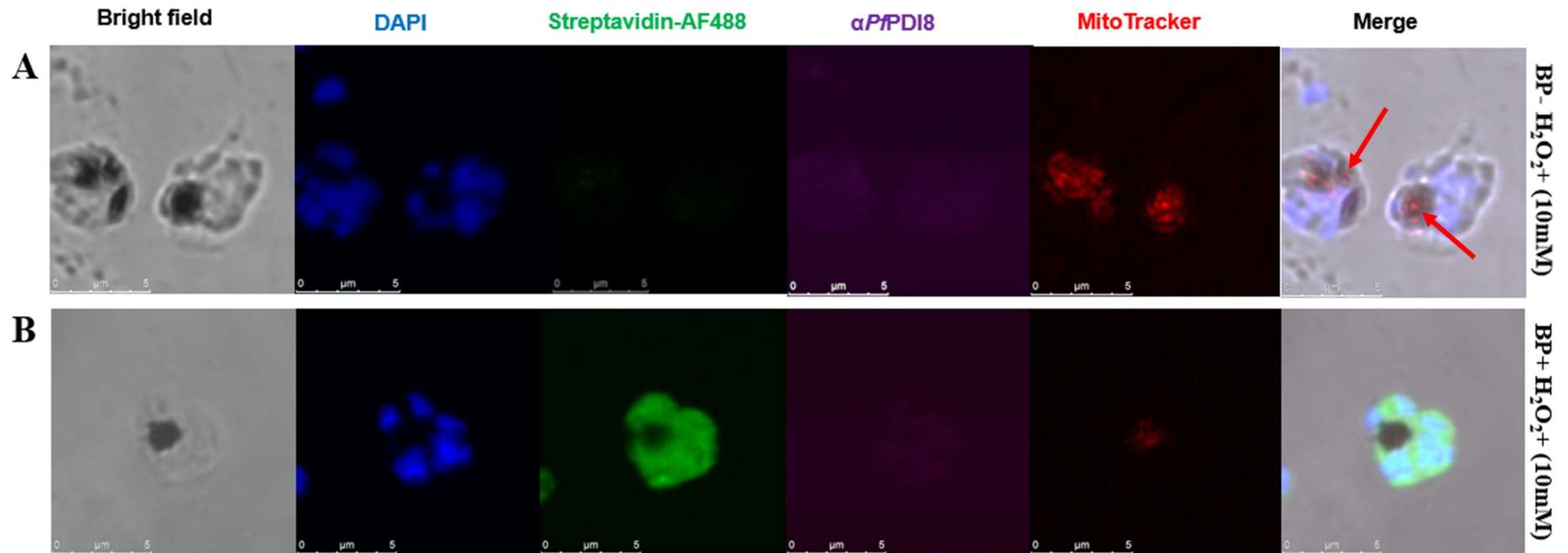


Figura 13. Imunofluorescência de trofozoíto/esquizonte de *P. falciparum* mutantes expressando HA-APEX2 endereçados à mitocôndria. (A) Esquizonte da linhagem mutante expressando a HA-APEX2 endereçada à mitocôndria do parasita, tratado com H₂O₂, porém com a ausência de BP. (B) Trofozoíto da linha de mutantes expressando a HA-APEX2 endereçada à mitocôndria, tratados com BP e H₂O₂. Conforme o esperado, apenas a condição mostrada no painel B apresenta marcação da estreptavidina-AF488, demonstrando assim que a biotinylação ocorreu na condição em que há presença de ambos substrato (BP) e agente oxidante (H₂O₂).

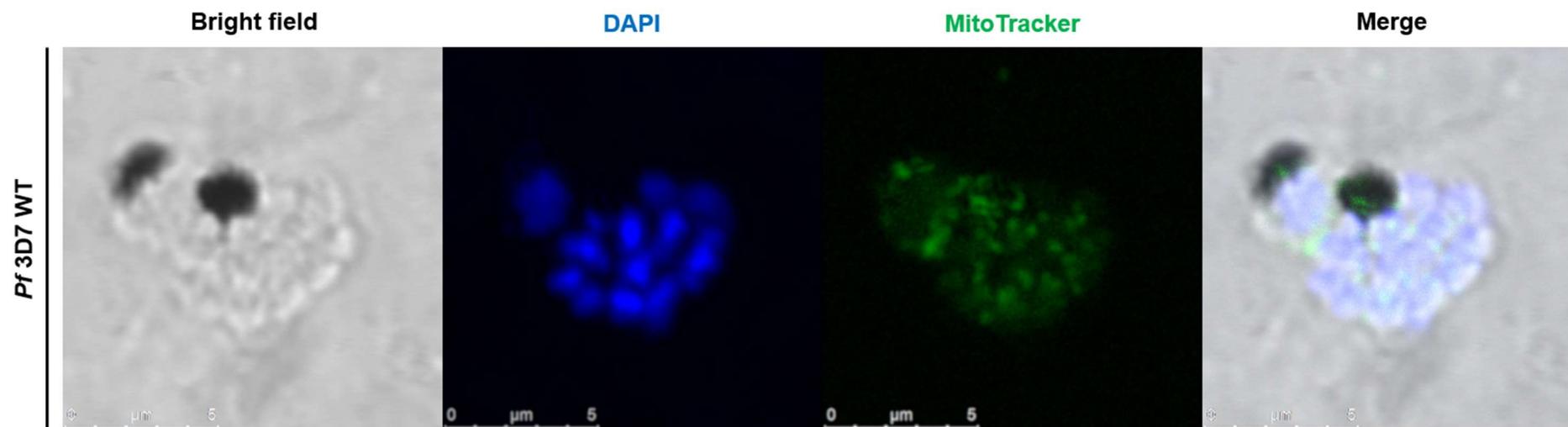


Figura 14. Imunofluorescência utilizando o MitoTracker Orange CMTMRos na linhagem selvagem de *P. falciparum* 3D7. Esquizonte da linhagem selvagem 3D7 de *P. falciparum* condicionada à 400 nM do MitoTracker. Observa-se que a marcação ocorreu nas proximidades do núcleo, indicando a marcação da mitocôndria.

5.4. Predições *in silico* e *data mining* do subproteoma da mitocôndria e apicoplasto de *P. falciparum*: em busca do elo perdido

Estudos anteriores sugerem uma relação física e bioquímica entre a mitocôndria e o apicoplasto, de forma em que ambas as organelas compartilhem intermediários da via *de novo* de biossíntese do heme (McFadden et al., 1996; Ralph et al., 2004; Van Dooren et al., 2006; Lim and McFadden, 2010). O heme, possui uma estrutura conhecida como anel porfirínico, na qual é utilizado como grupo prostético para proteínas, como os citocromos, que fazem parte da cadeia transportadora de elétrons, sendo essencial para o parasita (Chinnery and Schon, 2003; Ralph et al., 2004; Van Dooren et al., 2006; Lim and McFadden, 2010).

A via de biossíntese do heme, em *Plasmodium* spp., se inicia na mitocôndria com a conversão da Succinil -CoA e da glicina em δ -aminolevulanato (ALA), pela enzima δ -aminolevulanato sintase (ALAS). Em seguida, a ALA é convertida em porfobilinogênio pela enzima δ -aminolevulanato desidratase (ALAD ou HemB), porém, esta etapa já ocorre no citoplasma. O porfobilinogênio então, é convertido em hidroximetilbilano pela enzima porfobilinogênio desaminase (HemC), dentro do apicoplasto. Por fim, é necessário que a hidroximetilbilano seja ciclizado, já que sua forma linear é extremamente instável. Em animais e plantas, essa ciclização é realizada pela enzima uroporfirinogênio III sintase (HemD), porém, o parasita não aparenta ter o homólogo desta enzima. Apesar disso, o parasita possui homólogos das 4 enzimas que sucedem esta etapa, a uroporfirinogênio descarboxilase (HemE), coproporfirinogênio oxidase (HemF), protoporfirinogênio oxidase (HemG) e a ferroquelatase (HemH) e mesmo que a localização dessas enzimas não seja bem definida, sugere-se que elas estejam no citosol ou na mitocôndria (Ralph et al., 2004).

Devido à essa inter-relação entre ambas as organelas, foram realizadas predições *in silico* e uma mineração de dados que resultou em uma listagem de proteínas, proposta como um subproteoma predito da mitocôndria e apicoplasto de *P. falciparum*. Para as proteínas mitocondriais, as predições foram realizadas a partir das plataformas PlasmDB e UniProt; e, pelos algoritmos de predição MitoFates, na qual utiliza um método de predição para o peptídeo sinal (ou pré-sequências) N-terminais e seus sítios de clivagem, além de utilizar, também, as características bioquímicas das proteínas (composição de aminoácidos e propriedades físico-químicas) (Fukasawa et al., 2015); e, o TargetP, que

busca por proteínas em plastídios, apontando para peptídeos de trânsito pelo padrão da sequência dos resíduos de aminoácidos, baseando-se na posição da alanina, na posição 2 (Armenteros et al., 2019). Um total de 608 e 63 proteínas foram obtidas através do PlasmoDB e UniProt, respectivamente, e; 226 e 76 proteínas pelo MitoFates e TargetP, respectivamente (**Figura 15A**).

A mineração das proteínas de apicoplasto foi realizada utilizando as plataformas PlasmoAP (ferramenta de predição do PlasmoDB) e UniProt; e, pelos artigos de Boucher et al. (2018) e Ralph et al. (2004). Um total de 513 e 18 proteínas foram obtidas através do PlasmoAP e Uniprot, respectivamente e 346 e 539 proteínas dos estudos de Boucher et al. (2018) e Ralph et al. (2004), respectivamente. É válido ressaltar que, ambas as referências utilizadas nessa mineração de dados, estão relacionadas a uma análise *in silico* altamente criteriosa e refinada de uma predição do proteoma do apicoplasto de *P. falciparum* (Ralph et al., 2004), e de uma análise proteômica utilizando uma abordagem similar a APEX2, a BioID, seguida de uma análise de bioinformática refinada para determinar o proteoma do apicoplasto de *P. falciparum* (Boucher et al., 2018).

Após a compilação dos dados, o diagrama de Venn ilustrado na **Figura 15**, demonstra os números preditos obtidos de cada fonte de pesquisa, e suas respectivas intersecções entre elas a partir das predições e buscas realizadas. Com a retirada das redundâncias entre as intersecções das predições, obtivemos um total de 708 proteínas mitocondriais de *P. falciparum*. Paralelamente, a partir da mesma estratégia empregada, foi possível determinar uma predição de 781 proteínas do apicoplasto de *P. falciparum*.

Após a predição de ambos os proteomas organelares, observou-se uma sobreposição de 108 proteínas da mitocôndria e apicoplasto de *P. falciparum* (**Figura 15**). Este resultado, sugere que ambas as organelas, podem de fato, compartilhar intermediários e/ou vias bioquímicas essenciais ao parasita. Para compreender melhor os resultados obtidos, foram realizadas análises para contextualização das proteínas categorizadas como “exclusivas” de cada organela, e, em seguida, as 108 proteínas categorizadas como sendo “em comum”. Para as proteínas “exclusivas”, foram realizadas buscas de GO *terms*, para classificar as proteínas mineradas em relação às suas funções e localização. Além disso, ambos os bancos de dados foram submetidos à plataforma KEGG para determinar e ilustrar as vias metabólicas, que elas podem integrar.

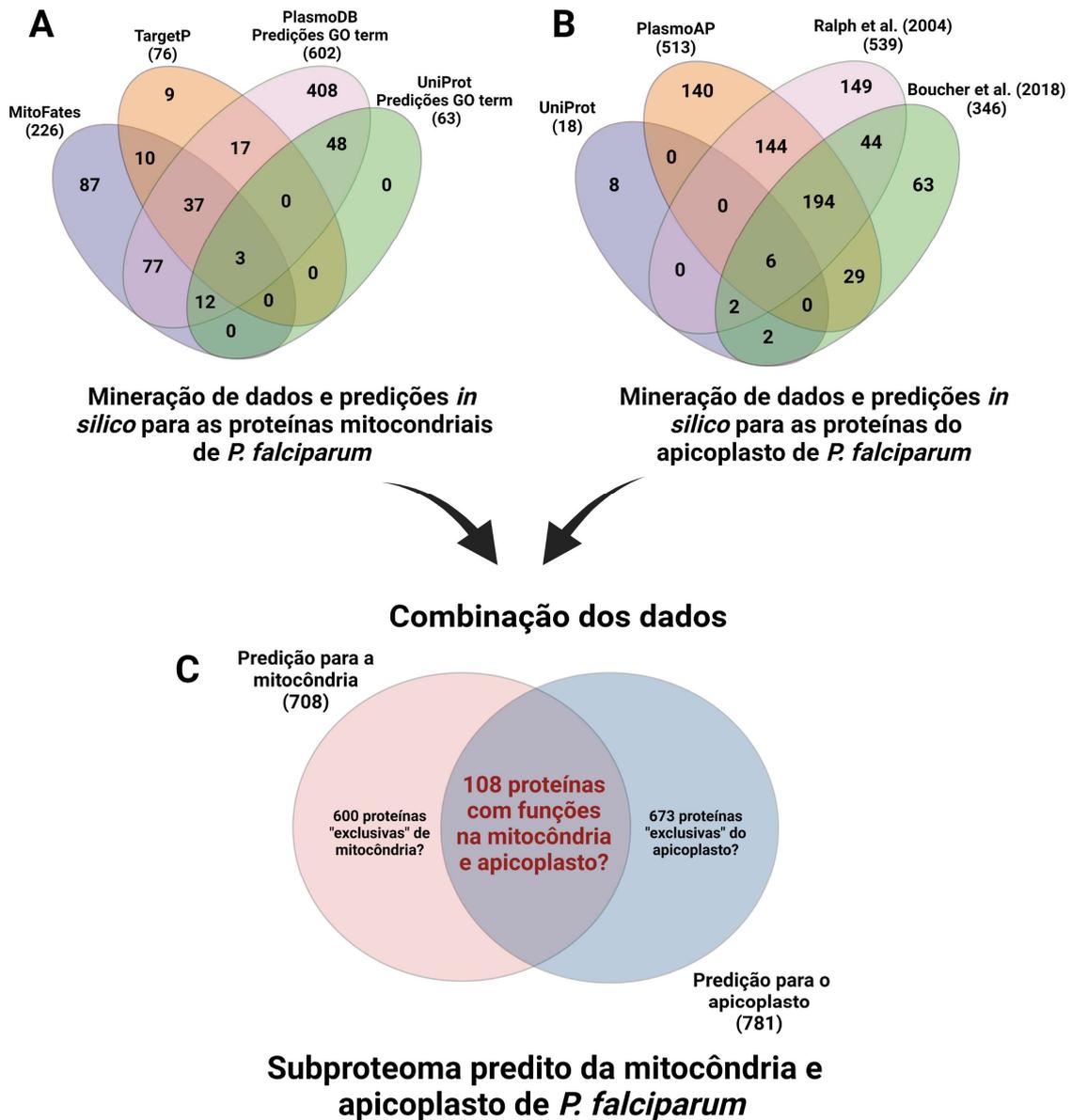


Figura 15. Data mining e predições *in silico* das proteínas de mitocôndria e apicoplasto. (A) Proteínas preditas e categorizadas, relacionadas à mitocôndria, utilizando os algoritmos MitoFates (<https://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>) e TargetP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>), e as plataformas UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e PlasmODB (<https://plasmodb.org/plasmo/app/plasmoap>) para listagem de proteínas mitocondriais. (B) Proteínas preditas e categorizadas, relacionadas ao apicoplasto, utilizando as plataformas UniProt e o PlasmAP (<https://plasmodb.org/plasmo/app/plasmoap>), uma plataforma disponibilizada pelo PlasmODB, que possui uma anotação do subproteoma das proteínas de apicoplasto de *P. falciparum*; e, as referências Ralph et al. (2004) e Boucher et al. (2018). (C) Após a comparação de ambos os datasets, foram observadas 108 proteínas, nas quais, possivelmente, são compartilhadas por ambas as organelas.

5.4.1. A cadeia transportadora de elétrons e a sua relevância biológica com a mitocôndria de *P. falciparum*

Durante as análises das proteínas mitocondriais, foram preditas e listadas proteínas pertencentes à cadeia transportadora de elétrons (**Tabela 1**). As proteínas mitocondriais foram enriquecidas através do KEGG (**Tabela S2**) e aquelas relacionadas à cadeia transportadora de elétrons foram analisadas, identificando, assim, que algumas delas já foram estudadas por serem potenciais alvos antimaláricos.

Tabela 1. Proteínas da mitocôndria de *P. falciparum* relacionadas à cadeia transportadora de elétrons/fosforilação oxidativa, enriquecidas e anotadas pela plataforma KEGG. As enzimas destacadas em cinza são àquelas que aparecem, também, em destaque na **Figura 16**, referente ao *PathView*.

Fosforilação Oxidativa			
Código uniprot	Código PlasmDB	Nomenclatura	Enzyme Code
Q8IJ66	PF3D7_1034400	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	EC 1.3.5.1
Q8I5S5	PF3D7_1212800	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondria	EC 1.3.5.1
Q8IL75	PF3D7_1439400	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, putative	EC 7.1.1.8
A0A076N9X1	cytb	Cytochrome b	
Q8I6U9	PF3D7_1462700	Cytochrome c1, putative	
Q8ILJ5	PF3D7_1426900	Cytochrome b-c1 complex subunit 6	
Q8IJS2	PF3D7_1012300	Cytochrome b-c1 complex subunit 7, putative	EC 7.1.1.8
C0H4L0	PF3D7_0705900	ATP synthase subunit C, putative	EC 3.6.3.14
O96252	PF3D7_0217100	ATP synthase subunit alpha	
Q8I0V2	PF3D7_1235700	ATP synthase subunit beta	EC 7.1.2.2
Q8IHP4	PF3D7_1147700	ATP synthase subunit delta, mitochondrial, putative	EC 3.6.3.14
Q8IBU5	PF3D7_0715500	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial, putative	EC 3.6.3.14
Q8I6T7	PF3D7_1311300	ATP synthase subunit gamma	
Q8IEL5	PF3D7_1310000	ATP synthase subunit O, mitochondrial, putative	EC 3.6.3.14
Q8I280	PF3D7_0106100	V-type proton ATPase subunit C	
Q8IHW4	PF3D7_1140100	V-type proton ATPase subunit F	
Q8I0W6	PF3D7_0519300	Protoheme IX farnesyltransferase, mitochondrial (Heme O synthase)	
Q8IK85	PF3D7_1475300	Cytochrome c oxidase assembly protein COX11, putative	EC 1.9.3.1
Q8ILB4	PF3D7_1435000	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15, putative	
Q8IJE6	PF3D7_1025600	Cytochrome c oxidase copper chaperone, putative	
Q8I6V2	PF3D7_1430900	Cytochrome c oxidase subunit 2, putative	EC 1.9.3.1
A0A076N5U0	coxIII	Cytochrome c oxidase subunit 3	
Q8I2N1	PF3D7_0927800	Cytochrome c oxidase subunit 5B, putative	EC 1.9.3.1
Q8I2M9	PF3D7_0928000.1	Cytochrome c oxidase subunit 6B, putative	EC 1.9.3.1
Q8I302	PF3D7_0915000	Type II NADH:ubiquinone oxidoreductase	EC 7.1.1.2
Q8I6T6	PF3D7_1311700	Cytochrome c, putative	

Este mecanismo celular, que faz parte da cadeia transportadora de elétrons (CTE), é responsável pelo gradiente eletroquímico da membrana interna da mitocôndria; isso se dá pela reoxidação contínua do ubiquinol, na qual resulta na atividade contínua da enzima diidroorotato desidrogenase (DHOD), essencial para a via *de novo* de biossíntese de pirimidinas do parasita, e, conseqüentemente, crucial para a sobrevivência do mesmo (Ke et al., 2019). A CTE do parasita, diferentemente de outros eucariotos, não tem como função principal gerar ATP, já que no estágio assexuado eritrocitário do parasita, ele adquire energia de forma anaeróbica pela glicólise (Uyemura et al., 2004; Mather and Vaidya, 2008). Sua principal função é manter um fluxo de elétrons para as desidrogenases dependentes de ubiquinona nas quais são essenciais para vias metabólicas do parasita, tais como a DHOD. Além disso, a CTE também mantém o gradiente eletroquímico transmembranar, para que seja possível o transporte de metabólitos e proteínas através da membrana mitocondrial (Vaidya and Mather, 2005).

Além da DHOD, o parasita expressa outras 4 (quatro) enzimas desidrogenases mitocondriais, sendo elas: NADH:ubiquinona desidrogenase (NADH2) tipo II (EC 1.6.5.3), glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), succinato desidrogenase (SDH) (EC 1.3.5.1) e a malato quinona (MQO), as quais também são dependentes de ubiquinona (Vaidya and Mather, 2005). Essas enzimas são responsáveis por doarem elétrons para a ubiquinona, sendo convertida em sua forma reduzida, o ubiquinol. Em seguida, o ubiquinol é reoxidado pelo complexo III da CTE (Painter et al., 2007; Ke et al., 2019). A enzima NADH2 (E.C 7.1.1.2), o primeiro complexo da CTE, foi identificada nas predições (**Tabela 1 e Figura 16**). Como dito anteriormente, é importante ressaltar, que o complexo I da mitocôndria dos demais eucariotos não se assemelha com o complexo I da mitocôndria de *P. falciparum*, sendo substituído pela NADH2, de apenas uma subunidade, análogo ao encontrado em plantas e fungos (Mather and Vaidya, 2008; Evers et al., 2021), o que faz com que a imagem representando o complexo I, neste caso, seja meramente ilustrativo.

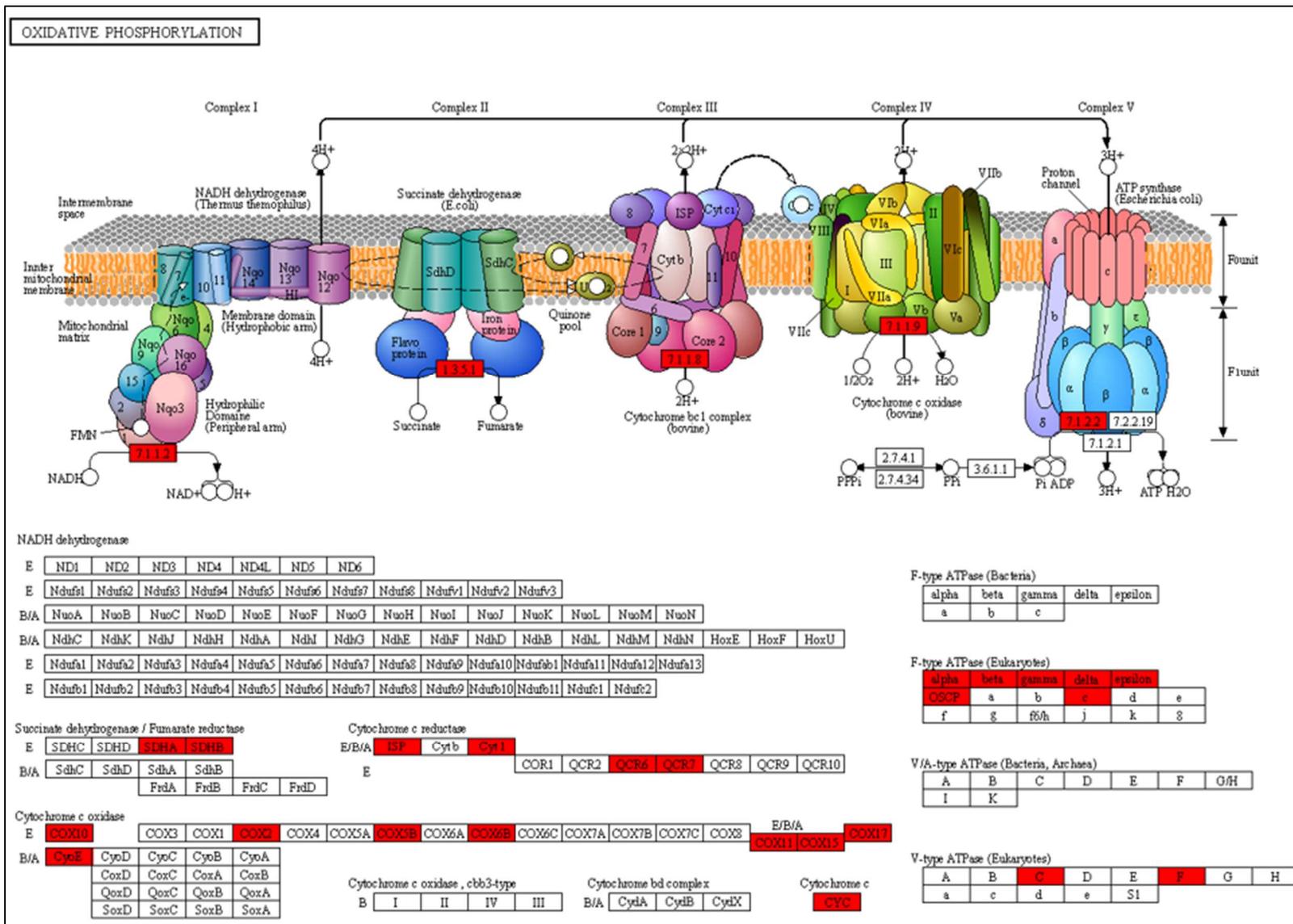


Figura 16. Esquema da cadeia transportadora de elétrons gerada pelo PathView. Destacado em vermelho, estão as proteínas mineradas e anotadas nas predições. As descrições das proteínas destacadas estão listadas na Tabela 1, além de terem sido encontradas nos GO terms (Tabela S3 e Figura 17), relacionados com os principais mecanismos relacionados à mitocôndria.

Na **Tabela 1**, observa-se a presença dos citocromos, que fazem parte dos complexos III e IV da CTE. O Complexo III (complexo citocromo *bc1*) já é alvo do antimalárico Malarone, uma combinação das drogas atovaquona e proguanil, utilizada desde o início dos anos 2000 (Ke et al., 2019). A Malarone atua, impedindo a regeneração da ubiquinona, ou seja, ela impede a reoxidação do ubiquinol pelo complexo III. Dessa forma, o transporte de elétrons é interrompido, levando ao desequilíbrio do gradiente eletroquímico o que resulta no colapso da mitocôndria (Uyemura et al., 2004; Ke et al., 2019). Sem atividade mitocondrial, a enzima DHOD se torna inativa, já que ela é dependente do ubiquinol, conseqüentemente a via de *de novo* de biossíntese das pirimidinas é interrompida, resultando na morte do parasita (Ke et al., 2019; Alzain et al., 2022).

Existem duas formas de uma célula adquirir pirimidinas: (i) utilizando-se de uma maquinaria contendo enzimas capazes de reciclá-las, e (ii) uma via *de novo* de biossíntese. As células de mamíferos possuem as duas vias, já o parasita não possui enzimas capazes de realizar a reciclagem das pirimidinas, restando assim, apenas a via *de novo*. Estudos anteriores, já demonstraram que as enzimas DHOD humana (hDHOD) e a DHOD de *P. falciparum* (PfDHOD) são significativamente diferentes, o que aumenta as expectativas de torná-la alvo de antimaláricos (Alzain et al., 2022).

Já existe um inibidor de DHOD comumente utilizada *in vitro*, chamado DSM265, porém, estudos clínicos demonstraram toxicidade testicular e teratogenia, o que fez com que ela fosse descartada como potencial antimalárico. Dessa forma, Alzain e colaboradores (2022), realizaram um estudo que tinha como objetivo buscar um novo antimalárico que causasse mínimo ou nenhum efeito colateral no hospedeiro humano. Os autores realizaram estudos *in silico*, que incluem filtros baseados em sequências de modelos de fármacos pré-existentes, com características *drug-like* por análises bioinformáticas. Foram listados três candidatos para potenciais inibidores, sendo eles Z1481646084, Z24317941 e Z951873618. Apesar disso, os autores reforçam a necessidade da realização de estudos mais aprofundados e experimentais, para avaliar a atividade desses inibidores, para que, posteriormente, testes clínicos sejam realizados (Alzain et al., 2022).

As análises de GO *terms* das proteínas mitocondriais resultou em 198 GO *terms* (**Tabela S3**). Com intuito de facilitar a representação gráfica, foram ilustrados os top 20 GO *terms* relacionados a “Processos Biológicos” e “Função Molecular” na **Figura 17**. Os GO *terms* foram classificados de acordo com o seu *p-value* e em relação ao *background*

das proteínas categorizadas em seus respectivos GO *terms* anotados através da plataforma PlasmoDB. Por exemplo, na categoria “Processos Biológicos”, quanto a categorização das proteínas preditas como mitocondriais, o primeiro GO *terms* apresentado é “GO:0007005 - organização da mitocôndria” (p-value de 3,1e-42) (**Tabela S3 e Figura 17A, à esquerda**). Um total de 48 proteínas foram anotadas como pertencentes a esse GO *terms*. Este número representa um total de 100% de correspondência entre as proteínas pesquisadas, em relação as proteínas anotadas dentro deste GO *terms*, sugerindo que tanto as predições *in silico* e mineração de dados realizados, resultaram em um enriquecimento de anotação funcional de proteínas que pertencem à mitocôndria de *P. falciparum* (**Figura 17A**).

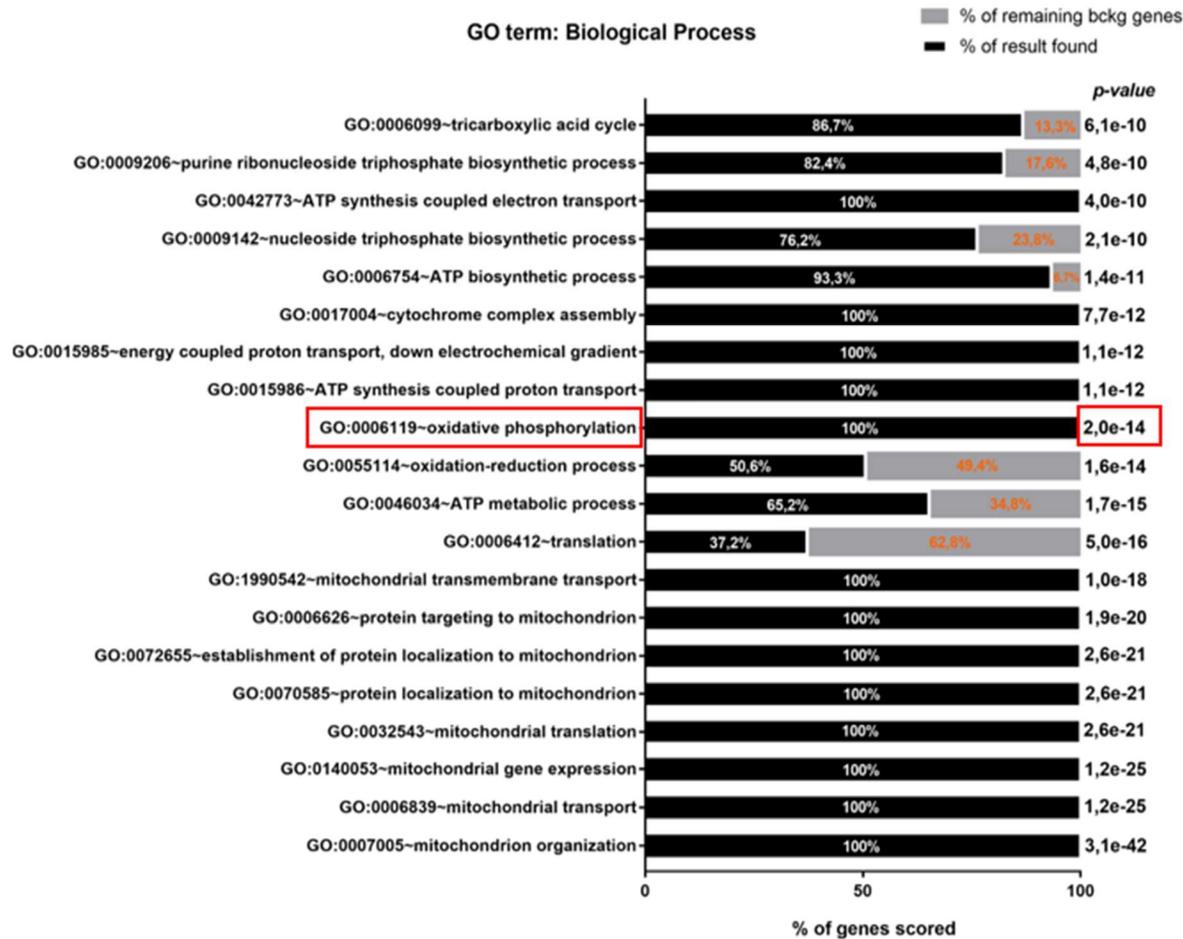
Em relação à categoria “Processos Biológicos”, foi observado que algumas proteínas da **Tabela 1** foram categorizadas em GO *terms* relacionados à CTE, como por exemplo, o “GO:0017004 – composição do complexo citocromo” (p-value de 7,7e-12), com 100% de correspondência entre as proteínas pesquisadas em relação às proteínas anotadas. Outro GO *term*, relacionado à CTE é o “GO:0009206 – Processo de biossíntese de ribonucleosídeos de purina” (p-value de 4,8e-10), com respectivamente, 93,3%, 76,2% e 82,4% de correspondência entre as proteínas pesquisadas em relação às proteínas anotadas (**Tabela S3**), para este último, vale ressaltar que a CTE tem como principal função manter a DHOD ativa para a via *de novo* de biossíntese de pirimidinas (Ke et al., 2011; Alzain et al., 2022).

Paralelamente, a fim de adicionar uma perspectiva mais sucinta em relação ao enriquecimento dos GO *terms*, uma *WordCloud* foi gerada a partir do *dataset* predito de proteínas mitocondriais de *P. falciparum*, para demonstrar o nível de enriquecimento de acordo com o seu p-value e número de proteínas enriquecidas, portanto, quanto maior e mais próximo da cor preta estiveram as letras, mais significativo é o enriquecimento (**Figura 17A, à direita**).

Em relação à categoria “Funções Moleculares”, os termos em que aparece mais da metade das proteínas listadas na **Tabela 1** são “GO:0015078 - atividade de transporte transmembrana de prótons” (p-value de 1,61e-11) e “GO:0022890 – atividade do transportador transmembrana de cátions inorgânicos” (p-value de 1,07e-08), destacando que há 56,5% e 41,1% de correspondência entre as proteínas pesquisadas em relação as proteínas anotadas, respectivamente. Para esta categoria, pelo menos, 10 proteínas da **Tabela 1** foram anotadas em 3 GO *terms*, sendo eles “GO:0008324 – atividade do transportador transmembrana de cátion” (p-value de 5,14e-09), “GO:0009055 –

Atividade de transferência de elétrons” (p-value 1,41E-24) e “GO:0016491 – Atividade de oxirredução” (p-value 4,48E-24), termos esses, nas quais também são possíveis de observar na *WordCloud* da **Figura 17B, à direita**, e possuem, respectivamente, 41,3%, 85,4% e 50,4% de correspondência entre as proteínas pesquisadas em relação as proteínas anotadas.

A



B

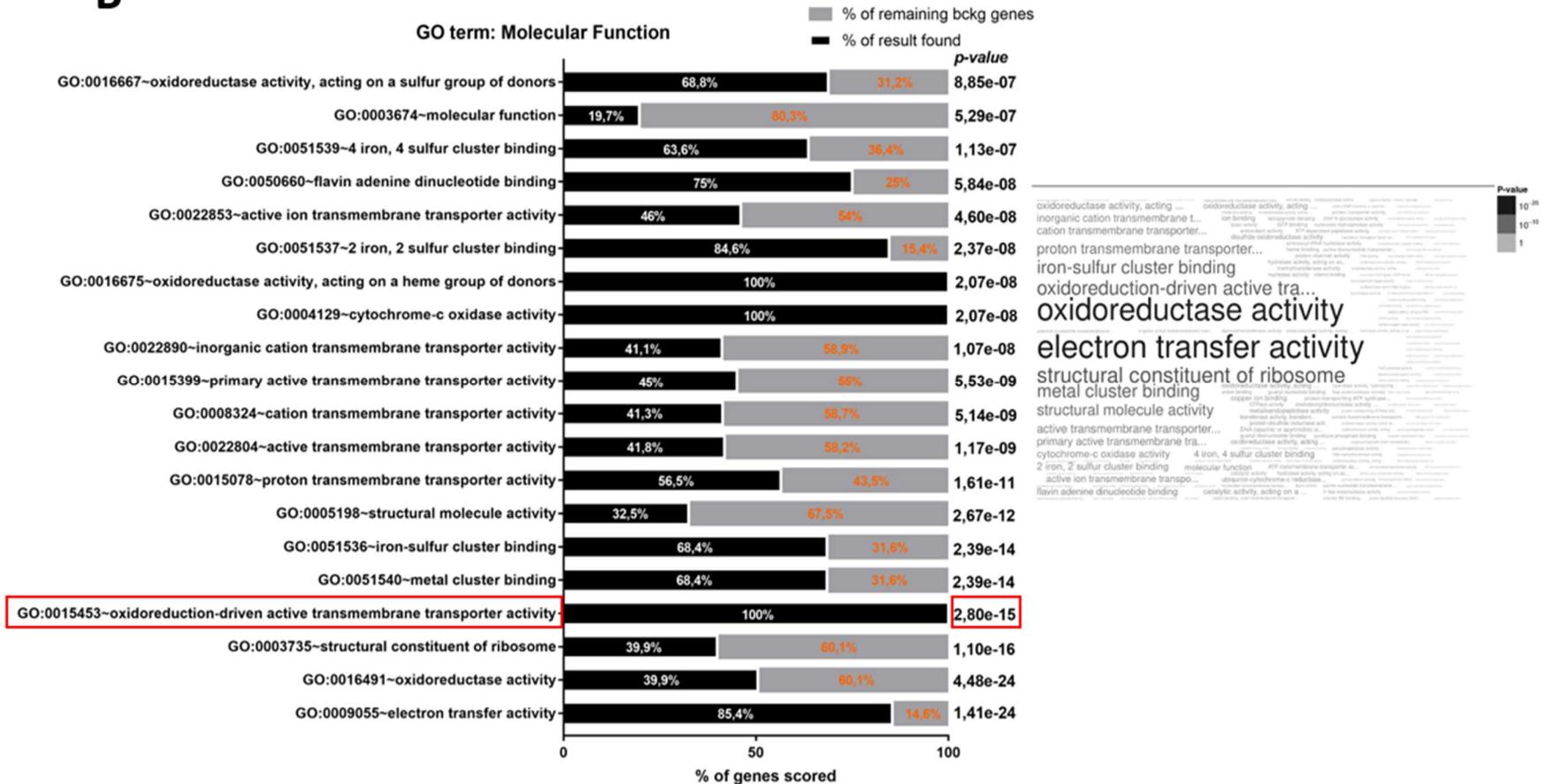


Figura 17. GO terms das proteínas preditas para a mitocôndria. (A) Os 20 primeiros GO terms mais relevantes estatisticamente, relacionado à categoria Processos Biológicos. Em destaque, está o termo GO:0006119 – fosforilação oxidativa, de p-value 2,0e-14 e 100% de correspondência entre as proteínas pesquisadas em relação às proteínas anotadas e preditas. À direita, há uma *WordCloud*, em que, quanto maior e mais próximo à cor preta, for a letra, mais significativo é o enriquecimento. (B) Os 20 primeiros GO terms mais relevantes estatisticamente, relacionado à categoria Funções Moleculares. Em destaque, está o termo “GO:0015453 - atividade do transportador transmembranar ativo impulsionado pela oxirredução” de p-value 2,80E-15 e 100 de correspondência entre as proteínas pesquisadas em relação às proteínas anotadas e preditas.

5.4.2. A biossíntese de ácidos graxos do tipo II e a sua relação biológica com o apicoplasto de *P. falciparum*

Durante as análises das proteínas referentes ao apicoplasto, foram preditas e listadas proteínas pertencentes à via de biossíntese de ácidos graxos do tipo II (**Tabela 2**). As proteínas desta via já foram caracterizadas como pertencentes ao apicoplasto de *P. falciparum*, através de uma refinada predição *in silico* (Ralph et al., 2004) e através de um estudo proteômico, utilizando BioID utilizando o peptídeo de trânsito, ACP (do inglês, *acyl carrier protein*), que endereçava a BirA (biotina-ligase de *Escherichia coli*) até o apicoplasto de *P. falciparum* (Boucher et al., 2018).

Tabela 2. Proteínas de apicoplasto relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos enriquecidas e anotadas pela plataforma KEGG. As enzimas destacadas em cinza abaixo estão na **Figura 18**, uma representação da FASII gerada pelo *PathView*.

Metabolismo dos ácidos graxos				
Código uniprot	Código PlasmoDB	Nome da proteína	Código Enzimático	Referências
Q8I2S7	PF3D7_0922900	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	EC 1.1.1.100	Ralph et al., 2004
C6KSZ2	PF3D7_0615100	Enoyl-acyl carrier reductase	EC 1.3.1.9	Ralph et al., 2004; Boucher et. al, 2018
Q8I0W9	PF3D7_0511200	Stearoyl-CoA desaturase	EC 1.14.19.1	Ralph et al., 2004; Boucher et. al, 2018
Q8I6Z9	PF3D7_1312000	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	EC 2.3.1.39	Ralph et al., 2004; Boucher et. al, 2018
O77078	fabH	Beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	EC 2.3.1.180	Ralph et al., 2004; Boucher et. al, 2018
O96230	PF3D7_0215000	Acyl-CoA synthetase	EC 6.2.1.3	Ralph et al., 2004; Boucher et. al, 2018
Q8I6T4	PF3D7_1323000	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	EC 4.2.1.59	Ralph et al., 2004 ; Boucher et. al, 2018
C0H4B9	PF3D7_0422000	Steroid dehydrogenase, putative	EC 1.1.1.35	Boucher et. al, 2018
Q8IKE1	PF3D7_1469600	Acetyl-CoA carboxylase	EC 6.4.1.2	Ralph et al., 2004; Boucher et al, 2018

A biossíntese de ácidos graxos, em células eucarióticas, pode ocorrer, tanto no citoplasma, sendo conhecida como tipo I (do inglês, *fatty acid synthesis type I* – FASI) e tendo como produto os triglicerídeos e fosfolípidios, tanto quanto na mitocôndria, conhecida como tipo II (do inglês, *fatty acid synthesis type II* – FASII), tendo como produto o ácido lipoico (Fhu and Ali, 2020). Em *Plasmodium* spp., a FASII ocorre no apicoplasto e, levando em consideração sua ancestralidade *plant-like*, além das enzimas que realizam as conversões dos intermediários bioquímicos, esta organela possui características muito similares às plantas e algas do ponto de vista bioquímico (Ralph et al., 2004; Lim and McFadden, 2010; Shears et al., 2015). Apesar do parasita possuir a FASII, as enzimas que catalisam a biossíntese de ácidos graxos não apresentem homólogos no hospedeiro humano, portanto, podem ser potenciais alvos para o desenvolvimento de antimaláricos (Vaughan et al., 2009; Shears et al., 2015).

A FASII do parasita é composta por 3 (três) etapas: preparação, iniciação e alongamento. Para melhor visualização da via, a ilustração através do enriquecimento funcional através do *PathView* foi gerada, com as enzimas preditas e listadas em destaque (**Figura 18 e Tabela S2**). A preparação, inicia-se com a importação do fosfoenolpiruvato (PEP) da glicólise, presente no citoplasma, para o apicoplasto. Este transporte é realizado por uma proteína pertencente à família de translocadores de fosfato plastidiais (pPTs) chamada transportador de fosfoenolpiruvato (PPT) (Lim et al., 2010; Shears et al., 2015). A PEP, então, é convertida em acetil-CoA, pela enzima piruvato desidrogenase (PDH) e em ATP, pela enzima piruvato cinase (PKII) (Shears et al., 2015).

Em seguida, na etapa de iniciação, ocorre a conversão do acetil-CoA em Malonil-CoA, pela enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC) (EC 6.4.1.2), na qual servirá como doador de carbono para etapa seguinte; e, Acetoacetil-ACP, pela enzima β -Cetoacil-ACP sintase III (FabH) (EC 2.3.1.180), na qual servirá como primeiro substrato na fase de alongamento do ácido graxo. Ainda na fase de iniciação, a Malonil-CoA é convertida em Malonil-acyl carrier protein[ACP] pela enzima Malonil-CoA:ACP transacilase (FabD) (EC 2.3.1.39). A ACP, é essencial para a via, já que ela se liga aos ácidos graxos e seus precursores, além de ser essencial no transporte dos substratos para enzimas relacionadas (Shears et al., 2015).

A última fase da FASII, a fase de alongamento, é caracterizada por uma reação cíclica na qual ocorre a extensão da cadeia de ácidos graxos, sendo adicionados 2 carbonos por ciclo. Ela se inicia com a condensação do malonil-ACP com a acil-ACP pela enzima β -cetoacil-ACP sintase I/II (FabB/F), liberando CO₂ e β -cetoacil-ACP,

formada por 2 (dois) carbonos. Em seguida, a β -cetoacil-ACP redutase (FabG), reduz a β -cetoacil-ACP em β -hidroxiacil-ACP. A β -hidroxiacil-ACP é convertida em enoil-ACP, com a remoção de uma molécula de água pela β -hidroxiacil-ACP desidrogenase (FabZ). Para finalizar o ciclo, a Enoil-ACP redutase (FabI) (EC 1.3.1.9), reduz a Enoil-ACP em Acil-ACP para a reiniciação do ciclo (Shears et al., 2015) (**Figura 18**).

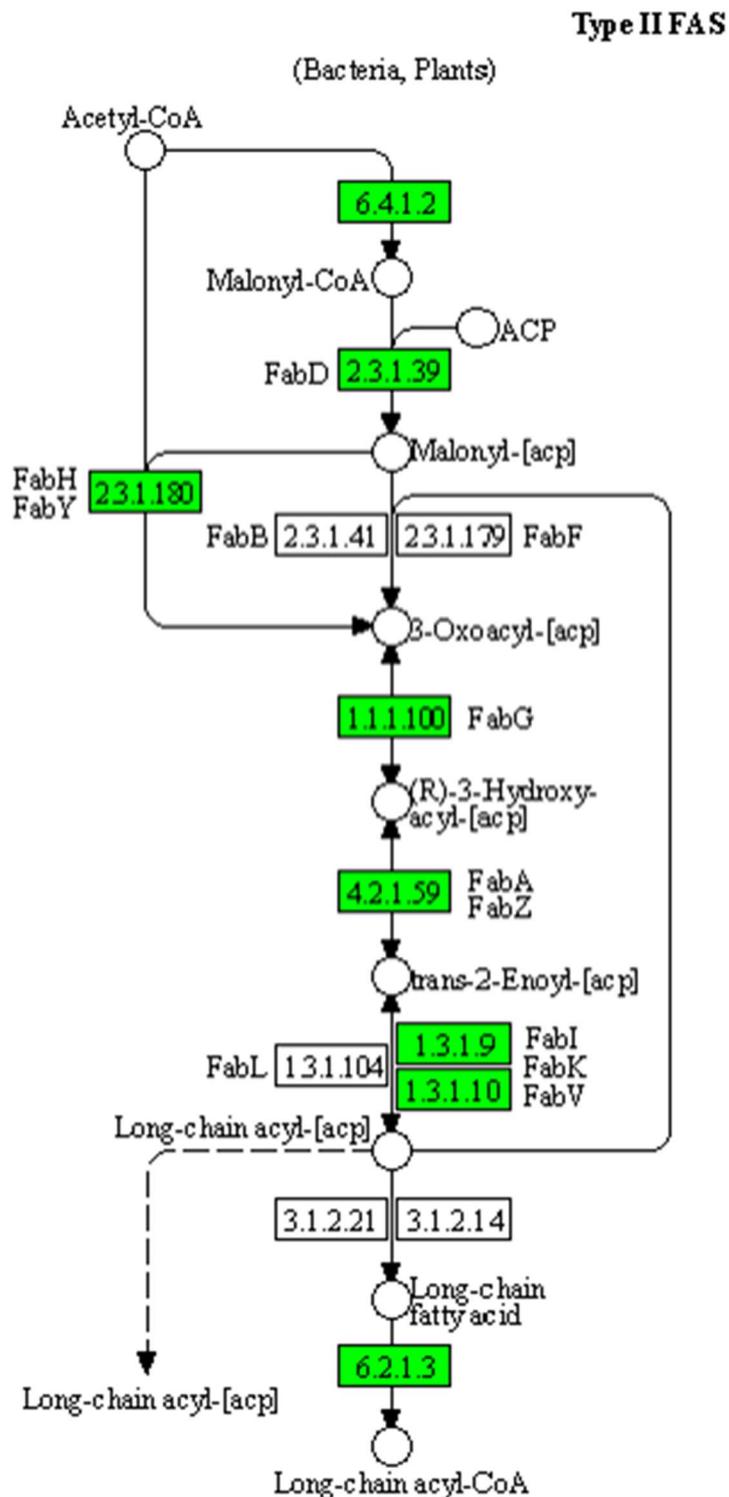


Figura 18. Esquema da vida de biossíntese de ácidos graxos do tipo II gerada pelo *PathView*. Destacado em verde, estão as proteínas previstas por fazerem parte desta via metabólica (**Tabela**

2 e Tabela S2). Dentre elas, destaca-se as enzimas EC 1.1.1.100, EC 1.3.1.9, EC 2.3.1.180 (FabH), EC 4.2.1.59 (FabZ) e EC 6.4.1.2 (ACC), nas quais já foram estudadas por serem potenciais alvos antimaláricos.

É possível perceber que, na **Tabela 2** estão listadas a maior parte das enzimas que fazem parte da FASII, principalmente aquelas envolvidas na etapa de alongamento (E.C 6.4.1.2; E.C 4.2.4.59; E.C 2.3.1.180 e E.C 2.3.1.39). A FASII já foi comprovada por não ser relevante para a fase eritrocitária do parasita, porém, ela é crucial na fase hepática (Vaughan et al., 2009; Shears et al., 2015). Acredita-se que a necessidade da FASII neste estágio, esteja relacionada à alta demanda de fosfolipídios para a formação de membrana dos milhares merozoítos que irão dar início à fase eritrocitária (Vaughan et al., 2009). É importante ressaltar que, a maior parte dessas enzimas já foram estudadas por serem potenciais alvos de antimaláricos. Algumas enzimas da FASII já foram supostamente, alvo de antimaláricos, que atuavam na fase intraeritrocitária do parasita, como a FabI (Yu et al., 2008), FabH (Alhamadsheh et al., 2008), FabZ (Sharma et al., 2003) e ACC (Waller et al., 2003) porém, após estudos que demonstraram que a FASII é dispensável neste estágio, acredita-se que os antimaláricos previamente estudados possam ter outras enzimas como alvo.

Uma lista com os GO *terms* preditos para as proteínas do apicoplasto de *P. falciparum* foi gerada e um total de 67 GO *terms* relacionados à categoria “Processos Biológicos” foram preditos, e 62 para a categoria “Funções Moleculares”. Em relação à categoria “Processos Biológicos”, as proteínas da **Tabela 2**, em sua grande maioria, estão anotadas no GO *term* “GO:0006633 – Processo Biossintético de ácidos graxos” (*p-value* de 7,68E-07), na qual, apresenta 53,8% de correspondência das proteínas pesquisadas em relação às proteínas anotadas (**Tabela S4, Figura 19A**). Outros termos em que todas as proteínas da **Tabela 2** estão anotadas são “GO:0032787 - processo metabólico do ácido monocarboxílico” (*p-value* de 3,76E-07) e “GO:0006082 - Processo Metabólico de Ácido Orgânico” (*p-value* de 1,18E-06), nas quais têm 37,3% e 26,8% de correspondência (**Tabela S4, Figura 19A**), termos esses, nas quais são possíveis observar na *WordCloud* (**Figura 19A, à direita**).

A **Figura 19** ilustra os top 20 GO *terms* gerados para as categorizações “Processos Biológicos”, e “Funções Moleculares”, com os melhores *p-values* encontrados. Os demais GO *terms* estão listados na **Tabela S4**. A maior parte das proteínas anotadas na **Tabela 2**, fazem parte do GO *term* “GO:0004312– Atividade de síntese de ácidos graxos” (*p-value* de 6,35E-04) e 60% de correspondência das proteínas pesquisadas em relação às

proteínas anotadas, dentro da categoria “Funções Moleculares” (**Tabela S4 e Figura 19B**), sugerindo que tanto as predições *in silico* e mineração de dados realizados, resultaram em um enriquecimento de anotação funcional de proteínas que pertencem à FASII de apicoplasto. Outros GO *terms*, em que aparece grande parte das proteínas da **Tabela 2** da categoria “Funções Moleculares”, anotados são “GO:0016616 - Atividade de oxirredução agindo no grupo CH-OH de doadores, NAD ou NADP como acceptor” (*p-value* de 1,39E-02) e “GO:0016746 – Atividade aciltransferase” (*p-value* 1,45e-02), nas quais têm 33,3% e 22,7% de correspondência (**Tabela S4 e Figura 19B**).

B

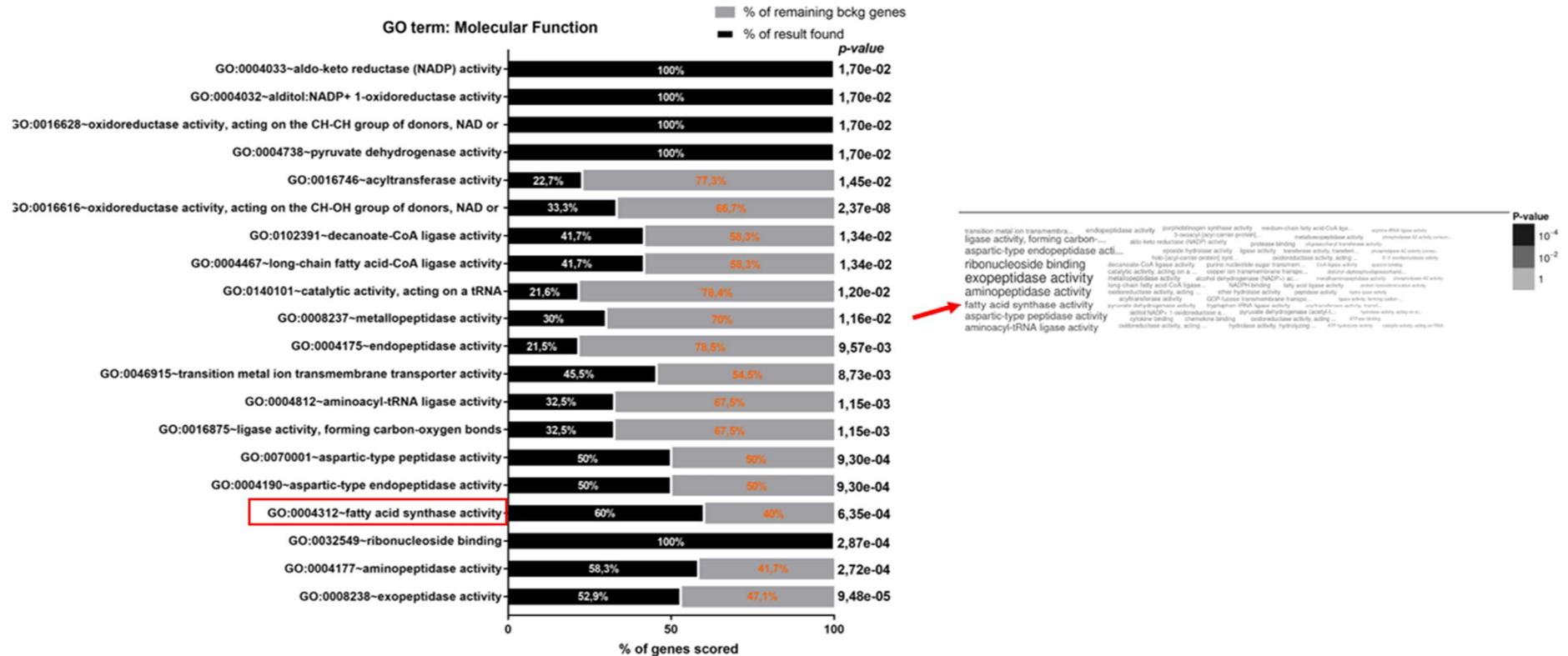


Figura 19. GO terms das proteínas previstas para o apicoplasto. (A) Os 20 primeiros GO terms mais relevantes estatisticamente, relacionado à categoria Processos Biológicos. Em destaque, está o termo “GO:0006631- Processos Metabólicos dos Ácidos Graxos” com p-value de 2,33E-06 e 43,6% de correspondência entre as proteínas pesquisadas em relação às proteínas anotadas e previstas. À direita, há uma *WordCloud*, em que, quanto maior e mais próximo à cor preta, for a letra, mais significativo é o enriquecimento. (B) Os 20 primeiros GO terms mais relevantes estatisticamente, relacionado à categoria Funções Moleculares. Em destaque, está o termo “GO: 0004312- Atividade sintática de ácidos graxos” de p-value 6,35E-04 e 60% de correspondência entre as proteínas pesquisadas em relação às proteínas anotadas e previstas.

É importante ressaltar que, a busca por novos inibidores para a via FASII, até o presente momento, se demonstrou frustrante. Devido a este fato, alguns estudos possibilitaram uma melhor caracterização das enzimas que compõe o apicoplasto de *P. falciparum* (Ralph et al 2004; Boucher et al 2018), levando a uma melhor compreensão, em relação à sua importância para o parasita, revelando, por exemplo, que ela é dispensável para a fase eritrocitária assexuada, porém, crucial na fase hepática (Vaughan et al., 2009). Dessa forma, esses estudos fizeram com que a FASII seja a via mais bem caracterizada e detalhada do apicoplasto (Shears et al., 2015), o que demonstra a importância em estudar melhor esta organela e as vias metabólicas que a compõe.

5.4.3. A interrelação entre a mitocôndria e o apicoplasto: o que esperar?

Dentre as 108 proteínas listadas e caracterizadas como sendo “em comum” (Tabela S1), foram observadas proteínas nas quais já são estudadas por serem potenciais alvos de antimaláricos. O *P. falciparum* possui uma enzima chamada peptídeo deformilase (PF3D7_0907900 - *PfPDF*), na qual é uma metaloprotease essencial na síntese proteica de organelas, e é conhecida por estar presente, também, em bactérias. A proteína *PfPDF*, é descrita como sendo uma proteína de apicoplasto (Bracchi-Ricard et al., 2001), porém, em nossas predições, ela foi anotada por estar em ambas as organelas. Esta enzima tem como função, retirar o grupo formil presente nas cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas, já que o tRNA presente nas organelas apresenta um N-formilmietionina (Bracchi-Ricard et al., 2001; Amberg-Johnson et al., 2017). Acreditou-se, por muito tempo, que a actinonina, um antibiótico, tinha como alvo esta proteína. No entanto, Amberg-Johnson e colaboradores (2017) demonstraram que a actinonina tem outra metaloprotease como alvo, a FtsH1 (PF3D7_1239700) (do inglês, *ATP-dependent zinc metalloprotease*), além disso, os autores demonstram que esta proteína possui dois homólogos em *P. falciparum*, sendo eles, a PF3D7_1119600 e a PF3D7_1464900 (Amberg-Johnson et al., 2017), sendo a última, predita por estar dentre as 108 proteínas “em comum” (Tabela S1).

Como dito anteriormente, as proteínas recém-sintetizadas nas organelas apresentam o tRNA^{met} formilado, a enzima responsável pela formilação do tRNA^{met} é a metionil-tRNA formiltransferase (PF3D7_1313200 - FMT) (Pino et al., 2010), na qual também está anotada como sendo uma proteína “em comum” para ambas as organelas

(Tabela S1). A FMT é uma enzima folato, o que a torna um potencial alvo antimalárico, já que os antifolatos já são utilizados como antimaláricos, atuando na inibição da via *de novo* de síntese de coenzimas necessárias para síntese de folato. A síntese de folato desencadeia a via de replicação do DNA do parasita pela síntese de pirimidinas, e, geralmente auxilia a esquizogonia (Rout and Mahapatra, 2019). Acredita-se que, quando esta proteína está suprimida, o parasita se torna mais sensível ao antibiótico actinonina, o que faz com que esta proteína seja explorada para se tornar um potencial alvo de antimalárico, para se utilizar em combinação com a própria actinonina (Goodman et al., 2020). Um exemplo dessa estratégia, pode ser observado em um dos tratamentos de referência contra a malária atualmente, como é o caso do Malarone, em que consiste na junção da atovaquona com o antifolato proguanil (Nzila, 2006).

Outra proteína anotada por estar dentre as 108 proteínas em comum, é a proteína ferredoxina-NADP redutase (PF3D7_0623200 – FNR) **(Tabela S1)**, que faz parte do fotossistema ferredoxina/ferredoxina NADP⁺ redutase (Fd/FNR), essencial para a sobrevivência do parasita (Swift et al., 2022). Ainda não se sabe quais são os papéis individuais dessas proteínas, para a sobrevivência do parasita, porém, sabe-se que este sistema fornece redutores equivalentes para várias enzimas do apicoplasto, como por exemplo, para aquelas que fazem parte do *cluster* de proteínas ferro-enxofre (Fe-S) (Gisselberg et al., 2013; Swift et al., 2022). Estas enzimas são essenciais para a via de síntese de pirofosfato de isopentenilo (IPP), precursores de isoprenóides (Ralph et al., 2004) e a única via essencial do apicoplasto (Yeh and DeRisi, 2011). Os isoprenóides são metabólitos essenciais para a sobrevivência do parasita e, apesar de serem sintetizados no apicoplasto, são requisitados fora dele. Além disso, acredita-se que o parasita consegue sobreviver na ausência do apicoplasto desde que a via de síntese de IPP seja compensada (Yeh and DeRisi, 2011; Gisselberg et al., 2013; Swift et al., 2023). O complexo Fd/FNR é o único sistema redox conhecido no apicoplasto e o único remanescente do fotossistema do plastídio. Ademais, nunca foram encontrados ortólogos do sistema no hospedeiro humano, tornando-o uma das vias já exploradas para antimaláricos (Swift et al., 2022).

Dentro do grupo das proteínas “em comum” e, presumidamente, relacionada com a resistência do antimalárico mefloquina, está a proteína ABC transportadora B da família 7 (PF3D7_1209900) (ou do inglês, *P. falciparum multi-drug resistance 7*, *Pfmdr7*) (Peel, 2001; Iwanaga et al., 2022). É importante ressaltar que outras proteínas da família de transportadores ABC já são descritas por serem responsáveis pela resistência de antimaláricos (Klokouzas et al., 2003). As proteínas da família de transportadores ABC

são bem descritas, sendo caracterizadas como proteínas de membrana, e possuem cassetes de ligação com ATP, além de serem bastante conservadas em procariotos e eucariotos. Os sítios de ligação ao substrato são voltados para a camada interna da membrana e são responsáveis por exportar substâncias lipofílicas, como a fosfatidilcolina (fosfolipídios que compõem a bicamada) e o ácido biliar, e excretar drogas lipofílicas como a cochicina, uma droga lipofílica utilizada para diversos tratamentos (Koenderink et al., 2010; Iwanaga et al., 2022). A mefloquina é uma droga lipofílica, na qual pode ser retida dentro das membranas celulares e acredita-se que ela é exportada antes do contato com o citoplasma do parasita (Iwanaga et al., 2022).

Apesar da literatura indicar que algumas proteínas citadas acima pertencem ao apicoplasto, as predições realizadas no presente trabalho indicam que elas possam estar também, na mitocôndria (**Tabela S1**). Porém, vale ressaltar que, apesar do apicoplasto possuir uma maquinaria própria de transcrição e tradução de seu genoma, a grande maioria das proteínas necessárias para a organela é codificada pelo núcleo e então importadas para a organela (Ralph et al., 2004; Shears et al., 2015; Amberg-Johnson et al., 2017). Por exemplo, já se sabe que a proteína Atg8 (do inglês, *autophagy-related protein*), na qual é recrutada, do citoplasma, para a membrana de células que são induzidas à autofagia celular, também foi localizada no apicoplasto, em sua membrana mais externa. Lévêque e colaboradores, fizeram estudos com esta proteína e demonstram que o seu *knockout* leva à morte do apicoplasto, indicando sua importância na organela (Lévêque et al., 2015). Portanto, devido a evidências que a mitocôndria e o apicoplasto estão interligadas física e bioquimicamente (Ralph et al., 2004), é possível que haja o compartilhamento de proteínas entre ambas (Amberg-Johnson et al., 2017)

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A mitocôndria em eucariotos tem uma função essencial no metabolismo energético celular (Chinnery and Schon, 2003), porém, em *Plasmodium* spp., ela é essencial para a via *de novo* de biossíntese de pirimidinas (Painter et al., 2007; Evers et al., 2021), já que o parasita adquire sua energia de forma anaeróbica (Uyemura et al., 2004; Painter et al., 2007; Mather and Vaidya, 2008). Para o processo de esquizogonia do parasita, é necessário que as organelas se estabeleçam nos merozoítos. Curiosamente, a mitocôndria realiza este processo juntamente com o apicoplasto, um plastídeo não-fotossintético presente em Apicomplexa (Van Dooren et al., 2006; Mather and Vaidya, 2008; Voleman and Dolezál, 2019). É possível que esse fenômeno ocorra devido a inter-relação física e bioquímica entre ambas as organelas (Ralph et al., 2004; Voleman and Dolezál, 2019), na qual, compartilham intermediários da via *de novo* biossíntese do heme (Ralph et al., 2004).

O presente estudo, buscou mapear o subproteoma da mitocôndria de *P. falciparum*, utilizando a técnica de biotinylação por proximidade APEX2. Sabe-se que o *P. falciparum* é um organismo desafiador, principalmente quando se trata na obtenção de organismos mutantes (Amberg-Johnson et al., 2017). No entanto, após a otimização do protocolo, foi possível obter os mutantes 21-28 dias após a seleção com a droga WR99210. Após a extração dos parasitas em tampão RIPA, verificou-se por *Western Blot* e estreptavidina-*blot*, tanto a expressão da HA-APEX2 e a biotinylação das proteínas, respectivamente (**Figura 12A e E**).

Alguns *Western Blots* adicionais foram realizados, tendo como alvos, proteínas conhecidas por pertencerem ao retículo endoplasmático (anti-*Pf*PD18) (Mahajan et al., 2006) (**Figura 12C**) e vacúolo parasitóforo (anti-*Pf*EXP2) (Jonsdottir et al., 2021) (**Figura 12D**). Conforme esperado, duas bandas de tamanhos distintos, foram marcadas nas alturas correspondentes às proteínas de interesse. Desse modo, pode-se concluir que se tratava de um extrato de proteínas provenientes de *P. falciparum*.

Paralelamente a realização dos *Western Blots* foram realizados os ensaios de imunofluorescência utilizando microscopia confocal à laser, nas quais foram utilizadas 4 (quatro) marcações na preparação das células. A marcação do *loading control* ocorreu, porém, não é possível identificar com clareza se ela ocorreu, de fato, no retículo endoplasmático do parasita (**Figura 12**). Apesar da marcação do MitoTracker Deep Red ter ocorrido, observou-se um padrão diferente do esperado, já que a mitocôndria se

localiza lateralmente ao núcleo (Van Dooren et al., 2006; Korkor et al., 2020; Lamb et al., 2022) e a marcação ocorreu dentro do vacúolo digestivo do parasita (**Figura 13**). Com isso, foram realizados novos testes utilizando o MitoTracker Orange CMTMRos, em culturas tipo selvagem 3D7 de *P. falciparum*, na qual contém um comprimento de onda diferente do utilizado anteriormente, e foi observado uma marcação lateralmente ao núcleo, onde a mitocôndria está localizada (**Figura 14**), portanto, a utilização do MitoTracker Orange CMTMRos servirá para a marcação mitocondrial para futuros experimentos.

Utilizando a estreptavidina-AF488, foi identificada a biotinição das proteínas, somente para a condição positiva, na qual consiste na presença de biotina fenol e peróxido de hidrogênio, conforme o esperado (**Figura 13B**), porém, a marcação não ocorreu na mitocôndria, sugerindo que não houve endereçamento da HA-APEX para o compartimento. Após uma análise do plasmídeo foi observado um erro na sequência do peptídeo de trânsito utilizado, a tiorredoxina redutase (TrxR). Contudo, a sequência do peptídeo de trânsito foi corrigida e um novo plasmídeo já foi obtido e os experimentos de sub-clonagem já estão em andamento. Mesmo que a biotinição não tenha ocorrido na mitocôndria, vale ressaltar que a reação de biotinição das proteínas de *P. falciparum* ocorreu.

Foi realizado predições *in silico* e mineração de dados, a partir de diferentes plataformas, a fim de obter um subproteoma predito da mitocôndria e apicoplasto de *P. falciparum* (**Figura 15**). A partir das análises de classificação funcional e biológica através das anotações das plataformas PlasmoDB, Uniprot e KEGG, foi possível enriquecer vias/mecanismos característicos de ambas as organelas, reforçando a robustez dos *datasets* minerados. Algumas das proteínas listadas como “em comum” já foram estudadas por serem potenciais alvos antimaláricos. Para a mitocôndria, por exemplo, estudos demonstram que a CTE é essencial para a sobrevivência do parasita e que o antimalárico Atovaquona, já tem como alvo a interrupção desta via (Uyemura et al., 2004; Ke et al., 2019). No caso do apicoplasto, há evidências de que a FASII pode conter alvos antimaláricos de grande potencial (Yeh and DeRisi, 2011; Shears et al., 2015).

As predições *in silico* e mineração de dados foram realizadas para um refinamento dos futuros dados proteômicos, que serão obtidos após a obtenção de novos mutantes que expressarão HA-APEX2 devidamente localizadas na mitocôndria de *P. falciparum*. Para isso, as sub-clonagens a partir uma nova sequência já estão em andamento. Após a obtenção de novos mutantes utilizando o novo equipamento de eletroporação recém-

adquirido pelo nosso grupo, Amaxa 4D (Lonza), seguida das validações adequadas de *Western Blot*, estreptavidina-*blot* e imunofluorescência, a preparação das amostras para a análise proteômica serão preparadas. Espera-se que, uma compreensão mais detalhada acerca dos mecanismos moleculares que permitem o compartilhamento entre a mitocôndria e o apicoplasto, possam viabilizar em breve, a descoberta e/ou priorização racional de alvos para novos antimaláricos.

7. REFERÊNCIAS

- Alhamadsheh, M. M., Waters, N. C., Sachdeva, S., Lee, P., and Reynolds, K. A. (2008). Synthesis and biological evaluation of novel sulfonyl-naphthalene-1,4-diols as FabH inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 6402–6405. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.10.097.
- Alzain, A. A., Ahmed, Z. A. M., Mahadi, M. A., khairy, E. A., and Elbadwi, F. A. (2022). Identification of novel Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors for malaria using in silico studies. *Sci Afr* 16. doi: 10.1016/j.sciaf.2022.e01214.
- Amberg-Johnson, K., Hari, S. B., Ganesan, S. M., Lorenzi, H. A., Sauer, R. T., Niles, J. C., et al. (2017). Small molecule inhibition of apicomplexan FtsH1 disrupts plastid biogenesis in human pathogens. doi: 10.7554/eLife.29865.001.
- Antonelli, L. R., Junqueira, C., Vinetz, J. M., Golenbock, D. T., Ferreira, M. U., and Gazzinelli, R. T. (2020). The immunology of Plasmodium vivax malaria. *Immunol Rev* 293, 163–189. doi: 10.1111/imr.12816.
- Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., Von Heijne, G., Elofsson, A., et al. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci Alliance* 2. doi: 10.26508/lsa.201900429.
- Balikagala, B., Fukuda, N., Ikeda, M., Katuro, O. T., Tachibana, S.-I., Yamauchi, M., et al. (2021). Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa. *New England Journal of Medicine* 385, 1163–1171. doi: 10.1056/nejmoa2101746.
- Banas, A. M., Banas, K., Chu, T. T. T., Naidu, R., Hutchinson, P. E., Agrawal, R., et al. (2021). Comparing infrared spectroscopic methods for the characterization of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *Commun Chem* 4. doi: 10.1038/s42004-021-00567-2.
- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S., and Mitchell, G. H. (2000). A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of Plasmodium falciparum Asexual Blood Stages. *Parasitology Today* 16, 427–433.
- Barton, V., Fisher, N., Biagini, G. A., Ward, S. A., and O'Neill, P. M. (2010). Inhibiting Plasmodium cytochrome bc1: A complex issue. *Curr Opin Chem Biol* 14, 440–446. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.05.005.
- Biddau, M., and Sheiner, L. (2019). Targeting the apicoplast in malaria. *Biochem Soc Trans* 47, 973–983. doi: 10.1042/BST20170563.
- Birnbaum, J., Scharf, S., Schmidt, S., Jonscher, E., Anna, W., Hoeijmakers, M., et al. (2020). A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. Available at: <http://science.sciencemag.org/>.
- Boucher, M. J., Ghosh, S., Zhang, L., Lal, A., Jang, S. W., Ju, A., et al. (2018). Integrative proteomics and bioinformatic prediction enable a high-confidence apicoplast proteome in malaria parasites. *PLoS Biol* 16. doi: 10.1371/journal.pbio.2005895.

- Boyle, M. J., Wilson, D. W., Richards, J. S., Riglar, D. T., Tetteh, K. K. A., Conway, D. J., et al. (2010). Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14378–14383. doi: 10.1073/pnas.1009198107.
- Bracchi-Ricard, V., Nguyen, K. T., Zhou, Y., Rajagopalan, P. T. R., Chakrabarti, D., and Pei, D. (2001). Characterization of an eukaryotic peptide deformylase from *Plasmodium falciparum*. *Arch Biochem Biophys* 396, 162–170. doi: 10.1006/abbi.2001.2631.
- Carneiro, R. G. (2019). Estudo do exportoma de *Plasmodium falciparum* nos estágios eritrocitários tardios.
- Casares, S., Brumeanu, T. D., and Richie, T. L. (2010). The RTS,S malaria vaccine. *Vaccine* 28, 4880–4894. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.05.033.
- CDC (2018). Drug Resistance in the Malaria-Endemic World. *Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/drug_resistance.html [Accessed September 21, 2022].
- CDC (2020). Malaria: Parasite Biology. *Centers for Disease Control and Prevention*.
- Charneau, S., Dourado Bastos, I. M., Mouray, E., Ribeiro, B. M., Santana, J. M., Grellier, P., et al. (2007). Characterization of PfDYN2, a dynamin-like protein of *Plasmodium falciparum* expressed in schizonts. *Microbes Infect* 9, 797–805. doi: 10.1016/j.micinf.2007.02.020.
- Chinnery, P. F., and Schon, E. A. (2003). Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 1188–1199. doi: 10.1136/jnmp.74.9.1188.
- Cottrell, G., Musset, L., Hubert, V., le Bras, J., and Clain, J. (2014). Emergence of resistance to atovaquone-proguanil in malaria parasites: Insights from computational modeling and clinical case reports. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 4504–4514. doi: 10.1128/AAC.02550-13.
- Cowman, A. F., Berry, D., and Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *Journal of Cell Biology* 198, 961–971. doi: 10.1083/jcb.201206112.
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., and Marsh, K. (2016). Malaria: Biology and Disease. *Cell* 167, 610–624. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055.
- Dahl, E. L., and Rosenthal, P. J. (2008). Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. *Trends Parasitol* 24, 279–284. doi: 10.1016/j.pt.2008.03.007.
- Datoo, M. S., Natama, H. M., Somé, A., Bellamy, D., Traoré, O., Rouamba, T., et al. (2022). Efficacy and immunogenicity of R21/Matrix-M vaccine against clinical malaria after 2 years' follow-up in children in Burkina Faso: a phase 1/2b randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00442-X.

- Degli, M. (1998). Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview.
- Dijkman, P. M., Marzluf, T., Zhang, Y., Chang, S.-Y. S., Helm, D., Lanzer, M., et al. (2021). Structure of the merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*. Available at: <https://www.science.org>.
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., and Nagy, L. E. (2013). Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol* 3, 785–797. doi: 10.1002/cphy.c120026.
- Evers, F., Cabrera-Orefice, A., Elurbe, D. M., Kea-te Lindert, M., Boltryk, S. D., Voss, T. S., et al. (2021). Composition and stage dynamics of mitochondrial complexes in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 12. doi: 10.1038/s41467-021-23919-x.
- Fairhurst, R. M., and Dondorp, A. M. (2016). Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria. *Microbiol Spectr* 4. doi: 10.1128/microbiolspec.ei10-0013-2016.
- Fairhurst, R. M., Nayyar, G. M. L., Breman, J. G., Hallett, R., Vennerstrom, J. L., Duong, S., et al. (2012). Artemisinin-resistant malaria: Research challenges, opportunities, and public health implications. in *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 231–241. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0025.
- Fang, H., Gomes, A. R., Klages, N., Pino, P., Maco, B., Walker, E. M., et al. (2018). Epistasis studies reveal redundancy among calcium-dependent protein kinases in motility and invasion of malaria parasites. *Nat Commun* 9. doi: 10.1038/s41467-018-06733-w.
- Fhu, C. W., and Ali, A. (2020). Fatty Acid Synthase: An Emerging Target in Cancer. *Molecules* 25. doi: 10.3390/molecules25173935.
- Fry, M., and Pumey, M. (1992). SITE OF ACTION OF THE ANTIMALARIAL HYDROXYNAPHTHOQUINONE, 2-[trans-4-(4'-CHLOROPHENYL)CYCLOHEXYLI-3-HYDROXY-1,4-NAPHTHOQUINONE (566C80).
- Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S. C., Tomii, K., Horton, P., and Imai, K. (2015). MitoFates: Improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Molecular and Cellular Proteomics* 14, 1113–1126. doi: 10.1074/mcp.M114.043083.
- Gisselberg, J. E., Dellibovi-Ragheb, T. A., Matthews, K. A., Bosch, G., and Prigge, S. T. (2013). The Suf Iron-Sulfur Cluster Synthesis Pathway Is Required for Apicoplast Maintenance in Malaria Parasites. *PLoS Pathog* 9. doi: 10.1371/journal.ppat.1003655.
- Goodman, C. D., Uddin, T., Spillman, N. J., and McFadden, G. I. (2020). A single point mutation in the *plasmodium falciparum* *ftsh1* metalloprotease confers actinonin resistance. *Elife* 9, 1–7. doi: 10.7554/eLife.58629.
- Green, M. R., and Sambrook, J. (2017). Precipitation of DNA with isopropanol. *Cold Spring Harb Protoc* 2017, 673–674. doi: 10.1101/pdb.prot093385.

- Han, Y., Branon, T. C., Martell, J. D., Boassa, D., Shechner, D., Ellisman, M. H., et al. (2019). Directed Evolution of Split APEX2 Peroxidase. *ACS Chem Biol* 14, 619–635. doi: 10.1021/acscchembio.8b00919.
- Hay, S. I., Sinka, M. E., Okara, R. M., Kabaria, C. W., Mbithi, P. M., Tago, C. C., et al. (2010). Developing global maps of the dominant anophelid vectors of human malaria. *PLoS Med* 7. doi: 10.1371/journal.pmed.1000209.
- Hoeijmakers, W. A. M., Miao, J., Schmidt, S., Toenhake, C. G., Shrestha, S., Venhuizen, J., et al. (2019). Epigenetic reader complexes of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* 47, 11574–11588. doi: 10.1093/nar/gkz1044.
- Hulden, L., and Hulden, L. (2011). Activation of the hypnozoite: A part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. *Malar J* 10. doi: 10.1186/1475-2875-10-90.
- IPEA (2021). Vacinas contra malária podem ser desenvolvidas mais rapidamente, demonstra experiência com a covid-19. *Centro de Pesquisa em Ciência, Tecnologia e Sociedade*. Available at: <https://www.ipea.gov.br/cts/pt/central-de-conteudo/noticias/noticias/292-vacinas-contramalaria-podem-ser-desenvolvidas-mais-rapidamente-demonstra-experiencia-com-a-covid-19> [Accessed September 15, 2022].
- Iwanaga, S., Kubota, R., Nishi, T., Kamchonwongpaisan, S., Srichairatanakool, S., Shinzawa, N., et al. (2022). Genome-wide functional screening of drug-resistance genes in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 13. doi: 10.1038/s41467-022-33804-w.
- Jonscher, E., Flemming, S., Schmitt, M., Sabitzki, R., Reichard, N., Birnbaum, J., et al. (2019). PfVPS45 Is Required for Host Cell Cytosol Uptake by Malaria Blood Stage Parasites. *Cell Host Microbe* 25, 166-173.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.11.010.
- Jonsdottir, T. K., Gabriela, M., Crabb, B. S., F. de Koning-Ward, T., and Gilson, P. R. (2021). Defining the Essential Exportome of the Malaria Parasite. *Trends Parasitol* 37, 664–675. doi: 10.1016/j.pt.2021.04.009.
- Ke, H., Ganesan, S. M., Dass, S., Morrissey, J. M., Pou, S., Nilsen, A., et al. (2019). Mitochondrial type II NADH dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* (PfNDH2) is dispensable in the asexual blood stages. *PLoS One* 14. doi: 10.1371/journal.pone.0214023.
- Ke, H., Morrissey, J. M., Ganesan, S. M., Painter, H. J., Mather, M. W., and Vaidya, A. B. (2011). Variation among *Plasmodium falciparum* strains in their reliance on mitochondrial electron transport chain function. *Eukaryot Cell* 10, 1053–1061. doi: 10.1128/EC.05049-11.
- Kehr, S., Sturm, N., Rahlfs, S., Przyborski, J. M., and Becker, K. (2010). Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites. *PLoS Pathog* 6. doi: 10.1371/journal.ppat.1001242.

- Kim, D. I., Cutler, J. A., Na, C. H., Reckel, S., Renuse, S., Madugundu, A. K., et al. (2018). BioSITE: A Method for Direct Detection and Quantitation of Site-Specific Biotinylation. *J Proteome Res* 17, 759–769. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00775.
- Kimmel, J., Kehrer, J., Frischknecht, F., and Spielmann, T. (2021). Proximity-dependent biotinylation approaches to study apicomplexan biology. *Mol Microbiol*. doi: 10.1111/mmi.14815.
- Klokouzas, A., Shahi, S., Hladky, S. B., Barrand, M. A., and Van Veen, H. W. (2003). ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *Int J Antimicrob Agents* 22, 301–317. doi: 10.1016/S0924-8579(03)00210-3.
- Koenderink, J. B., Kavishe, R. A., Rijpma, S. R., and Russel, F. G. M. (2010). The ABCs of multidrug resistance in malaria. *Trends Parasitol* 26, 440–446. doi: 10.1016/j.pt.2010.05.002.
- Korkor, C. M., Garnie, L. F., Amod, L., Egan, T. J., and Chibale, K. (2020). Intrinsic fluorescence properties of antimalarial pyrido[1,2-: A] benzimidazoles facilitate subcellular accumulation and mechanistic studies in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Org Biomol Chem* 18, 8668–8676. doi: 10.1039/d0ob01730b.
- Kramer, K. J., Kan, S. C., and Siddiqui, W. A. (1982). Concentration of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by density gradient centrifugation in Percoll. *J Parasitol* 68, 336–337. doi: 10.2307/3281203.
- Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K., et al. (2015). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods* 12, 51–54. doi: 10.1038/nmeth.3179.
- Lamb, I. M., Rios, K. T., Shukla, A., Ahiya, A. I., Morrissey, J., Mell, J. C., et al. (2022a). Mitochondrially targeted proximity biotinylation and proteomic analysis in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 17. doi: 10.1371/journal.pone.0273357.
- Lamb, I. M., Rios, K. T., Shukla, A., Ahiya, A. I., Morrissey, J., Mell, J. C., et al. (2022b). Mitochondrially targeted proximity biotinylation and proteomic analysis in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 17. doi: 10.1371/journal.pone.0273357.
- Lambros, C., and Vanderberg, J. P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. Available at: <https://www.jstor.org/stable/3280287?seq=1&cid=pdf->.
- Laurens, M. B. (2019). RTS,S/AS01 vaccine (MosquirixTM): an overview. *Hum Vaccin Immunother*. doi: 10.1080/21645515.2019.1669415.
- Lee, S. Y., Kang, M. G., Park, J. S., Lee, G., Ting, A. Y., and Rhee, H. W. (2016). APEX Fingerprinting Reveals the Subcellular Localization of Proteins of Interest. *Cell Rep* 15, 1837–1847. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.064.
- Lévêque, M. F., Berry, L., Cipriano, M. J., Nguyen, H. M., Striepen, B., and Besteiro, S. (2015). Autophagy-related protein ATG8 has a noncanonical function for apicoplast inheritance in *Toxoplasma gondii*. *mBio* 6. doi: 10.1128/mBio.01446-15.

- Liffner, B., Balbin, J. M., Wichers, J. S., Gilberger, T. W., and Wilson, D. W. (2021). The Ins and Outs of Plasmodium Rhoptries, Focusing on the Cytosolic Side. *Trends Parasitol* 37, 638–650. doi: 10.1016/j.pt.2021.03.006.
- Lim, L., Linka, M., Mullin, K. A., Weber, A. P. M., and McFadden, G. I. (2010). The carbon and energy sources of the non-photosynthetic plastid in the malaria parasite. *FEBS Lett* 584, 549–554. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.097.
- Lim, L., and McFadden, G. I. (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 749–763. doi: 10.1098/rstb.2009.0273.
- Lobingier, B. T., Hüttenhain, R., Eichel, K., Miller, K. B., Ting, A. Y., von Zastrow, M., et al. (2017a). An Approach to Spatiotemporally Resolve Protein Interaction Networks in Living Cells. *Cell* 169, 350-360.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.022.
- Lobingier, B. T., Hüttenhain, R., Eichel, K., Miller, K. B., Ting, A. Y., von Zastrow, M., et al. (2017b). An Approach to Spatiotemporally Resolve Protein Interaction Networks in Living Cells. *Cell* 169, 350-360.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.022.
- MacRae, J. I., Dixon, M. W. A., Dearnley, M. K., Chua, H. H., Chambers, J. M., Kenny, S., et al. (2013). Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Biol* 11. doi: 10.1186/1741-7007-11-67.
- Mahajan, B., Noiva, R., Yadava, A., Zheng, H., Majam, V., Mohan, K. V. K., et al. (2006). Protein disulfide isomerase assisted protein folding in malaria parasites. *Int J Parasitol* 36, 1037–1048. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.04.012.
- Malaria Vaccine Funders Group (2013). Malaria Vaccine Technology Roadmap. Available at: <http://bit.ly/1hdPaS4>.
- Martell, J. D., Deerinck, T. J., Sancak, Y., Poulos, T. L., Mootha, V. K., Sosinsky, G. E., et al. (2012). Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nat Biotechnol* 30, 1143–1148. doi: 10.1038/nbt.2375.
- Mather, M. W., Darrouzet, E., Valkova-Valchanova, M., Cooley, J. W., McIntosht, M. T., Daldal, F., et al. (2005). Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug atovaquone using a bacterial system. *Journal of Biological Chemistry* 280, 27458–27465. doi: 10.1074/jbc.M502319200.
- Mather, M. W., and Vaidya, A. B. (2008). Mitochondria in malaria and related parasites: Ancient, diverse and streamlined. *J Bioenerg Biomembr* 40, 425–433. doi: 10.1007/s10863-008-9176-4.
- Matz, J. M., Beck, J. R., and Blackman, M. J. (2020). The parasitophorous vacuole of the blood-stage malaria parasite. *Nat Rev Microbiol* 18, 379–391. doi: 10.1038/s41579-019-0321-3.
- Maude, R. J., Nguon, C., Dondorp, A. M., White, L. J., and White, N. J. (2014). The diminishing returns of atovaquone-proguanil for elimination of *Plasmodium*

- falciparum malaria: Modelling mass drug administration and treatment. *Malar J* 13. doi: 10.1186/1475-2875-13-380.
- McFadden, G. I., Munholland, M. E. R. J., and Lang-Unnasch, N. (1996). Plastid in human parasites. *Nature* 381, 482.
- Milner, D. A. (2018). Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8. doi: 10.1101/cshperspect.a025569.
- Molina-Cruz, A., Zilversmit, M. M., Neafsey, D. E., Hartl, D. L., and Barillas-Mury, C. (2016). Mosquito Vectors and the Globalization of Plasmodium falciparum Malaria. *Annu Rev Genet* 50, 447–465. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035211.
- Moorthy, V., and Binka, F. (2021). R21/Matrix-M: a second malaria vaccine? *The Lancet* 397, 1782–1783. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01065-5.
- Morano, A. A., and Dvorin, J. D. (2021). The Ringleaders: Understanding the Apicomplexan Basal Complex Through Comparison to Established Contractile Ring Systems. *Front Cell Infect Microbiol* 11. doi: 10.3389/fcimb.2021.656976.
- Mouray, E., Moutiez, M., Girault, S., Sergheraert, C., Florent, I., and Grellier, P. (2007). Biochemical properties and cellular localization of Plasmodium falciparum protein disulfide isomerase. *Biochimie* 89, 337–346. doi: 10.1016/j.biochi.2006.11.001.
- Moxon, C. A., Gibbins, M. P., McGuinness, D., Milner, D. A., and Marti, M. (2019). New Insights into Malaria Pathogenesis. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis.
- Naß, J., and Efferth, T. (2019). Development of artemisinin resistance in malaria therapy. *Pharmacol Res* 146. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104275.
- Ngufor, C., N'Guessan, R., Fagbohoun, J., Subramaniam, K., Odjo, A., Fongnikin, A., et al. (2015). Insecticide resistance profile of Anopheles gambiae from a phase II field station in Cové, southern Benin: Implications for the evaluation of novel vector control products. *Malar J* 14. doi: 10.1186/s12936-015-0981-z.
- Nixon, G. L., Pidathala, C., Shone, A. E., Antoine, T., Fisher, N., O'Neill, P. M., et al. (2013). Targeting the mitochondrial electron transport chain of Plasmodium falciparum: New strategies towards the development of improved antimalarials for the elimination era. *Future Med Chem* 5, 1573–1591. doi: 10.4155/fmc.13.121.
- Nzila, A. (2006). The past, present and future of antifolates in the treatment of Plasmodium falciparum infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 1043–1054. doi: 10.1093/jac/dkl104.
- Okada, M., Rajaram, K., Swift, R. P., Mixon, A., Maschek, J. A., Prigge, S. T., et al. (2022). Critical role for isoprenoids in apicoplast biogenesis by malaria parasites. *Elife* 11. doi: 10.7554/eLife.73208.
- Oleinikov, A. v. (2022). Malaria Parasite Plasmodium falciparum Proteins on the Surface of Infected Erythrocytes as Targets for Novel Drug Discovery. *Biochemistry (Moscow)* 87, S192–S202. doi: 10.1134/S0006297922140152.

- Oliveira, L. S. (2021). Enriquecimento de proteínas parceiras de KAHRP e mapeamento de proteínas organelares de *Plasmodium falciparum* utilizando CRISPR-Cas9, APEX2 e proteômica.
- Painter, H. J., Morrissey, J. M., Mather, M. W., and Vaidya, A. B. (2007). Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* 446, 88–91. doi: 10.1038/nature05572.
- Peel, S. A. (2001). The ABC transporter genes of *Plasmodium falciparum* and drug resistance. *Drug Resistance Updates* 4, 66–74. doi: 10.1054/drup.2001.0183.
- Penkler, G., Du Toit, F., Adams, W., Rautenbach, M., Palm, D. C., Van Niekerk, D. D., et al. (2015). Construction and validation of a detailed kinetic model of glycolysis in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Journal* 282, 1481–1511. doi: 10.1111/febs.13237.
- Pino, P., Aeby, E., Foth, B. J., Sheiner, L., Soldati, T., Schneider, A., et al. (2010). Mitochondrial translation in absence of local tRNA aminoacylation and methionyl tRNAMet formylation in Apicomplexa. *Mol Microbiol* 76, 706–718. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07128.x.
- Pontes, K. A. O., Silva, L. S., Santos, E. C., Pinheiro, A. S., Teixeira, D. E., Peruchetti, D. B., et al. (2021). Eugenol disrupts *Plasmodium falciparum* intracellular development during the erythrocytic cycle and protects against cerebral malaria. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129813.
- Prudêncio, M., Rodriguez, A., and Mota, M. M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: The *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol* 4, 849–856. doi: 10.1038/nrmicro1529.
- Ralph, S. A., van Dooren, G. G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., et al. (2004). Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol* 2, 203–216. doi: 10.1038/nrmicro843.
- Rhee, H. W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A., et al. (2013a). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science (1979)* 339, 1328–1331. doi: 10.1126/science.1230593.
- Rhee, H.-W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V., Carr, S. A., et al. (2013b). Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially Restricted Enzymatic Tagging. *Science (1979)* 339, 1328–1331. doi: 10.1126/science.1228792.
- Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., et al. (2011). Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host Microbe* 9, 9–20. doi: 10.1016/j.chom.2010.12.003.
- Rout, S., and Mahapatra, R. K. (2019). *Plasmodium falciparum*: Multidrug resistance. *Chem Biol Drug Des* 93, 737–759. doi: 10.1111/cbdd.13484.

- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 196, 801–810. doi: 10.1083/jcb.201112098.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). “Miniprep protocol,” in *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor), 57–59.
- Seidi, A., Muellner-Wong, L. S., Rajendran, E., Tjhin, E. T., Dagley, L. F., Aw, V. Y., et al. (2018). Elucidating the mitochondrial proteome of *Toxoplasma gondii* reveals the presence of a divergent cytochrome c oxidase provides a foundation for defining unique aspects of mitochondrial biology in an important phylum of parasites. doi: 10.7554/eLife.38131.001.
- Sharma, S. K., Kapoor, M., Ramya, T. N. C., Kumar, S., Kumar, G., Modak, R., et al. (2003). Identification, Characterization, and Inhibition of *Plasmodium falciparum* β -Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein Dehydratase (FabZ). *Journal of Biological Chemistry* 278, 45661–45671. doi: 10.1074/jbc.M304283200.
- Shears, M. J., Botté, C. Y., and McFadden, G. I. (2015). Fatty acid metabolism in the *Plasmodium apicoplast*: Drugs, doubts and knockouts. *Mol Biochem Parasitol* 199, 34–50. doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.03.004.
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., et al. (2012). A global map of dominant malaria vectors. Available at: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/69>.
- Srivastava, I. K., Rottenberg, H., and Vaidya, A. B. (1997). Atovaquone, a Broad Spectrum Antiparasitic Drug, Collapses Mitochondrial Membrane Potential in a Malarial Parasite*. Available at: <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>.
- Srivastava, P. N., and Mishra, S. (2022). Disrupting a *Plasmodium berghei* putative phospholipase impairs efficient egress of merozoites. *Int J Parasitol* 52, 547–558. doi: 10.1016/j.ijpara.2022.03.002.
- Swift, R. P., Elahi, R., Rajaram, K., Liu, H. B., and Prigge, S. T. (2023). The *Plasmodium falciparum* apicoplast cysteine desulfurase provides sulfur for both iron-sulfur cluster assembly and tRNA modification. *Elife* 12. doi: 10.7554/eLife.84491.
- Swift, R. P., Rajaram, K., Elahi, R., Liu, H. B., and Prigge, S. T. (2022). Roles of Ferredoxin-Dependent Proteins in the Apicoplast of *Plasmodium falciparum* Parasites. Available at: <https://journals.asm.org/journal/mbio>.
- Trager, W., and Jensen, J. B. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science (1979)* 193, 673–675. doi: 10.1126/science.781840.
- Udeshi, N. D., Pedram, K., Svinkina, T., Fereshetian, S., Myers, S. A., Aygun, O., et al. (2017). Antibodies to biotin enable large-scale detection of biotinylation sites on proteins. *Nat Methods* 14, 1167–1170. doi: 10.1038/nmeth.4465.
- Uyemura, S. A., Luo, S., Vieira, M., Moreno, S. N. J., and Docampo, R. (2004). Oxidative Phosphorylation and Rotenone-insensitive Malate- and NADH-Quinone

- Oxidoreductases in *Plasmodium yoelii yoelii* Mitochondria in Situ. *Journal of Biological Chemistry* 279, 385–393. doi: 10.1074/jbc.M307264200.
- Vaidya, A. B., and Mather, M. W. (2005). A Post-genomic View of the Mitochondrion in Malaria Parasites. Springer-Verlag.
- Van Dooren, G. G., Stimmler, L. M., and McFadden, G. I. (2006). Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev* 30, 596–630. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00027.x.
- Vaughan, A. M., O’neill, M. T., Tarun, A. S., Camargo, N., Phuong, T. M., Aly, A. S. I., et al. (2009). Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. *Cell Microbiol* 11, 506–520. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01270.x.
- Vélez-Ramírez, D. E., Shimogawa, M. M., Ray, S. S., Lopez, A., Rayatpisheh, S., Langousis, G., et al. (2021). APEX2 Proximity Proteomics Resolves Flagellum Subdomains and Identifies Flagellum Tip-Specific Proteins in *Trypanosoma brucei*. *mSphere* 6. doi: 10.1128/msphere.01090-20.
- Voleman, L., and Doležal, P. (2019). Mitochondrial dynamics in parasitic protists. *PLoS Pathog* 15. doi: 10.1371/journal.ppat.1008008.
- Waller, R. F., Ralph, S. A., Reed, M. B., Su, V., Douglas, J. D., Minnikin, D. E., et al. (2003). A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 297–301. doi: 10.1128/AAC.47.1.297-301.2003.
- Wang, L. T., Pereira, L. S., Flores-Garcia, Y., O’Connor, J., Flynn, B. J., Schön, A., et al. (2020). A Potent Anti-Malarial Human Monoclonal Antibody Targets Circumsporozoite Protein Minor Repeats and Neutralizes Sporozoites in the Liver. *Immunity* 53, 733-744.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.08.014.
- Weiss, D. J., Bertozzi-Villa, A., Rumisha, S. F., Amratia, P., Arambepola, R., Battle, K. E., et al. (2021). Indirect effects of the COVID-19 pandemic on malaria intervention coverage, morbidity, and mortality in Africa: a geospatial modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 21, 59–69. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30700-3.
- Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalerpaisarn, T., Tham, W. H., de Jong, N. W. M., Harvey, K. L., et al. (2015). Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *PLoS Pathog* 11. doi: 10.1371/journal.ppat.1004670.
- White, N. J. (2011). Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* 10. doi: 10.1186/1475-2875-10-297.
- Wickramasinghe, S. R., Inglis, K. A., Urch, J. E., Müller, S., Van Aalten, D. M. F., and Fairlamb, A. H. (2006). Kinetic, inhibition and structural studies on 3-oxoacyl-ACP reductase from *Plasmodium falciparum*, a key enzyme in fatty acid biosynthesis. *Biochemical Journal* 393, 447–457. doi: 10.1042/BJ20050832.

- Wilde, M.-L., Triglia, T., Marapana, D., Thompson, J. K., Kouzmitchev, A. A., Bullen, H. E., et al. (2019). Protein Kinase A Is Essential for Invasion of *Plasmodium falciparum* into Human Erythrocytes Downloaded from. doi: 10.1128/mBio.
- World Health Organization (2021a). Malária. *Regional Office dor Africa*. Available at: <https://www.afro.who.int/health-topics/malaria> [Accessed May 3, 2022].
- World Health Organization (2021b). Malaria: Artemisinin resistance. Available at: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/artemisinin-resistance> [Accessed May 18, 2022].
- World Health Organization (2021c). Vector Control. Available at: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/prevention/vector-control> [Accessed May 15, 2022].
- World Health Organization (2021d). WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk. Available at: <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk> [Accessed September 21, 2022].
- World Health Organization (2021e). World Malaria report 2021. Geneva.
- World Health Organization (2022a). Guideline WHO Guidelines for malaria. Available at: <http://apps.who.int/bookorders>.
- World Health Organization (2022b). Malária. *Malaria*. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> [Accessed May 2, 2022].
- World Health Organization (2022c). Malaria vaccine implementation programme.
- World Health Organization (2022d). Over 1 million African children protected by first malaria vaccine. Available at: <https://www.who.int/news/item/21-04-2022-over-1-million-african-children-protected-by-first-malaria-vaccine> [Accessed September 15, 2022].
- World Health Organization (2022e). World malaria report 2022. Available at: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme>.
- Wright, G. J., and Rayner, J. C. (2014). Plasmodium falciparum Erythrocyte Invasion: Combining Function with Immune Evasion. *PLoS Pathog* 10. doi: 10.1371/journal.ppat.1003943.
- Yam, X. Y., Niang, M., Madnani, K. G., and Preiser, P. R. (2017). Three Is a Crowd – New Insights into Rosetting in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* 33, 309–320. doi: 10.1016/j.pt.2016.12.012.
- Yeh, E., and DeRisi, J. L. (2011). Chemical rescue of malaria parasites lacking an apicoplast defines organelle function in blood-stage plasmodium falciparum. *PLoS Biol* 9. doi: 10.1371/journal.pbio.1001138.
- Yu, M., Kumar, T. R. S., Nkrumah, L. J., Coppi, A., Retzlaff, S., Li, C. D., et al. (2008). The Fatty Acid Biosynthesis Enzyme FabI Plays a Key Role in the Development of

Liver-Stage Malarial Parasites. *Cell Host Microbe* 4, 567–578. doi:
10.1016/j.chom.2008.11.001.