



Universidade de Brasília  
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular  
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas

Renata Garcia Carneiro

**Estudo do exportoma de *Plasmodium falciparum* nos estágios  
eritrocitários tardios**

Brasília  
2019

Renata Garcia Carneiro

**Estudo do exportoma de *Plasmodium falciparum* nos estágios eritrocitários tardios**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília  
2019

Ge

Garcia Carneiro, Renata

Estudo do exportoma de Plasmodium falciparum nos  
estágios eritrocitários tardios / Renata Garcia Carneiro;  
orientador Sébastien Olivier Charneau. -- Brasília, 2019.  
142 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular)  
- Universidade de Brasília, 2019.

1. Plasmodium falciparum. 2. malária. 3. exportoma. 4.  
PfPDI-8. 5. superfície. I. Olivier Charneau, Sébastien,  
orient. II. Título.

**Estudo do exportoma de *Plasmodium falciparum* nos estágios eritrocitários tardios**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Charneau  
(IB/Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão  
(IB/Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza  
(FCE/Universidade de Brasília)

---

Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti  
(IB/Universidade de Brasília)

Brasília  
2019

Dedico este trabalho a minha família.

**“We can judge our progress by the courage of our questions and the depth of our answers, our willingness to embrace what is true rather than what feels good.” Carl Sagan**

## AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrada minha gratidão a todos que de alguma forma tornaram mais rica e agradável minha caminhada.

A **Deus**, pela minha vida e pelas suas leis justas que regem a minha existência. Ao **Maestro**, por todos seus ensinamentos que me auxiliaram a suavizar minhas lutas. Aos meus pais, **Jonas e Alcione**, pelo exemplo de esforço e humildade e por me apoiarem nas minhas escolhas. A minha irmã **Lorena**, pela amizade e compreensão.

Ao meu orientador, **Sébastien Charneau**, pela oportunidade de realizar esse mestrado e por me motivar em momentos de frustração. Obrigada por todos esses anos de orientação e por me ensinar tanto sobre o parasito.

Ao **Marcos Alborghetti**, por compartilhar comigo muitos conhecimentos, pelo apoio psicológico e pela companhia alegre, mesmo nas madrugadas de experimento. Obrigada por ser um exemplo de pessoa e pesquisador. Ao **Samuel Mandacaru**, por me ajudar em absolutamente tudo, por me ensinar a “seguir meu coração” e por tornar meus momentos de bancada muito mais felizes. Aos outros membros do Grupo Malária Molecular por todo o auxílio e amizade: **Lucas, Luz Elena, Thuany, Farah, Lorena, Jhordan e Thiago**.

Ao **Nuno** por me ensinar a preparar as amostras para espectrometria de massas, por concertar tudo no laboratório e pela convivência agradável. Aos outros integrantes do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, **Jaques, Reynaldo, Hylane, Katyelle, Gislane, Isabelle e Adriano** pelos momentos de discussão científica e pela amizade. À **Naty e Bruna** pelo companheirismo e apoio desde a graduação.

Ao **Bruno**, pela compreensão nos momentos de aperto e por vir comigo nos fins de semana para o laboratório.

Ao **Prof. Wagner** por operar com tanta dedicação o Orbitrap e permitir que todos nós nos beneficiemos com seu conhecimento de proteômica. Obrigada por me ajudar nas análises por espectrometria de massas, pelas discussões e pela gentileza no trato com os alunos. Ao **Prof.**

**Carlos André** pelos conselhos sobre experimentos e sobre a vida. Obrigada por dividir sua sabedoria com todos nós! Aos outros professores do LBQP, **Consuelo, Marcelo, Mariana, Ana Flávia, Luís Henrique e Fabiane** por ajudarem a todos os alunos e pela convência agradável.

A **Profa. Izabela e Profa. Carla**, por todo conhecimento repassado e por serem exemplos de mulheres na ciência. Aos integrantes do Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro, **Camila, Prof. Flávia, Kaio, Clênia, Milene, Allan, Carol, Amanda, Natália, Marcele e Yanna** por me receberem tão bem no laboratório e por compartilharem comigo seus conhecimentos sobre biologia molecular. A **Aline e ao Pedro** por serem meus parceiros de bancada durante meus primeiros experimentos.

Ao Prof. **Philippe Grellier** por fornecer o anticorpo anti-PDI-8.

Aos membros da banca examinadora por participarem da defesa da dissertação e colaborar com a melhoria desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina - UnB pela oportunidade de realização do mestrado.

E a todos os meus amigos que não estão presentes nestas linhas, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que torceram por mim.

## **AGRADECIMENTOS AS INSTITUIÇÕES 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 pelo fornecimento de hemocomponentes, parceria indispensável para a realização de pesquisas pelo grupo Malária Molecular.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
°C	Graus célsius
<i>An. Darlingi</i>	<i>Anopheles darlingi</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BN-PAGE	<i>Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
h	Hora
HCD	<i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
IgG	Imunoglobulina G
LC-MS/MS	Cromatografia líquida combinada à espectrometria de massa em Tandem
M	Molar
m/v	Massa por volume
m/z	Relação massa carga
mA	Milliampere
Meio LB	Meio Luria Bertani
Meio LIT	Meio Liver Infusion Triptose
Meio RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
min	Minutos
Milli-Q	Água deionizada
mM	Milimolar
MVP	Membrana do Vacúolo Parasitóforo
NaCl	Cloreto de sódio
NBT/BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfato/ Nitro Blue Tetrazolina
ng	Nanograma
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium. ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial Hidrogeniônico

ppm	Parte por milhão
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SLO	Estreptolisina O ( <i>streptolysin O</i> )
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N, N, N',N'-Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tampão Tris Salino
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxí- lico
V	Volt
v/v	Volume por volume
VP	Vacúolo parasitóforo
WB	<i>Western Blotting</i>
xg	Veze força da gravidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Plasmodium ssp.</i> no hospedeiro humano. ....	19
Figura 2: Representação das localizações das proteínas exportadas. ....	28
Figura 3: Esquema representativo da lise seletiva por estreptolisina O. ....	33
Figura 4: Esquema ilustrativo do desenho experimental da fragmentação do proteoma de <i>P. falciparum</i> por estreptolisina O. ....	43
Figura 5: Vetor de expressão pET100/D-TOPO. Fonte: ThermoFisher Scientific. ....	48
Figura 6: Imagens de microscopia óptica das frações obtidas a partir da lise seletiva por estreptolisina O. ....	52
Figura 7: Diagrama de Venn das proteínas de <i>Homo sapiens</i> identificadas nas frações FC (Fração Citoplasmática), FM (Fração Membranar) e FP (Fração parasitária). ....	54
Figura 8: Gráfico representativo das anotações GO quanto a localização celular de proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i> identificadas na fração enriquecida em parasitos (FP). ....	55
Figura 9: Gráfico representativo das anotações GO quanto a localização celular de proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i> identificadas na fração enriquecida em hemácias fantasmas (FM). ....	55
Figura 10: Gráfico representativo das anotações GO quanto a localização celular de proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i> identificadas na fração enriquecida em conteúdo citoplasmático das hemácias (FC). ....	56
Figura 11: Diagrama de Venn das proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i> identificadas nas frações FC (Fração Citoplasmática), FM (Fração Membranar) e FP (Fração Parasitária). ....	57
Figura 12: Validação da presença da PfPDI-8 nas frações por <i>western blotting</i> . ....	75
Figura 13: Identificação das parceiras proteicas da PfPDI-8 por BN-BLOT. ....	78
Figura 14: Rede de interações da proteína PfPDI-8 predita pelo <i>software</i> STRING 11.0. ....	79
Figura 15: Scores de interações das proteínas com a PfPDI-8 preditos pela plataforma STRING 11.0. ....	80
Figura 16: Análise da expressão da APEX2 recombinante nas frações solúvel e insolúvel. ....	82
Figura 17: Purificação da fração solúvel da APEX2 recombinante por cromatografia de afinidade. ....	83
Figura 18: Purificação da fração solúvel da APEX2 recombinante por cromatografia por afinidade. ....	84
Figura 19: Western blotting da purificação da APEX2 recombinante. ....	85
Figura 20: Teste de atividade da APEX2. ....	86

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 As 18 proteínas identificadas apenas na fração membranares .....	57
Tabela 2 Proteínas plasmodiais da fração membranares que já foram mencionadas em outros estudos .....	58
Tabela 3 Proteínas plasmodiais da fração citoplasmática da hemácia mencionadas em outros estudos .....	72

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Morfologia e ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp.</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Diagnóstico clínico e laboratorial</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3 Controle Vetorial</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4 Tratamento</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5 Outros métodos de prevenção</b> .....	<b>24</b>
<b>1.6 Vacina</b> .....	<b>25</b>
<b>1.7 O exportoma do parasito</b> .....	<b>26</b>
<b>1.8 Métodos para estudo do exportoma</b> .....	<b>31</b>
1.8.1 Análise do subfrecionamento do exportoma por lise seletiva com estreptolisina O .	31
1.8.2 Identificação de proteínas ligadas à PDI-8 ( <i>protein disulfide isomerase 8</i> ) por BN-PAGE	34
1.8.3 Enriquecimento das proteínas de superfície por biotilação pela ascorbato peroxidase 2 .....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>38</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>39</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1 Análise do exportoma por lise seletiva com estreptolisina O</b> .....	<b>40</b>
4.1.1 Cultura in vitro de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	40
4.1.2 Sincronização com sorbitol e enriquecimento de formas velhas com percoll.....	40
4.1.3 Lise seletiva por estreptolisina O.....	40
4.1.4 Extração e digestão das proteínas .....	41
4.1.5 Dessalinização dos peptídeos .....	42
4.1.6 Análise por Espectrometria de Massas .....	42
4.1.7 Análise de dados .....	44
4.1.8 Validação da presença da PfPDI-8 nas frações por <i>Western Blotting</i> .....	44
<b>4.2 Identificação de proteínas ligadas à PDI-8 (<i>Protein Disulfide Isomerase 8</i>) por BN-PAGE</b>	<b>45</b>
4.2.1 Extração de parasitos por lise diferencial com saponina .....	45
4.2.2 Extração dos complexos proteicos e análise por BN-PAGE .....	46
4.2.3 BN-BLOT .....	46
4.2.4 Digestão das proteínas em gel .....	46
4.2.5 Aquisição dos espectros e análise dos dados .....	47

<b>4.3</b>	<b>Obtenção da APEX2 recombinante e otimização da marcação de proteínas de superfície por biotilação.....</b>	<b>47</b>
4.3.1	Expressão da APEX2 recombinante.....	47
4.3.2	<i>Western Blotting</i> das frações bacterianas .....	49
4.3.3	Purificação da APEX2 por cromatográfica de afinidade.....	49
4.3.4	Teste da marcação por biotilação mediada pela APEX2 recombinante.....	49
<b>5</b>	<b><i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Subfragmentação por lise seletiva com estreptolisina O.....</b>	<b>51</b>
5.1.1	Análise global das proteínas plasmodiais e humanas identificadas .....	51
5.1.2	As proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i> identificadas nas 3 frações, citoplasmática, de membrana eritrocitária e do parasito .....	56
5.1.3	As proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i> identificadas na fração membrana eritrocitária e na fração citoplasmática.....	57
5.1.3	PfPDI-8 é exportada até a membrana do eritrócito .....	75
<b>5.2</b>	<b>Identificação das parceiras proteicas intraparasitárias da PfPDI-8 por BN-BLOT</b>	<b>76</b>
<b>5.3</b>	<b>Marcação de proteínas por biotilação via APEX2 recombinante.....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b><i>CONCLUSÕES</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b><i>PERSPECTIVAS</i>.....</b>	<b>90</b>
	<b><i>REFERÊNCIAS</i> .....</b>	<b>91</b>
	<b><i>Anexo 1 – Sequência da APEX2 que foi clonada no vetor pET100/D-TOPO</i>.....</b>	<b>105</b>
	<b><i>Anexo 2 – Proteínas de Homo sapiens identificadas na fração parasitária</i>.....</b>	<b>106</b>
	<b><i>Anexo 3 – Proteínas de Homo sapiens identificadas na fração citoplasmática</i>.....</b>	<b>109</b>
	<b><i>Anexo 4 – Proteínas de Homo sapiens identificadas na fração membrana</i> .....</b>	<b>113</b>
	<b><i>Anexo 5 – Proteínas de Plasmodium falciparum identificadas na fração parasitária</i> .....</b>	<b>119</b>
	<b><i>Anexo 6 – Proteínas de Plasmodium falciparum identificadas na Banda 1 do BN-PAGE</i> ....</b>	<b>138</b>

## RESUMO

A malária é considerada a parasitose mais grave e o *Plasmodium falciparum* é a espécie responsável pelo maior número de mortes. O desenvolvimento de novos fármacos requer o conhecimento da biologia do parasito, das suas proteínas essenciais e de como elas interagem entre si. O *P. falciparum* exporta proteínas para a célula hospedeira que desempenham funções essenciais para o parasito e esse exportoma pode conter alvos moleculares para o desenho de novas drogas e de vacinas. Esse trabalho buscou testar estratégias inovadoras para o estudo do exportoma. A primeira estratégia otimizada foi o subfracionamento do exportoma por lise seletiva com estreptolisina O (toxina que lisa seletivamente a membrana do eritrócito) seguida de centrifugação. Na fração enriquecida de conteúdo membranar e periférico, foram identificadas proteínas conhecidas do exportoma e não se observou a presença de proteínas da membrana do vacúolo parasitóforo, o que reforça a especificidade da lise. As análises de ontologia genética demonstraram um enriquecimento de proteínas exportadas e de membrana nessa fração. Também foram identificadas muitas proteínas envolvidas com a síntese proteica, associadas ao DNA, relacionadas ao metabolismo, do citoesqueleto e chaperonas. A identificação da PfPDI-8, proteína descrita como uma chaperona que preserva as estruturas moleculares corretas de outras proteínas, na fração membranar da hemácia suscitou que ela provavelmente auxilia as proteínas recém-exportadas. Assim a presença da PfPDI-8 foi validada por *western blotting* e suas parceiras foram estudadas por BN-BLOT (BN-PAGE acoplado a *western blotting*). Observou-se que, a partir de um extrato de parasitos, a PfPDI-8 foi identificada na mesma banda que uma proteína também conhecida do retículo endoplasmático, a BIP. A segunda técnica inovadora testada foi a biotilação de proteínas pela peroxidase de ascorbato 2 (APEX2). As condições de expressão e purificação da proteína recombinante foram definidas. As análises por *western blotting* demonstraram que apenas a condição que continha todos os componentes da reação (APEX2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e biotina fenol) demonstrou marcação pela estreptavidina-HRP. Esse resultado indica a possibilidade de utilização da marcação de proteínas de superfície pela APEX2, porém essa técnica ainda requer otimizações antes de ser utilizada para esse fim. As abordagens testadas nesse estudo contribuíram para um maior conhecimento do exportoma do *P. falciparum*.

**Palavras-chaves:** *Plasmodium falciparum*, malária, exportoma, superfície celular, APEX2, estreptolisina O, PfPDI-8, BN-PAGE.

## ABSTRACT

Malaria is considered a very aggressive disease and *Plasmodium falciparum* is the specie responsible for the majority of deaths. The development of new drugs requires deep knowledge about parasite biology and about its essential proteins and how they interact with each other. *P. falciparum* exports proteins into host cell and these exported ones could be targets for drug design. In this work, we investigated new and complementary techniques to studying *P. falciparum* exportome. The first one was the fractionation of exportome by Streptolysin O selective lysis followed by strong centrifugation. Some well-known exported proteins were identified in membrane enriched fraction and components of parasitophorous vacuole membrane was not identified, it indicates specificity of Streptolysin O lysis. Gene ontology analysis demonstrated that exported and membrane proteins was enriched in membrane fraction. Some proteins involved in protein synthesis, metabolism reactions, chaperoning and cytoskeleton structure were also identified. PfpDI-8 was identified in the membrane fraction and, as a chaperone, probably refold exported proteins inside the host cell. The presence of PfpDI-8 in the fractions was confirmed by western blotting and its protein partners was studied by native blotting. It was observed that PfpDI-8 colocalized in the same band with endoplasmic reticulum resident protein BIP. The second new approach was biotinylation of surface proteins by ascorbate peroxidase 2 recombinant. Expression and purification conditions for APEX2 recombinant were defined. Activity assay demonstrated that APEX2 biotinylated other proteins. Further optimization is necessary to using APEX2 to labelling surface proteins of *P. falciparum* infected red blood cells. This work contributed to increase our knowledge of *P. falciparum* exportome.

**Key-words:** *Plasmodium falciparum*, malaria, APEX2, exportome, cell surface, APEX2, *Streptolysin O*, PfpDI-8, BN-PAGE.

## 1 INTRODUÇÃO

A malária é a uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos pela picada do mosquito do gênero *Anopheles*, que foi descoberta há mais de 100 anos pelo médico francês Charles Louis Laveran (COX, 2010).

Essa protozoose é considerada uma das mais graves, devido aos altos níveis de morbimortalidade e ao grande impacto econômico em países subdesenvolvidos em áreas subtropicais e tropicais do mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde aproximadamente 219 milhões de casos de malária foram reportados em 2017, causando cerca de 435.000 mortes. Acredita-se que os gastos com malária retardem o crescimento econômico anual em 1,3% em áreas endêmicas (WHO, 2018). No Brasil, no ano de 2013, foram registrados 143.549 casos de malária e 99,5% dessas ocorrências se deram na região da Amazônia Legal Brasileira (BRASIL, 2013).

O custo econômico é estimado, somente na África, em US\$ 12 bilhões por ano (WHO, 2015), o que reforça que a malária é um grande problema de saúde pública. A dificuldade em controlar essa doença se deve a vários fatores, como a complexidade do parasito (o que dificulta o desenvolvimento de fármacos e vacinas), diagnóstico desafiador, controle vetorial deficitário e a falta de promoção e prevenção em grupos de risco (ALONSO; NOOR, 2017).

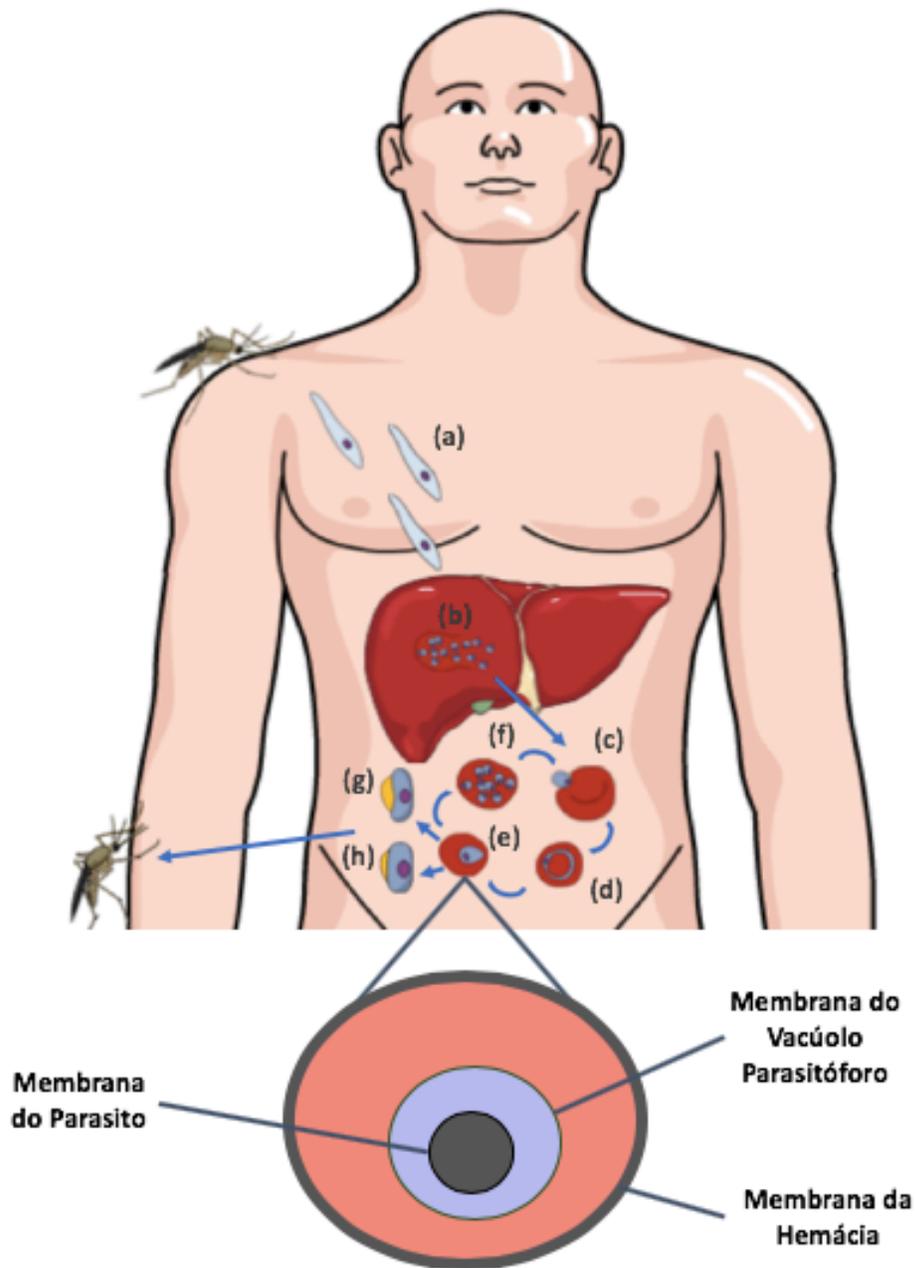
### 1.1 Morfologia e ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

As cinco espécies capazes de infectar o ser humano são: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. knowlesi*. Essas espécies se diferenciam na patogênese e na distribuição geográfica. O *P. falciparum* é o mais incidente na maioria das áreas endêmicas, com exceção da América Latina, onde o *P. vivax* é o responsável por 74.1% dos casos. A infecção por *P. falciparum* é a que leva com maior frequência os pacientes a quadros de malária complicada, apesar de que casos graves já foram descritos pela infecção por outras espécies (WHO, 2018). Uma das razões pelas quais o *P. falciparum* é tão severo é que essa espécie consegue invadir vários tipos de eritrócitos, enquanto *P. vivax* tem preferência por reticulócitos e o *P. knowlesi* e *P. malariae* parasitam hemácias maduras. O *P. vivax* e o *P. ovale* possuem a capacidade de se transformar em formas hepáticas latentes, chamadas de hipnozoítos. Essas formas podem se tornar metabolicamente ativas e induzir recaídas da doença meses ou até anos após o desaparecimento dos sintomas (BARBER *et al.*, 2015; MILLAR, SCOTT, 2015). Esse é um dos motivos pelos quais o *P. vivax* é o mais incidente no Brasil. Enquanto, casos de infecção por *P. ovale* são mais

frequentemente encontrados na região africana, os por *P. knowlesi* são mais comuns no sudeste asiático. Esse último era conhecido por infectar macacos e foi recentemente relatado como causador de malária em humanos, sendo um caso de malária zoonótica (ANTINORI *et al.*, 2013; WHO, 2018).

O ciclo de vida do plasmódio envolve uma fase sexuada no hospedeiro definitivo (o mosquito) e duas fases assexuadas no hospedeiro humano, que são: o ciclo hepático e o ciclo intraeritrocitário. A infecção se inicia através da inoculação de esporozoítos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo. Esses esporozoítos migram para o fígado, invadem hepatócitos e se multiplicam por esquizogonia. Após a maturação, os esquizontes se rompem e liberam merozoítos na corrente sanguínea, que iniciarão o ciclo intra-eritrocitário (BANNISTER *et al.*, 2000a; WHITE *et al.*, 2014; BANNISTER *et al.*, 2000b).

O ciclo intra-eritrocitário é o mais estudado, pois é responsável pelas manifestações clínicas mais importantes e porque pode ser reproduzido em cultura contínua *in vitro*. Esse ciclo se inicia quando os merozoítos invadem eritrócitos, como ilustrado na Figura 1. A invasão das hemácias requer o transporte sequencial de inúmeras proteínas das organelas secretórias envolvidas com a invasão (róptrias, micronemas e grânulos densos) para a superfície (WRIGHT; RAYNER, 2014). A penetração do parasito requer a formação da junção que funciona como um sistema de ancoragem para que o motor actina-miosina realize o movimento de entrada do parasito. Estudos demonstraram que duas proteínas se ligam e contribuem para a formação da junção: a AMA1 (*apical membrane antigen 1*), que é secretada dos micronemas e se posiciona na membrana do parasito, e a ROM4 (*rhomboid protease*), que, após secretada, migra para a superfície da hemácia (WEISS; CRABB; GILSON, 2016). Pode-se perceber que invasão das hemácias pelo plasmódio envolve um processo de penetração ativa. Após a entrada do parasito se forma um vacúolo parasitóforo (VP), onde estão contidos o lúmen do VP e o plasmódio.



**Figura 1: Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. no hospedeiro humano.** Os esporozoítos (a) invadem o fígado e se transformam em esquizontes hepáticos (b), que se rompem e liberam merozoítos responsáveis por iniciar o ciclo eritrocitário (c). Após invasão, os merozoítos se transformam respectivamente em anéis (d), trofozoítos (e) e esquizontes (f). Alguns trofozoítos se transformarão em gametócitos femininos (g) e masculinos (h). Durante a invasão eritrocitária, o parasito se desenvolve dentro do vacúolo parasitóforo.

No VP ocorre o período de crescimento vegetativo, quando o parasito passa pelas fases de anel, de trofozoítos e de esquizonte. Assim, a membrana do VP constitui uma importante interface entre o parasito e o hospedeiro e deriva, primariamente, da membrana plasmática do eritrócito, mas é rapidamente remodelada pela inserção de proteínas do parasito e mudanças da

composição lipídica (fosfolipídios), já que sua morfologia deve ser adaptada às necessidades do parasito e permitir a aquisição de nutrientes e o transporte de proteínas para a hemácia. Os grânulos densos parecem estar envolvidos no remodelamento da membrana do vacúolo parasitóforo, uma vez que essas organelas secretam a PTEX (do inglês *plasmodium translocon of exported proteins*), envolvida na exportação de proteínas para a hemácia. O vacúolo parasitóforo somente se rompe no momento da lise da célula para saída dos merozoítos formados durante a esquizogonia. A lise da célula hospedeira permite a liberação de 16 a 24 merozoítos, que irão invadir outros eritrócitos e manter o ciclo (BANNISTER *et al.*, 2000a; WHITE *et al.*, 2014; BANNISTER *et al.*, 2000b).

Alguns trofozoítos irão se diferenciar em formas sexuadas, gametócitos masculinos e femininos, que, quando ingeridos pelo mosquito, irão se desenvolver em microgametas e macrogametas no intestino do mosquito *Anopheles*. A fecundação dos gametas leva a formação do zigoto, que após divisão meiótica, dá origem a uma forma móvel haplóide denominada oocineto. O oocineto se instala no intestino e, por divisão assexuada, gera vários esporozoítos que migram até as glândulas salivares do mosquito (BANNISTER *et al.*, 2000a; WHITE *et al.*, 2014; BANNISTER *et al.*, 2000b).

## 1.2 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico laboratorial da malária pode ser realizado por 3 tipos de exames: microscopia, testes imunológicos rápidos e detecção de ácidos nucleicos. O exame microscópico do sangue pode ser feito em esfregaço espesso ou distendido. A primeira técnica favorece o encontro do parasito, posto que a concentração do sangue por campo microscópico é maior, a segunda permite uma observação mais clara da morfologia, o que facilita a identificação da espécie. Essa identificação exige experiência do laboratorista, visto que algumas espécies apresentam morfologia similar, como as formas de anel das espécies *P. knowlesi* e *P. falciparum* por exemplo (BARBER *et al.*, 2017). O exame mais específico para identificação da espécie é o de amplificação do DNA dos plasmódios usando a reação em cadeia da polimerase (PCR), porém esse tipo de exame ainda é restrito aos grandes laboratórios, em virtude do custo elevado (BRASIL, 2010).

Além dos exames por microscopia, foram criados os testes imunocromatográficos rápidos. O primeiro a ser desenvolvido foi o que utilizava anticorpos monoclonais e policlonais contra a Pf-HRP2 (do inglês, *histidine rich protein*) de *P. falciparum*. A desvantagem desse teste é a permanência da proteína Pf-HRP2 por um longo período, mesmo após o tratamento. A segunda geração de testes incluiu a detecção também da enzima desidrogenase láctica (pDHL) que é

específica para cada espécie de plasmódio e, conseqüentemente, permite a diferenciação das espécies (BRASIL, 2010). Esses testes imunológicos têm sido cada vez mais utilizados nas regiões endêmicas devido a facilidade de uso, estima-se que 75% dos diagnósticos de malária realizados na África Subsaariana foram realizados por meios desses testes em 2017 (WHO, 2018).

O diagnóstico clínico é desafiador por dois motivos: os sintomas iniciais da malária são pouco específicos e os da forma complicada são variáveis a depender do paciente e da espécie de plasmódio infectante. Os sintomas iniciais são comuns a outras doenças infecciosas: febre, mal-estar, fadiga e náuseas. A morte por malária severa pode se dar por uma ou mais das seguintes manifestações clínicas: insuficiência renal, insuficiência hepática, disfunção pulmonar, anemia aguda, acometimento do sistema nervoso central, dentre outras. A anemia e a hipoglicemia são as principais manifestações da malária complicada observadas em crianças, enquanto o edema pulmonar é mais comum em gestantes (WHITE et al., 2014).

De maneira geral, a patogênese da malária decorre de três eventos fisiopatológicos principais: a resposta inflamatória excessiva, destruição de eritrócitos e adesão de hemácias infectadas aos capilares. A ruptura dos esquizontes promove a liberação de moléculas parasitárias capazes de ativar a resposta imunológica, como GPI (glicosilfosfatidilinositol) e hemozoína. Após algum tempo de infecção, a depender da espécie de plasmódio, os parasitos se sincronizam no paciente, isso faz com que os episódios de febre sejam mais regulares, o que auxilia no diagnóstico da doença. A liberação excessiva de citocinas pode levar a hipovolemia, hipotensão e choque semelhante ao séptico, que são manifestações comuns da malária complicada (PLEWES; TURNER; DONDORP, 2018).

Além disso, algumas, citocinas pró-inflamatórias, como  $TNF\alpha$  (fator de necrose tumoral) e IFN $\gamma$  (interferon gama) podem inibir a eritropoiese. Essa inibição associada a destruição de hemácias parasitadas no baço contribuem para a aquisição de anemia nos casos graves de malária. Essas citocinas também levam a um aumento da expressão de receptores de adesão por células endoteliais, tais como CD36 (do inglês, *cluster of differentiation 36*), ICAM1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*), PECAM1 (do inglês, *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*). O *Plasmodium falciparum* possui proteínas de membrana que se ligam a esses receptores possibilitando o escape da destruição pelo baço. A ligação das hemácias parasitadas às células endoteliais leva à obstrução da microvasculatura, disfunção endotelial, edema e extravasamento de leucócitos para os tecidos. O sequestro de parasitos e os processos de

inflamação tecidual são, em parte, responsáveis pela forma mais grave de malária (GONÇALVES *et al.*, 2017).

Por outro lado, o sistema imunológico inato e adaptativo controla a parasitemia sanguínea. Por isso, as crianças são o principal grupo de risco para o desenvolvimento de malária grave, já que altas parasitemias são comuns em crianças com menos de cinco anos de idade, dado o desenvolvimento incompleto do sistema imunológico (WHITE *et al.*, 2014). Em 2017, 61% das mortes por malária ocorreram em crianças nessa faixa etária. Além disso, pacientes com coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) também possuem um risco aumentado de apresentar parasitemias altas (WHO, 2018).

### 1.3 Controle Vetorial

A malária é transmitida ao ser humano através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Existem mais de 400 espécies das quais cerca de 60 são vetores da malária, mas somente 25 são vetores importantes da doença. O *Anopheles darlingi* é a espécie mais frequente no domicílio devido a sua acentuada antropofilia e tem como criadouro grandes coleções de águas límpidas e ensolaradas. O *An. darlingi* é favorecido pelo desmatamento e formação de garimpo (KLEINSCHMIDT *et al.*, 2018; WHO, 2018).

Apesar da variedade de espécies capaz de transmitir a malária, a redução da população de mosquitos por meio do monitoramento ambiental de criadouros do inseto e do uso de inseticidas é uma medida capaz de controlar a transmissão da doença. O uso do diclorosifenilcloroetano contribuiu para a eliminação da doença em mais de 10 países durante o Programa de Erradicação Global da Malária operado pela Organização Mundial de Saúde de 1955 a 1969. As principais estratégias atuais para a controle vetorial são: o uso de redes tratadas com inseticida nas camas e pulverização residual nas casas. Contudo, a resistência generalizada a vários dos inseticidas disponíveis tem limitado essa medida de prevenção (HEMINGWAY *et al.*, 2016). Segundo a OMS, mosquitos resistentes a pelo menos uma das quatro principais classes de inseticidas (carbamatos, organofosforados, organoclorados e piretróides) podem ser encontrados em 68 dos 80 países endêmicos (WHO, 2018).

### 1.4 Tratamento

O *Plasmodium spp.* possui um ciclo de vida complexo e os estágios de vida são diferentes, quanto a morfofisiologia. Por isso, em geral, os antimaláricos têm maior ou menor eficácia a

dependem do estágio de vida do parasito. Por exemplo, primaquina tem muita atividade contra gametócitos e hipnozoítos, porém tem baixa eficácia contra esquizontes, já a mefloquina consegue eliminar bem os esquizontes e não tem atividade contra os hipnozoítos e gametócitos (LALLOO *et al.*, 2016).

Tradicionalmente, a malária tem sido tratada por quimioterapia baseada em quinolinas e quinolonas (COHEN; SARAN; YAVUZ, 2016). A descoberta do quinino, um produto natural extraído de árvores do gênero *Cinchona*, suscitou o desenvolvimento de quinolonas, como a primaquina, piperquina, mefloquina, amiodiquina e cloroquina (RUDRAPAL, 2011). A cloroquina foi por muitos anos a primeira escolha para o tratamento da malária, em razão da sua alta efetividade, do baixo custo e da baixa toxicidade. Essa droga é recomendada pelo Ministério da Saúde para o tratamento de malária por *Plasmodium vivax* no Brasil (BRASIL, 2010). Infelizmente, muitas linhagens de *Plasmodium falciparum* se tornaram resistentes a esse tratamento (WELLEMS; PLOWE, 2001). Todavia, outras quinolonas ainda hoje são utilizadas para o tratamento de malária não complicada ou como adjuvantes no tratamento de malária complicada (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015).

A crescente resistência aos fármacos existentes se tornou uma grande preocupação em 1980. A descoberta da artemisinina extraída das folhas da planta *Artemisia annua* significou uma nova esperança na luta contra a malária (BUTLER; WU, 1992). Apesar da alta efetividade e baixa toxicidade, limitações significativas têm dificultado seu uso na prática clínica. Em primeiro lugar, a extração da artemisinina a partir da sua fonte vegetal permanece a única opção prática para a obtenção da droga e esse processo envolve um alto custo de produção e flutuações na oferta, o que dificulta o acesso principalmente em áreas mais pobres. Além disso, essa droga apresenta um tempo de meia vida curto e, portanto, torna-se necessário que o tratamento seja combinado com outras drogas para evitar recrudescência (KINDERMANS *et al.*, 2007). A artemisinina apresenta ainda uma baixa solubilidade em água e em óleo, contudo essa limitação foi parcialmente contornada por meio do desenvolvimento de seus derivados semi-sintéticos, como a dihidroartemisinina, o arteméter, o arteéter e o artesunato de sódio (SRIRAM *et al.*, 2004).

A ACT (terapia combinada com artemisinina) foi considerada pela OMS a primeira linha de tratamento da malária complicada por *P. falciparum* e duas combinações são recomendadas pelo Ministério da Saúde: artemeter/lumefantrina e mefloquina/artesunato (BRASIL, 2010). No entanto, em 2008, observou-se o desenvolvimento de resistência a artemisinina na fronteira entre a Tailândia e o Camboja (NOEDL *et al.*, 2008). Atualmente, a propagação dessas linhagens

mutantes tem gerado grande preocupação, visto que podem ser encontradas também em outros países (ASHLEY *et al.*, 2014). Além disso, a resistência a artemisinina gera uma sobrecarga aos fármacos adjuvantes, induzindo também ao aumento do número de linhagens resistentes aos tratamentos tradicionais (DHORDA *et al.*, 2015).

Desde 1952, a única droga com atividade hipnozoicida é a primaquina. Essa droga é muito utilizada no Brasil para evitar recaídas por *P. vivax*, entretanto, esse tratamento apresenta duas desvantagens. A primeira é o tempo de tratamento longo, de 7 a 14 dias, conforme a recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Além disso, em indivíduos com deficiência genética na proteína glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), pode ocorrer um efeito adverso grave durante o tratamento com primaquina: a anemia hemolítica aguda (WELLS; BURROWS; BAIRD, 2010). A prevalência dessa mutação genética no Amazonas é de aproximadamente 4,5% dos habitantes (SANTANA *et al.*, 2013). Grandes esforços têm sido despendidos para a descoberta de outra droga com atividade hipnozoicida o que levou ao desenvolvimento da tafenoquina, que teve os testes clínicos finalizados em 2014 pela Glaxo Smith Kline. Apesar de apresentar também efeitos adversos graves em pacientes com deficiência na atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase, essa droga consegue eliminar os hipnozoítos com uma dose única, o que pode contribuir futuramente para a adesão dos pacientes e, conseqüentemente, a redução do número de casos de *P. vivax* no Brasil (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2014).

### **1.5 Outros métodos de prevenção**

O sucesso da implementação de controle vetorial, tratamento e diagnóstico oportunos depende de recursos humanos e materiais nos sistemas de saúde e de uma população educada e informada sobre os riscos da doença, já que adesão dos usuários as medidas de controle e prevenção é imprescindível ao sucesso da intervenção (FARQUHARSON *et al.*, 2004).

Além desses métodos de prevenção, a OMS recomenda a quimioprofilaxia de gestantes, crianças e turistas em áreas endêmicas. Com relação a prevenção da malária gestacional, é recomendado o uso de 3 doses da combinação sulfadoxina-pirimetamina. Em 2017, estima-se que somente 22% das gestantes receberam as 3 doses recomendadas. Para crianças, é recomendada uma quimioprofilaxia sazonal com amiodiquina, sulfadoxina e pirimetamina. Por último, os turistas também são um grupo de risco de desenvolver formas mais graves da malária, uma vez que eles não dispõem de anticorpos contra o parasito, como, em geral, possuem os moradores de áreas

endêmicas. Os tratamentos utilizados para quimioprofilaxia dependem do país de destino do viajante (WHO, 2018).

### 1.6 Vacina

Os residentes de áreas endêmicas adquirem uma imunidade natural à malária e sabe-se que esse processo envolve a produção de anticorpos contra várias proteínas essenciais ao parasito. Entretanto, essa proteção é adquirida lentamente e depende da permanência do indivíduo na área de alta transmissão, sendo rapidamente perdida caso ele se ausente. Após os 5 primeiros anos, a criança desenvolve uma imunidade à forma letal da doença. Atingindo a idade adulta os sintomas vão se tornando cada vez menos frequentes e os níveis de parasitos sanguíneos diminuem até atingir um platô, ou seja, a imunização estéril não é conseguida naturalmente (DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009; MARSH; KINYANJUI, 2006).

A obtenção de parasitos vivos atenuados e a produção de subunidades proteicas têm sido as duas estratégias de busca por uma vacina antimalárica e ambas se mostram muito desafiadoras. A primeira envolve um alto custo, além da dificuldade de se garantir níveis de segurança necessários à aprovação para uso em humanos. Por outro lado, a complexidade do parasito é um grande obstáculo ao desenvolvimento de vacinas de subunidades. Em primeiro lugar, o padrão de expressão gênica varia amplamente a depender do estágio de desenvolvimento. Conforme um estudo proteômico desenvolvido por Florens e colaboradores (2002), de um total de 2450 proteínas identificadas, somente 152 (6%) são expressas nos estágios presentes no hospedeiro humano. Ademais, os genes responsáveis por codificar proteínas de membrana são extremamente redundantes, são expressos sazonalmente (por um processo denominado variação gênica) e contém regiões altamente polimórficas. Essa diversidade antigênica dificulta o reconhecimento pelo sistema imune e o estabelecimento de uma resposta adaptativa (CLAESSENS *et al.*, 2014; GUIZETTI; SCHERF, 2013).

O desenvolvimento de uma vacina antimalárica baseada em parasitos atenuados tem se focado no estágio pré-eritocitário. Nos anos 70, dois estudos demonstraram que altos níveis de proteção contra *P. falciparum* poderiam ser atingidos em humanos por meio de aproximadamente 1000 picadas de mosquitos irradiados (RIECKMANN *et al.*, 1979). Esses resultados estimularam a produção, pela empresa Sanaria Inc., de esporozoítos criopreservados e atenuados por radiação para serem administrados por via intravenosa e essa vacina está atualmente em estudos de fase II (RICHIE *et al.*, 2015). Atualmente, abordagens baseadas em esporozoítos que apresentem *knock*

*out* de genes essenciais também têm sido exploradas, contudo, esses candidatos ainda estão em fases iniciais de estudo (KUBLIN *et al.*, 2017).

Grande parte das pesquisas estão direcionadas a geração de vacinas recombinante, que contém subunidades de proteínas essenciais expressas nas fases pré-eritrocitária e eritrocitária. Até o momento, a única vacina que passou por testes clínicos de fase III, denominada Mosquirix®, foi desenvolvida pela Glaxo Smith Klinem e colaboradores e tem como antígeno o peptídeo RTS,S, que corresponde a uma fusão das regiões central e C-terminal da proteína de membrana CSP (*Circumsporozoite Protein*) dos esporozoítos com o antígeno S do vírus causador da hepatite B. Apesar de já estar sendo utilizada na região africana, essa vacina demonstrou eficácia na imunização contra a malária grave durante o período de 18 meses de acompanhamento em apenas 34% das crianças e 27% dos recém-nascidos tratados, em estudos de fase III (PARTNERSHIP, 2014). O conhecimento das proteínas de superfície dos diferentes estágios de vida do parasito é essencial na busca por alvos para o desenho de vacinas recombinantes, como foi realizado para a CSP.

### **1.7 O exportoma do parasito**

Se por um lado os eritrócitos fornecem um ambiente de proteção ao plasmódio, visto que é a única célula do corpo humano que não apresenta complexo principal de histocompatibilidade ou MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*), por outro lado a hemácia é uma célula hospedeira que não realiza muitas funções, geralmente essenciais em outras células, como maquinaria de biossíntese de proteínas, ampla permeabilidade a nutrientes e tráfego intracelular. Para compensar a falta desses sistemas e adaptar a célula hospedeira às suas necessidades, o *Plasmodium falciparum* exporta cerca de 8 a 10% do seu proteoma para a hemácia. Esse conjunto de proteínas exportadas para a células hospedeira, denominado exportoma, desempenha diversas funções, como transporte de nutrientes, citoaderência, dobramento de proteínas recém exportadas e enrijecimento da célula (DE KONING-WARD *et al.*, 2016; SPILLMAN; BECK; GOLDBERG, 2015a).

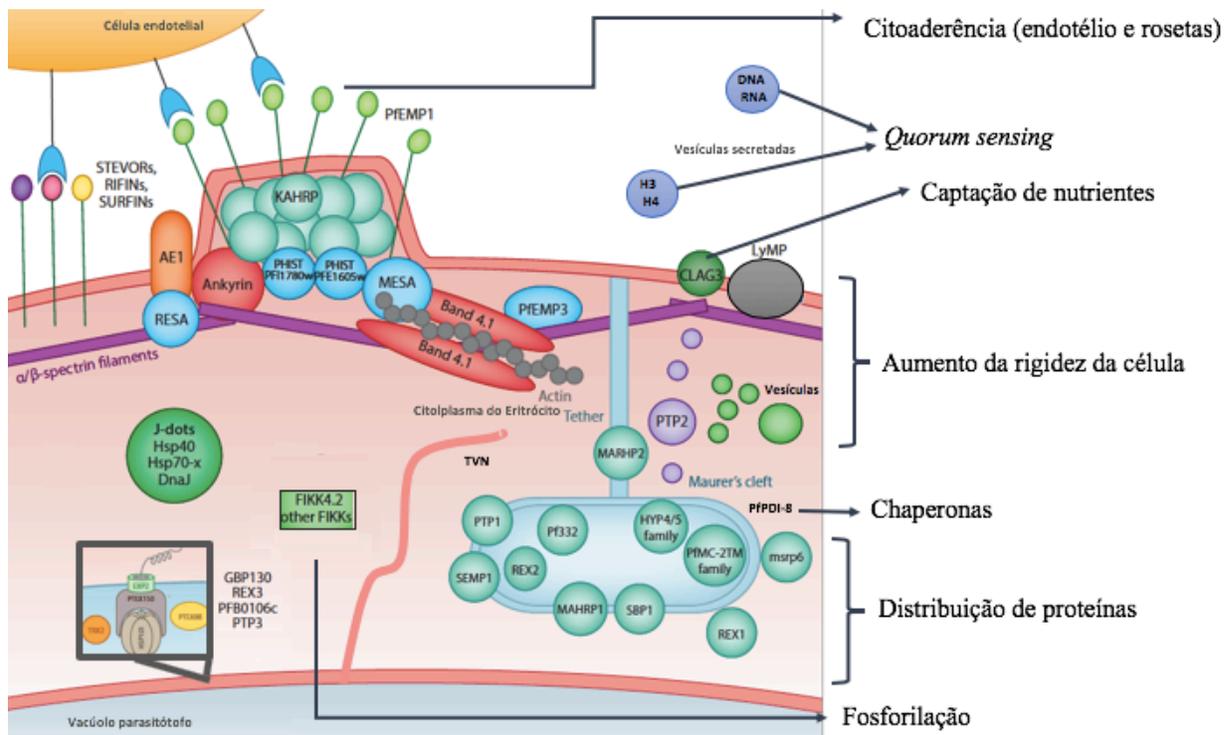
Conforme descrito na sessão anterior, o parasito no estágio intraeritrocitário se desenvolve dentro do vacúolo parasitóforo. Portanto, as proteínas exportadas ultrapassam vários obstáculos antes de atingir a hemácia. Essas são transportadas pelo retículo endoplasmático do parasito, ultrapassam a membrana plasmática do parasito, percorrem o lúmen do vacúolo parasitóforo e atravessam a membrana do vacuolo parasitóforo (MATTHEWS, PITMAN; DE KONING-WARD, 2019).

Acredita-se que a passagem pela membrana do parasito se dá por exocitose de vesículas provenientes do retículo endoplasmático. O conhecimento adquirido do exportoma do plasmódio nos permite classificar essas proteínas em dois grupos: exportadas via peptídeo sinal PEXEL (*plasmodium export element*) e PNEPs (do inglês *PEXEL-negative exported proteins*). O sinal de exportação PEXEL é composto pela sequência RxLxE/Q/D, na qual a letra x corresponde a um resíduo de aminoácido sem carga, e aproximadamente 400 proteínas (8% do proteoma predito) contêm essa sequência (GILSON *et al.*, 2016). No retículo endoplasmático ocorre a clivagem do peptídeo sinal na região após a leucina pela protease plasmepsina 5 e posterior acetilação do resíduo e acredita-se que esse processo seja essencial para a exportação de proteínas PEXEL positivas por meio de vesículas. As PNEPs comumente apresentam um domínio transmembrânico que possivelmente contém um sinal para entrada na via secretória. Observou-se que a região N-terminal também foi essencial para a exportação de algumas PNEP's, no entanto nenhum peptídeo sinal foi identificado nesse grupo. Atualmente são conhecidas aproximadamente 60 PNEP's. Ainda não foram identificadas proteínas envolvidas na clivagem de proteínas desse grupo (BODDEY; COWMAN, 2013a).

Uma vez no lúmem, as proteínas exportadas precisam ainda atravessar a membrana do VP para atingir o citoplasma da hemácia. Até o momento, o único translocon elucidado é o complexo PTEX (do inglês *Plasmodium Translocon of Exported Proteins*). As proteínas são transportadas pelo PTEX de forma desnaturada. Esse complexo envolve 5 proteínas no *P. falciparum*, sendo que 3 são essenciais para o transporte e para a sobrevivência do parasito, que são *heat shock protein 101* (HSP101), *exported protein 2* (EXP2) e PTEX150. A HSP101 é a porta de entrada do complexo e, por ser uma ATPase, sugere-se que ela funcione como um motor. A PTEX150 conecta a HSP101 a EXP2. Essa última contém um domínio transmembrânico, portanto ela funciona como o canal do complexo. A TRX2 (*Thioredoxin 2*) e a PTEX88 provavelmente participam do complexo de forma acessória e não são essenciais para a sobrevivência do parasito. Já foi sugerido que a TRX2 contribua para o desdobraimento e a PTEX88 funcione como um adaptador das proteínas a HSP101 (BECK *et al.*, 2014a; BULLEN *et al.*, 2012; ELSWORTH; CRABB; GILSON, 2014; MATTHEWS *et al.*, 2013; SANDERS *et al.*, 2019).

Após a passagem pelo poro, as proteínas exportadas sofrem renaturação antes de partirem para sua destinação final e realizarem suas funções, para isso o parasito precisa exportar chaperonas, como a HSP70x (*heat shock protein 70x*), HSP70, HSP40, dentre outras. Existem evidências da localização dessas chaperonas na membrana, no citoplasma e em estruturas

vesiculares. Depois que as proteínas ganham acesso ao citoplasma do eritrócito, elas podem seguir quatro possíveis destinos: se alojar na membrana, permanecer no citoplasma, serem transportadas para dentro de estruturas vesiculares ou serem secretadas (Figura 2) (NOLTE *et al.*, 1991; TATU, UTPAL, SINGH, BANUMATHY, 2002).



**Figura 2: Representação das localizações das proteínas exportadas.** A adesina EMP1 se aloca na superfície e é sustentada internamente pelos *knobs*, principalmente pela KAHRP. RESA interage com espectrina e MESA interage com a banda 4.1. STEVOR, SURFIN e RIFIN também são adesinas de superfície. O TVN, Maurer's Clefts e j-dots são estruturas vesiculares. Os Maurer Clefts's possivelmente também produzem vesículas (roxas). FIKK (Phe-Ile-Lys-Lys kinase), GBP (*glycophorin-binding protein*), HRPII (*histidine-rich protein 2*), KAHRP (*knob-associated histidine-rich protein*), MAHRP (*membrane-associated histidine-rich protein*), MESA (*mature parasite-infected erythrocyte surface antigen*); MRSP6 (*merozoite surface protein*), PfEMP (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein*) PfMC-2TM (*Maurer's cleft protein with two transmembrane domains*), PTP (*PfEMP-trafficking protein*, RESA (*ring-exported surface antigen*) PHIST (*Plasmodium helical interspersed subtelomeric*), REX (*ring-exported protein*), RIFINs (*repetitive interspersed family*) SBP1 (*skeletal binding protein 1*); SEMP1 (*small exported membrane protein 1*), STEVORs, (*subtelomeric variable open reading frame family*) SURFINs (*surface-associated interspersed gene family*). Representação ilustrativa adaptada de Spillman e colaboradores (2015).

Vários antígenos de superfície possuem a função de aderir os eritrócitos infectados aos vasos sanguíneos ou de mediar agregação das hemácias infectadas com outras (parasitadas ou não) para reduzir a permeabilidade a vasos de pequeno calibre, esse último processo é conhecido como formação de rosetas (ou do inglês *rosetting*). O antígeno mais estudado é o PfEMP1 (do inglês

*Erythrocyte Membrane Protein-1*), que pode estar associado aos “*knobs*” (protrusões de membrana) por meio da ligação com a proteína KAHRP (do inglês *knob-associated histidine rich protein*) ou presente em outros compartimentos do exportoma. A proteína EMP1 promove a citoaderência devido a sua capacidade de se ligar aos receptores de células endoteliais, como CD36, ICAM1 e PECAM1. O processo de variação antigênica atrelado a alta taxa de polimorfismo desse gene faz desse antígeno o principal fator de virulência do *Plasmodium falciparum*. Outras importantes famílias de antígenos de membrana foram descritas, como a RIFIN (*repetitive interspersed family*), a STEVOR (*subtelomeric variable open reading frames*) e a surfin (gene *surf*) (COWMAN; BERRY; BAUM, 2012). Assim como EMP1, surfin e STEVOR também parecem estar envolvidas na formação de rosetas (GILSON *et al.*, 2017).

O citoesqueleto das hemácias é composto por uma rede flexível de proteínas periféricas que possibilitam a deformação das células durante a passagem por pequenos vasos e a estabilidade mecânica. Os principais componentes do citoesqueleto dos eritrócitos são a espectrina  $\alpha$ , a espectrina  $\beta$ , a actina e a proteína da banda 4.1. As proteínas do parasito são capazes de se ligar a essa rede e causar a desestabilização do citoesqueleto da hemácia. O antígeno de superfície MESA (*mature parasite-infected erythrocyte surface antigen*) se liga com a banda 4.1. PfEMP3 se liga com a banda 4.1 e com espectrina  $\alpha$ . Foi descrita também a ligação do antígeno RESA (do inglês *Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen*) com a espectrina  $\beta$  e o bloqueio dessa ligação causou uma diminuição da rigidez da hemácia parasitada. O aumento da rigidez da célula foi observado após silenciamento das proteínas *glycophorin binding protein 130* (GBP130), LyMP, PTP3, PF3D7\_1301400, PF3D7\_0220100, PF3D7\_0801900, PF3D7\_1401600 e FIKK4.2, porém o mecanismo ainda não foi esclarecido (ANONG *et al.*, 2009; MAGOWAN *et al.*, 2000; MILLHOLLAND *et al.*, 2011; PARISH *et al.*, 2013a; PEI *et al.*, 2005, 2007; SALOMAO *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2013).

O eritrócito não possui estrutura para tráfego intracelular, por isso o parasito desenvolve sistemas de exomembrana e organelas dentro da célula hospedeira. Os mais estudados são os Maurer Clefts (MC's), que parecem funcionar como depósitos de proteínas exportadas. Alguns componentes dessa organela já foram elucidados, tais como SBP1 (*skeleton binding protein 1*), REX1/2 (*ring-exported protein*), MAHRP1 (*membrane-associated histidine rich protein 1*), PTP1 (PfEMP1 *trafficking protein 1*), ETRAMP (*early transcribed membrane protein*) (MUNDWILER-PACHLATKO; BECK, 2013). Nos estágios iniciais os MC's se movimentam livremente no citoplasma das hemácias, já na fase de trofozoíto essa organela fica ancorada a membrana devido

a atuação da *membrane-associated histidine-rich protein 2* (MAHRP2), que mantém os MC's ancorados a membrana. Alguns autores sugerem que os MC's funcionam semelhantemente ao Complexo de Golgi, ou seja, como um sistema de distribuição. No seu interior estão contidas muitas proteínas com domínios de  $\alpha$ -hélices estendidas, semelhantes aos da dinamina, que são capazes de fundir membranas. Além disso, ao redor dos MC's podem ser visualizadas várias pequenas vesículas (de 25 nm a 200 nm) e as proteínas PfEMP1 *trafficking protein 1* (PTP1), PfEMP1 e PfEMP3 já foram marcadas nessas estruturas em ensaios de imunofluorescência (COOKE *et al.*, 2006; MAYER *et al.*, 2012; OBERLI *et al.*, 2014; PACHLATKO *et al.*, 2010; TILLEY *et al.*, 2008).

A rede tubovesicular ou *tubovesicular network* (TVN) e os J-dots são também sistemas de exomembranas conhecidos, porém suas funções ainda não foram elucidadas. O TVN é visto em análises de microscopia eletrônica como um compartimento membranar contínuo com a membrana do vacúolo parasitóforo, no entanto a presença de um lúmen comum entre ambos ainda é controverso. Foi sugerido que o TNV participa direta ou indiretamente da captação de nutrientes, já que a inibição da sua formação reduziu a absorção desses (LAUER *et al.*, 1997). Outros estudos sugerem que a rede tubovesicular participe do transporte de fosfolipídios entre as membranas, já que foi observada alta concentração de esfingolipídeos e da proteína PF3D7\_0410000, que é envolvida no transporte de lipídeos (TAMEZ *et al.*, 2008). Os J-dots são vesículas muito móveis que são detectadas em todos os estágios intraeritrocitários. Alguns autores sugerem o envolvimento dos J-dots no dobramento de proteínas exportadas, já que foi observada a presença da HSP40 (HILLER *et al.*, 2012; MARTI *et al.*, 2010; SARGEANT *et al.*, 2006). Outros investigaram se os J-dots estão envolvidos com o transporte de colesterol entre membranas e observaram que esses compartimentos foram parcialmente destruídos após a remoção do colesterol (KÜLZER *et al.*, 2010; MAGUIRE; SHERMAN, 1990; TOKUMASU *et al.*, 2014).

As proteínas exportadas podem ainda ser secretadas para fora da célula hospedeira. Vários trabalhos que enriqueceram proteínas de membrana de estágios eritrocitários do plasmódio, identificaram histonas, como H3 e H4, no secretoma. Já foi demonstrado que o parasito secreta DNA via exossoma. Acredita-se que essas vesículas funcionam tanto como mecanismo de *quorum sensing*, quanto na modulação do sistema imune (REGEV-RUDZKI *et al.*, 2013; VEMBAR; SCHERF; SIEGEL, 2014; WU *et al.*, 2018).

## 1.8 Métodos para estudo do exportoma

Grandes têm sido os esforços para discriminar quais são as proteínas exportadas, onde elas se localizam e como elas interagem entre si, já que o exportoma pode conter alvos interessantes para o desenho de drogas (BODDEY; COWMAN, 2013a). Nesse trabalho, buscou-se otimizar novos métodos para investigar as proteínas do exportoma.

### 1.8.1 Análise do subfrecionamento do exportoma por lise seletiva com estreptolisina O

A estreptolisina O (SLO) é uma proteína hemolítica composta por 571 resíduos de aminoácidos, produzida por linhagens de *Streptococcus pyogenes* do grupo A. O tipo “O” da estreptolisina é a toxina instável ao oxigênio. Essa toxina pertence a grande família de citolisinas dependentes de colesterol e é considerada o principal fator de virulência dessas bactérias. Estudos de microscopia eletrônica mostram que essa hemolisina forma poros de aproximadamente 30 nm de diâmetro, que contém de 50 a 80 subunidades de estreptolisina O. A estrutura é composta por 4 domínios (D1, D2, D3 e D4) que estão principalmente na conformação beta. A formação do poro ocorre em quatro etapas. A primeira etapa envolve a ligação dos resíduos de triptofano do domínio D3 à hidroxila do carbono 3 do anel do colesterol. Essa ligação induz a uma mudança de conformação do peptídeo que permite a segunda fase, a oligomerização, cuja interação é mediada por grupos tiol do domínio um (D1) que realizam ligações de hidrogênio. Quando várias subunidades já foram ligadas, essa estrutura adquire uma forma de arco e, nesse momento, o oligômero se insere na membrana, formando um poro, principalmente pela interação dos resíduos hidrofóbicos da região D3 com os fosfolipídios de membrana. Após inserção na membrana, outras subunidades se unem até a formação do poro completo (RAMACHANDRAN *et al.*, 2002; ROSSJOHN *et al.*, 1997).

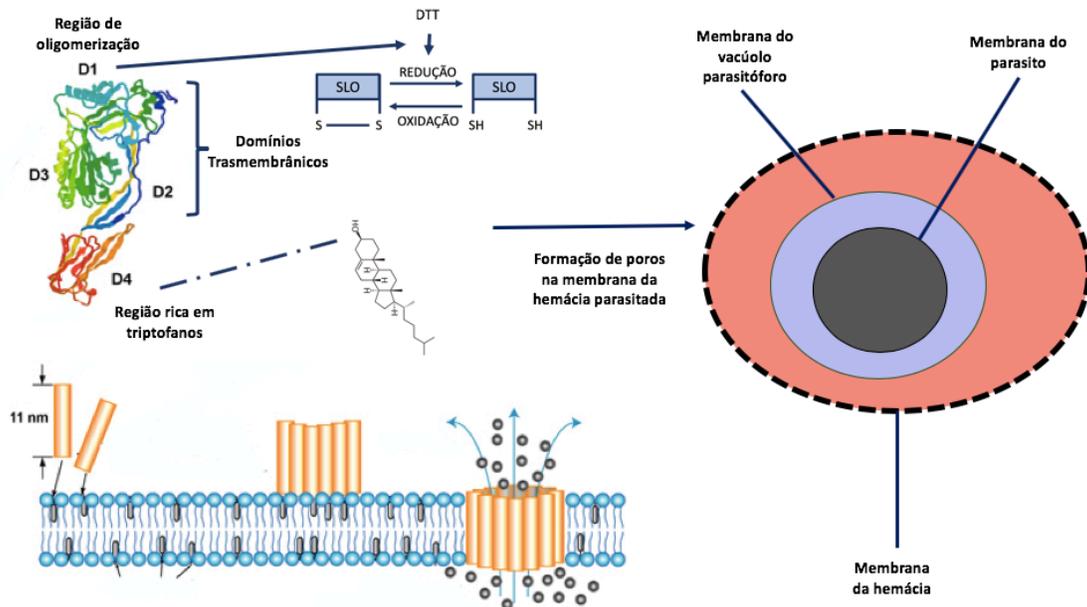
A membrana do vacúolo parasitóforo é considerada uma membrana híbrida, pois essa contém componentes do parasito e da hemácia. Desde o começo do processo de invasão, o merozoíto secreta várias proteínas que se alocam na membrana do eritrócito e após a invasão muitas proteínas são exportadas. Além disso, várias proteínas da hemácia são retiradas da membrana do vacúolo parasitóforo e da membrana do eritrócito pelo parasito (BECK *et al.*, 2014b; DLUZEWSKI *et al.*, 1989; EHMAN *et al.*, 2017b).

O conteúdo lipídico também é amplamente modificado. A membrana do eritrócito (ME) é rica em regiões denominadas *rafts*, onde se concentram grandes quantidades de colesterol. Ainda

não foi conhecida uma via de produção de colesterol no *Plasmodium falciparum*, no entanto sabe-se que esse componente é importante para o seu desenvolvimento. Portanto, o parasito precisa fazer uso do colesterol presente na membrana do eritrócito. A consequência disso é que ao longo do ciclo, o conteúdo de colesterol nas membranas é reduzido e a membrana do eritrócito é a que ainda apresenta a maior concentração de colesterol mesmo nos estágios mais tardios de desenvolvimento. Frankland e colaboradores, em 2006, observaram que a presença dos *rafts* são importantes para o tráfego da proteína EMP1.

Apesar de não ser capaz de sintetizar colesterol, o parasito produz vários tipos de fosfolipídios. A produção desses é essencial para a expansão da MVP (membrana do vacúolo parasitóforo) e da MP (membrana do parasito) para permitir o seu crescimento. Os fosfolipídios produzidos pelo parasito, principalmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, são alocados nas membranas (ME, MVP e MP). Apesar de claras evidências do intercâmbio de lipídeos entre as membranas, o mecanismo desse tráfego ainda é pouco compreendido. Existem hipóteses que esse transporte ocorre por meio de vesículas, provenientes das membranas, ou com origem nos MC's, J-dots ou TVN (SCHLEGEL, 2007; VOLONTÉ *et al.*, 2002).

Conforme abordado, a membrana dos eritrócitos é rica em colesterol, já a membrana da hemácia parasitada com *P. falciparum* apresenta cada vez menos colesterol a medida que o parasito cresce dentro da célula hospedeira. Porém, mesmo com a redução gradual da quantidade de colesterol, a membrana do eritrócito parasitado contém uma quantidade muito maior desse lipídio, quando comparada com a membrana do vacúolo parasitóforo e do parasito respectivamente. Essa diferença na concentração foi explorada em duas técnicas: permeabilização e lise seletiva com SLO e com saponina. A saponina é um detergente que lisa preferencialmente as membranas ricas em colesterol, se for utilizada uma concentração máxima de 0,5% e mantida em contato com a célula por até 5 minutos, esse detergente é capaz de lisar a membrana da hemácia parasitada e o vacúolo parasitóforo. Se for utilizada uma concentração maior ou uma incubação mais longa, a saponina pode danificar também a membrana do parasito por solubilizar outros lipídeos e fosfolipídios (KIRK *et al.*, 2005). A formação de poros pela estreptolisina O, por outro lado, é mais específica pois depende da presença do colesterol. Observa-se que mesmo em grandes concentrações da toxina, o vacúolo parasitóforo se mantém intacto (BURGHAUS; LINGELBACH, 2001), como ilustrado na Figura 3. Essa diferença entre essas duas técnicas já foi utilizada para diferenciar as proteínas exportadas das proteínas localizadas no vacúolo parasitóforo (SIAU *et al.*, 2016)

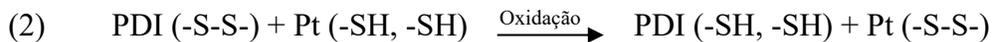
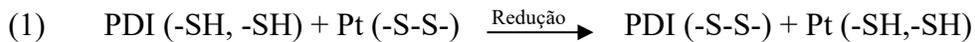


**Figura 3: Esquema representativo da lise seletiva por estreptolisina O.** Quando se estabelece a ligação do domínio 4 (D4) da SLO com a hidroxila do colesterol, ocorre uma mudança conformacional que permite a oligomerização via ligação mediada pelo domínio 1 (D1), que depende da redução do grupo tiol. Após a formação de um polímero, o complexo penetra a membrana da hemácia parasitada e forma um poro. A SLO lisa seletivamente a membrana na hemácia, pois essa contém uma quantidade maior de colesterol.

A atividade da SLO é medida em termos de unidades, sendo que cada unidade (U) equivale a quantidade necessária para lisar 50% de 50  $\mu$ L de eritrócitos não-infectados a 2% de hematócrito em PBS durante 30 min a 37°C. A porcentagem de lise é geralmente quantificada indiretamente através da medição da absorbância da hemoglobina livre na amostra. A SLO já foi utilizada em vários tipos de abordagens para o estudo da biologia do *P. falciparum*, que utilizaram número variado de unidades. Essa toxina já foi usada para permeabilizar a ME para ensaio de fluorescência, que utilizam entre 3U-6U (KUMI *et al.*, 2018; KUN *et al.*, 1997; MILANI; SCHNEIDER; TARASCHI, 2015; NIANG; YAM; PREISER, 2009). Recentemente, Brown e Guler, em 2018, perceberam que até 47U, a SLO lisa mais 99% dos eritrócitos não infectados e 40% das hemácias infectadas (acima dessa quantidade não houve lise preferencial), então eles desenvolveram um método para enriquecimento de anéis. A fim de diferenciar o conteúdo do lúmen do vacúolo parasitóforo e o exportoma em *Plasmodium yoelii*, Siau e colaboradores, em 2016, utilizaram 1600U de SLO em 100  $\mu$ L de parasitos concentrados e não observaram lise do vacúolo parasitóforo em uma incubação de 4 minutos. A partir das mesmas condições de lise, o presente estudo se propôs a separar o conteúdo membranar das hemácias fantasmas (*ghosts*) do conteúdo solúvel citoplasmático por meio de uma centrifugação a 20.000  $xg$  por 30 minutos.

### 1.8.2 Identificação de proteínas ligadas à PDI-8 (*protein disulfide isomerase 8*) por BN-PAGE

A PfPDI-8 (PF3D7\_0827900) é uma enzima pertencente a família das thioredoxinas oxireduzases, porque ela é capaz de reduzir as ligações dissulfeto, oxidar grupos tiol e catalisar a troca da posição da ligação dissulfeto (atividade de isomerase) (STOLF *et al.*, 2011). Dessa forma, essa proteína pode atuar como uma chaperona, já que é capaz de trocar a posição das ligações dissulfeto e permitir a dobra correta da proteína (Pt), conforme ilustrado abaixo.



A organização das PDI's, em geral, consiste em 5 domínios, a – b – b' – a' – c, sendo a e a' os sítios ativos (motivo de thioredoxina ou sítio de oxidoreduzase). A PDI humana apresenta 52% de identidade com a PfPDI-8 nos sítios ativos, já os outros domínios mostram aproximadamente 18% de semelhança (KEMMINK *et al.*, 1997; KLAPPA *et al.*, 1998; PIRNESKOSKI *et al.*, 2004). Em *P. falciparum*, foram descritas outras 3 PDI's que se diferem da PfPDI-8 pela ausência do sítio de atividade de oxidoreduzase e pela expressão ao longo do ciclo celular. A PfPDI-8 e a PfPDI-11 (PF3D7\_1134100) possuem os dois sítios de oxidoreduzase, já a PfPDI-9 (PF3D7\_0919400) e a PfPDI-14 (PF3D7\_0919400) possuem apenas um sítio de oxidoreduzase. Foi demonstrado por estudos proteômicos e transcriptômicos que PfPDI-8 e PfPDI-11 são expressas em todos os estágios de vida do parasito, sendo que a PfPDI-11 aparece em menor nível. A expressão da PfPDI-9 foi confirmada apenas no estágio de trofozoíto e esquizonte e a presença da PfPDI-14 foi encontrada nos estágios de esquizonte, gametócitos e esporozoítos (MAHAJAN *et al.*, 2006).

Em ensaios de imunofluorescência, a PfPDI-8 colocalizou-se com proteínas do RE, todavia essa estava presente também em menor grau no interior de vesículas localizadas no citoplasma da hemácia (MOURAY *et al.*, 2007). A PfPDI-8 atua como uma chaperona no retículo endoplasmático (RE) e pode estar envolvida com o dobramento de proteínas exportadas. A confirmação dessa hipótese requer estudo das proteínas capazes de interagir e formar complexos

com a PfPDI-8. Várias técnicas foram desenvolvidas para o estudo do interatoma de proteínas, como coimunoprecipitação, marcação por proximidade, duplo híbrido em levedura, dentre outros (EHMAN *et al.*, 2017a; ITO *et al.*, 2002; MERING *et al.*, 2002). Nesse trabalho, optou-se pela utilização da técnica de *Western Blotting* de gel nativo, utilizando como tipo de eletroforese o BN-PAGE (MANOUSSOPOULOS; TSAGRIS, 2009).

O *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (BN-PAGE) é um método de eletroforese que separa complexos proteicos. O BN-PAGE é versátil pois é realizado em um pH neutro (7,5), o pH fisiológico na maioria dos compartimentos intracelulares. Esse método também prevê o uso do corante *Coomassie Blue* (CBB G-250), adicionado no tampão catódico e à amostra antes da corrida para conferir uma carga negativa global aos complexos de proteínas e ao mesmo tempo prevenir a formação de novos complexos não fisiológicos. Esse corante pode se ligar até mesmo em proteínas de membrana (que apresentam propriedades hidrofóbicas), produz a mudança de carga global do complexo e permite a migração do tampão catódico para o tampão anódico durante a corrida do BN-PAGE. A partir da confecção do gel nativo do extrato de *P. falciparum*, o complexo ligado a PfPDI pode ser localizado pela técnica de *Western blotting* (WB) (SCHAGGER, 2000; SCHÄGGER; VON JAGOW, 1991).

### **1.8.3 Enriquecimento das proteínas de superfície por biotinição pela ascorbato peroxidase 2**

Conforme explorado na sessão 1.7, o parasito exporta várias proteínas para além do vacúolo parasitóforo com a missão de desempenhar inúmeras funções na célula hospedeira. Algumas dessas proteínas, as quais denominamos antígenos de superfície, se alocam na membrana da hemácia. É importante diferenciar quais proteínas do exportoma são antígenos de superfície, porque essas poderão ser reconhecidas pelo sistema imune, já que as hemácias não dispõem de um complexo maior de histocompatibilidade (SCHOLZEN; SAUERWEIN, 2016). Essa característica dessas proteínas faz com que elas sejam alvos interessantes para o desenvolvimento de vacinas de proteínas recombinantes, caso as mesmas sejam imunogênicas. Portanto, torna-se necessário identificar quais dos componentes do exportoma são localizadas na superfície da hemácia (BARK *et al.*, 2017; FLORENS *et al.*, 2004; FONTAINE *et al.*, 2012).

Várias técnicas de enriquecimento de proteínas de superfície foram desenvolvidas, no entanto todas elas incluem em menor ou maior grau a presença de proteínas contaminantes, que são apenas associadas internamente a membrana. A primeira estratégia, conhecida como “*shave*

*off*”, consiste em expor células intactas a soluções de proteases e analisar os peptídeos gerados por espectrometria de massas. O problema dessa técnica é que o uso das proteases causa lise em partes da membrana, o que leva a contaminação por proteínas intracelulares (ELSCHENBROICH *et al.*, 2010; MACHER; YEN, 2007). Outra técnica desenvolvida fundamenta-se na marcação química das proteínas de superfície com a biotina para a posterior captura pela estreptavidina. Foram desenvolvidos derivados da biotina acoplada a grupos reativos como o N-hidroxisucinimida (NHS), que realizam a substituição nucleofílica em resíduos de lisina, ou com o grupo maleimido, que reage com os de cisteína. Apesar de que a adição desses grupos torna a molécula de biotina mais polar e menos propensa a atravessar a membrana plasmática, proteínas intracelulares contaminantes também são detectadas, como as que compõem o citoesqueleto (QUEIROZ *et al.*, 2013) (GRIFFIN; SCHNITZER, 2011).

A APEX 1 surgiu do esforço em buscar e adaptar uma peroxidase para substituir a HRP (*horseradish peroxidase*) em ensaios de microscopia eletrônica, já que a HRP é pouco ativa em ambientes redutores e necessita de cálcio para sua ativação. Martell e colaboradores, em 2012, se dedicaram a adaptar a APX (ascorbato peroxidase da soja *Glycine max*), já que essa proteína é pequena e não contém em sua estrutura ligação dissulfeto e não requer cálcio para sua atividade. Para realizar esse intento, foram feitas duas substituições na estrutura da enzima: E112K e K14D, para tornar a enzima menos propensa a formar dímeros, criando assim a APEX1.

No mesmo ano, Roux e colaboradores (2012) utilizaram pela primeira vez a biotilação para marcar proteínas próximas, a partir da expressão de uma biotina ligase (BirA) fusionada a proteína de interesse. A partir da adição do substrato biotina, os parceiros proteicos localizados próximos eram marcados no resíduo de lisina. A maior dificuldade da técnica BioID, como foi nomeada, é que a reação deve ocorrer por 18h, o que faz com que essa técnica não possa ser usada para mapear os parceiros proteicos em momentos específicos do ciclo celular do *P. falciparum*, por exemplo. De forma simplificada, as peroxidases são enzimas que retiram um elétron do substrato e entregam ao peróxido de hidrogênio. Para que a APEX1 pudesse ser utilizada em substituição a biotina ligase para biotilar proteínas próximas, a biotina teve que ser fusionada a um grupo fenol, que pudesse doar o elétron da reação. Assim o fenol se torna um radical fenólico que pode reagir covalentemente com aminoácidos eletrofílicos, como tirosina, triptofano, histidina e cisteína. Para melhorar a atividade de marcação da APEX, o mesmo grupo realizou mais duas otimizações na estrutura para potencializar sua ligação com o grupo heme, que foram W41F e A134P (LAM *et al.*, 2015). Como a reação acontece de forma muito rápida, a biotilação por proximidade pela APEX2

pode ser utilizada para mapear proteínas de um compartimento celular e até mesmo monitorar a formação de complexos proteicos em pontos específicos do ciclo.

A técnica de biotilação pela enzima ascorbato peroxidase 2 (APEX2), portanto, foi desenvolvida para analisar interação proteína-proteína no ambiente intracelular. A APEX2 oxida a biotina-fenol em um radical fenólico que é de curta duração (<1 ms), tem um pequeno raio de marcação (< 20 nm) (KIM; ROUX, 2016). Essa técnica já contribuiu para a elucidação de vários complexos proteicos e obter um maior conhecimento sobre a função das proteínas, já que apresenta uma abordagem temporal-espacial (FIRAT-KARALAR *et al.*, 2014; MORRISWOOD *et al.*, 2013). Hung e colaboradores (2014) fusionaram o gene da APEX2 com o gene da Serina beta-lactamase e conseguiram mapear o proteoma do espaço intramembranar da mitocôndria uma vez que essa proteína é muito difundida nesse compartimento. Nesse estudo, os autores observaram que a membrana da mitocôndria foi capaz de bloquear a passagem dos radicais fenólicos. Nossa hipótese a partir desses dados é que a APEX2 poderia também ser utilizada para marcar proteínas de membrana com domínio extramembranar, já que aparentemente a enzima e os radicais fenólicos não são capazes de atravessar a bicamada lipídica. Por isso, esse trabalho buscou avaliar a possibilidade de uma nova utilização da APEX2: para marcação das proteínas de superfície.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Buscar novas abordagens para estudar o exportoma de *P. falciparum*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterização proteômica do exportoma de *P. falciparum* por lise seletiva por estreptolisina O;
- Validação da presença da PfPDI-8 (proteína dissulfeto isomerase 8) nas frações;
- Produção da APEX2 recombinante ativa no intuito de marcar, por biotinylação, as proteínas da superfície celular de hemácias parasitadas.

### 3 JUSTIFICATIVA

A humanidade caminha a passos lentos rumo a erradicação da malária. Cada vez mais fármacos e inseticidas se tornam menos eficazes devido ao desenvolvimento e proliferação de linhagens de parasitos e vetores resistentes e ainda não se sabe claramente se a nova vacina em estudos de fase III será eficiente para reduzir o número de casos de malária por *P. falciparum* por muito tempo (WHO, 2018).

O desenvolvimento de novos fármacos requer o conhecimento da biologia do parasito e dos seus pontos fracos. Diferentemente de outros organismos parasitos, que utilizam os recursos moleculares da célula hospedeira para sua proliferação, o *P. falciparum* reforma amplamente a hemácia e exporta proteínas próprias para permitir a realização de vários processos celulares. O exportoma é um subproteoma chave para o parasito, já que permite a captação de nutrientes, a sinalização extracelular, a modulação do sistema imune, a citoaderência e fuga da destruição pelo baço. Apesar do claro envolvimento do exportoma nessas funções, ainda não é claro quem são as proteínas envolvidas nesses processos, onde elas se localizam e como elas interagem entre si. Além disso, ainda não são conhecidos todos os mecanismos de exportação de proteínas para a célula hospedeira (BODDEY; COWMAN, 2013b; SPILLMAN; BECK; GOLDBERG, 2015b).

Apesar do conhecimento de algumas proteínas exportadas essenciais, ainda não se tem um conhecimento amplo de toda a complexidade do exportoma de *P. falciparum*. Uma compreensão aprofundada requer o uso de técnicas proteômicas complementares, por isso, nesse trabalho, buscou-se otimizar duas técnicas para enriquecimento de proteínas exportadas. A primeira, lise com estreptolisina O, pode se usada para fracionar as proteínas de membrana e as associadas. Já a segunda técnica, marcação com APEX2, pode contribuir no estudo de proteínas de superfície. Além dessas otimizações, as parceiras da PfPDI-8, uma proteína supostamente exportada, foram investigadas por BN-PAGE associado a *western blotting*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Análise do exportoma por lise seletiva com estreptolisina O

#### 4.1.1 Cultura in vitro de *Plasmodium falciparum*

A cultura de *P. falciparum* foi mantida segundo o método descrito por Trager e Jensen (1976). Os isolados de *P. falciparum* foram cultivados em eritrócitos humanos do tipo A+ em meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 9% de soro humano e 0,1 g/mL de hipoxantina. Os frascos foram acondicionados em estufa a 37°C gaseificada com CO<sub>2</sub>. A cultura foi mantida a 2% de hematócrito e 1% de parasitemia. A parasitemia foi monitorada mediante microscopia de esfregaços corados com o kit InstProv (New Prov., Brasil) e o hematócrito via contagem na câmara Malassez. O uso de eritrócitos e soro de doadores humanos para a cultura parasitária foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Hemocentro de Brasília.

#### 4.1.2 Sincronização com sorbitol e enriquecimento de formas velhas com percoll

Para sincronização, a cultura foi centrifugada a 800 *xg* por 5 min a 27°C e ressuspensa com 10 vezes do volume do pellet com sorbitol 5%. Após 10 minutos de incubação, as células foram lavadas com RPMI sem soro e voltadas para a cultura. Para o enriquecimento de formas velhas, a cultura foi centrifugada a 400 *xg* por 5 min a 27°C e ressuspensa com RPMI sem soro para formar um hematócrito de 40%. Aproximadamente 4 mL da cultura preparada foi colocada cuidadosamente acima de 10 mL da solução isotônica de Percoll 63% (10 ml de PBS 10x estéril adicionados a 90 ml de Percoll plus (GE Healthcare) e a 42,8 ml de RPMI sem soro, estocados a 4°C). Os tubos falcon de 10 mL foram centrifugados a 1.300 *xg*, por 11 min a 27°C, sem desaceleração. Ao término foi retirada a camada escura (de formas velhas) que se formou na interface entre a camada de Percoll e de meio RPMI (MOLL *et al.*, 2008) e a parasitemia final foi de 40%.

#### 4.1.3 Lise seletiva por estreptolisina O

O frasco de SLO de *Streptococcus pyogenes* (Sigma SAE0089-100KU) foi ressuspensa com 500 µL de PBS suplementado com 10 mM de DTT (ditiotretol), para obter-se uma concentração de 200 U/µL. Foram preparadas alíquotas de 20 µL (com a concentração de 200 U/µL) e congeladas a -80°C. Para o enriquecimento, 3 x10<sup>7</sup> células foram ressuspensa em 100

$\mu\text{L}$  de PBS (*phosphate buffer saline*, Tampão Fosfato 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,2), 12  $\mu\text{L}$  de inibidores de protease (10x) (MS-SAFE, Sigma Albrich) e 8  $\mu\text{L}$  (1.600 U) de SLO. Após 4 minutos de incubação a 37 °C, a mistura foi centrifugada a 400  $\times g$  por 5 min a 4°C para a retirada da fração parasitária (SIAU *et al.*, 2016). O sedimento de parasitos extraídos da hemácia foi lavado 3 vezes com PBS e congelado a -80°C. Ao mesmo tempo, o sobrenadante foi centrifugado a 1.000  $\times g$  por 5 min a 4°C para retirada de merozoítos que tenham sido liberados durante a lise. Para separar a fração membranar da fração citoplasmática, o sobrenadante foi centrifugado a 20.000  $\times g$ , por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi congelado a -80°C e o pellet branco foi lavado duas vezes com PBS antes do congelamento. O desenho experimental está resumido na Figura 4.

#### 4.1.4 Extração e digestão das proteínas

O sedimento da fração parasitária foi ressuspenso com 100  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e lisado com ciclos de congelamento e descongelamento. Para a desnaturação das proteínas, foram incluídos 200  $\mu\text{L}$  de solução para uma concentração final de 4 M de guanidina, 10 mM de DTT, 0,25M de Tris, pH 8,5. O sobrenadante (fração citoplasmática), que possuía o volume de aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  foi adicionada a 200  $\mu\text{L}$  de solução para uma concentração final de 4 M de guanidina, 10 mM de DTT, 0,25 M de Tris, pH 8,5. O sedimento da fração membranar foi ressuspenso com 100  $\mu\text{L}$  da solução de 6 M de guanidina, 10 mM de DTT, 0,25M de Tris, pH 8,5. As amostras foram mantidas sob incubação por 1 hora a 56°C para desnaturação das proteínas e redução das pontes dissulfeto. Para alquilação das pontes disulfeto, foi adicionada iodoacetamida para formação de uma concentração final de 50 mM de iodoacetamida, as frações foram incubadas por 45 minutos a 25°C. Antes da digestão, as frações foram diluídas quatro vezes com uma solução de 100 mM de Bicarbonato de amônia. As proteínas foram quantificadas por detecção de fluorescência pelo Qubit™ (Invitrogen). Primeiramente, preparou-se o reagente fluorescente a partir da junção de soluções de fluoróforo e tampão na proporção de 1:200. Em seguida, alíquotas de 5  $\mu\text{l}$  de amostra diluídas foram adicionadas ao reagente para atingir volume final de 200  $\mu\text{l}$ . As misturas foram incubadas por 15 min e analisadas no equipamento portátil Qubit™. Para a digestão, foi adicionada 1  $\mu\text{g}$  de tripsina modificada (Promega) para 50  $\mu\text{g}$  de proteínas na amostra. As amostras foram digeridas a 37°C por 20 horas sob agitação. Após a digestão, as amostras foram centrifugadas a 14000 G, por 10 min a 4°C para remoção do sedimento insolúvel.

#### 4.1.5 Dessalinização dos peptídeos

Os peptídeos trípticos foram dessalinizados em microcolunas de fase reversa construídas em ponteiras P200 a partir de discos de C18 Empore™ SPE (Sigma-Aldrich, USA). As microcolunas foram lavadas com 150 µL de acetonitrila 100% por meio de centrifugação a 1000 *xg* por 3 min. Para equilibrar a microcoluna, foram realizadas 3 etapas de centrifugação com 150 µL de Ácido Trifluoroacético (TFA) 0,1%. As amostras foram passadas pela coluna em uma centrifugação de 700 *xg* por 3 min e foram dessalinizadas duas vezes com 150 µL de TFA 0.1% a 2000 *xg* por 3 min. Os peptídeos foram eluídos com 20 µL de concentrações crescentes de acetonitrila (25%, 50% e 100%) em TFA 0,1% por centrifugações lentas (300 *xg* por 3 min). As frações eluídas (60 µL total) foram coletadas com tubos Eppendorf LoBind. Os peptídeos foram quantificados, liofilizados em concentrador rotatório SpeedVac™ SC100 (Savant™) e ressuspensos em TFA 0.1% para uma concentração de 0,5 µg/µL.

#### 4.1.6 Análise por Espectrometria de Massas

As amostras foram analisadas por um sistema Nano-UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific). Foram injetados 1 µg de peptídeos. Os peptídeos foram fracionados em coluna preenchida com resina Reprosil-Pur 120 C18-AQ de 1,8 µm (75 µm de diâmetro interno x 35 cm de comprimento) com fluxo de 230 nL.min<sup>-1</sup> por 200 minutos. O gradiente de eluição foi composto de 100% de fase A (ácido fórmico 0,1%) a 35% de fase B (ACN 95% v/v, ácido fórmico 0,1 % v/v) por 180 min e 35% a 90% de fase B durante 20 min. A coluna foi reequilibrada com 100% de fase A por 25 minutos ao término de cada corrida.



**Figura 4: Esquema ilustrativo do desenho experimental da fragmentação do proteoma de *P. falciparum* após tratamento por estreptolisina O.** Após enriquecimento de formas velhas com Percoll 63%,  $3 \times 10^7$  células foram ressuspendidas em 100  $\mu$ L de PBS, inibidores de protease e 8  $\mu$ L (1.600 U) de estreptolisina O (200 U/ $\mu$ L). Após 4 minutos de incubação a 37°C, a mistura foi centrifugada a 400 xg por 5 min a 4°C para a retirada da fração parasitária (P1). O pellet de parasitos foi lavado 3x com PBS (phosphate buffer saline) e congelado a -80°C. O sobrenadante foi centrifugado a 1.000 xg por 5 min a 4°C e depois a 20.000 xg, por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi congelado a -80°C e o pellet de membranas e estruturas associadas foi lavado 3x com PBS antes da estocagem a -80°C.

Após a separação por cromatografia, os peptídeos ionizados por *electrospray* (voltagem de 3.02 kV) foram analisados por MS e MS/MS no Orbitrap Elite (Thermo Scientific). Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo com aquisição de espectros de MS/MS dependente de dados (do inglês, *Data Dependent Acquisition* – DDA) usando o programa Xcalibur 2.2. Em MS1 foram obtidos espectros em alta resolução (120.000 FWHM) entre 300 – 1.650 m/z. Cada varredura foi seguida por MS2 dos 15 íons mais intensos de carga > 2 em alta resolução (150.000 FWHM) pelo método de dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD). As sequências de íons selecionadas na faixa de erro de 10ppm foram excluídas dinamicamente por 90 segundos e a janela de isolamento definida em precursores  $\geq 2$  m/z, energia de colisão normalizada a 35% e sinal mínimo de 3.000.

#### 4.1.7 Análise de dados

Os arquivos “.raw” gerados pelo equipamento foram submetidos a análise de dados nos programas PEAKS Studios 7.0 contra o banco de dados de *P. falciparum* isolado 3D7 (PlasmoDB, data de acesso: 23 de fevereiro de 2019) e contra o banco de dados de eritrócitos humano compilando na busca de proteínas “*Homo sapiens erythrocyte*” e “*Homo sapiens red blood cell*”. Os parâmetros de busca utilizados foram: digestão com tripsina modificada; tipo de fragmentação CID; correção do precursor apenas para massa; qualidade dos filtros de scan maior que 0,65; erro de massa para os fragmentos de 0,5 Da; tolerância para o erro de massa do precursor monoisotópico de 10 ppm; acetilação do N-terminal da proteína e oxidação da metionina como modificações variáveis; máximo de duas clivagens perdidas por peptídeo; uma clivagem não específica em um terminal do peptídeo e carbamidometilação dos resíduos de cisteína (alquilação com iodoacetamida) como modificação fixa. Foi habilitado o filtro FDR (*False Discovery Rate*, em inglês) menor que 1% e só foram consideradas proteínas com ao menos um peptídeo único.

#### 4.1.8 Validação da presença da PfpDI-8 nas frações por *Western Blotting*

As amostras foram obtidas conforme descrito na sessão 4.1.3. Os sedimentos de membrana e parasito foram lisados com 4 vezes do volume com tampão RIPA 1x (Tris-HCl 50 mM, pH 7, NaCl 150 mM, 0,1% m/v de SDS, 0,5% m/v de deoxicolato de sódio, 1% de Triton-X-100, *cocktail* de inibidor de proteases). A amostra de exportoma citoplasmático foi diluída duas vezes com tampão RIPA 2X. Os três lisados foram deixadas sob incubação por 30 minutos no gelo, misturadas ao tampão Laemmli 1x (2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de 2-mercaptoetanol, 0,002% de azul de bromofenol, 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8,) e fervidos por 5 minutos (LAEMMLI, 1970).

A eletroforese foi realizada em sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad), à temperatura ambiente, com amperagem de 20 mA e tampão de corrida (25 mM Tris HCl, pH 8,8, 250 mM glicina e SDS 0,1% m/v). Após separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Supported 0.45 μM, GE Healthcare). A membrana foi submersa em tampão de transferência, que continha Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v) e metanol 20% (v/v), por 10 min antes do início da transferência. Para transferência, utilizou-se o sistema resfriado de wet blotting (Bio-Rad) e uma corrente de 100 V por 1 h. Após a transferência, as bandas foram visualizadas com solução de *Ponceau* (*Ponceau S* 0,2% p/v em ácido acético 1% v/v). A membrana foi bloqueada em solução TBST *Tris buffered saline* (TBST, Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM e 0,1% de Tween 20) contendo 5% (m/v) de leite desnatado por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário Anti-PDI na diluição 1:250 em TBST e 1% (m/v) de leite desnatado por 1h30min em temperatura ambiente. Após três lavagens com TBST, a membrana foi mantida sob agitação no anticorpo secundário Anti-IgG (1:30.000) de soro de coelho acoplado a fosfatase alcalina por 1h30min. Por fim, a membrana foi lavada sete vezes com TBST e as bandas de proteínas imunorreativas foram marcadas com substrato NBT/BCIP (SigmaFast™) dissolvido em 10 mL de água Milli-Q.

## **4.2 Identificação de proteínas ligadas à PDI-8 (*Protein Disulfide Isomerase 8*) por BN-PAGE**

### **4.2.1 Extração de parasitos por lise diferencial com saponina**

A cultura de *P. falciparum* 3D7 foi mantida e sincronizada com sorbitol conforme descrito nos tópicos 4.1.1 e 4.1.2. Aproximadamente 600 mL de cultura com 2% de hematócrito e 5% de formas velhas (trofozoítos e esquizontes) foi lavada com PBS. Os parasitos foram extraídos da célula hospedeira por incubação em 10 volumes de 0,3% de saponina em PBS por 5 minutos no gelo. O *pellet* parasitário foi obtido por centrifugação a 10000 xg por 10 min a 4°C. Foram realizadas duas lavagens com PBS e uma lavagem final com PBS suplementado com *cocktail* de inibidor de proteases (MS-SAFE, Sigma Albrich). A quantidade de parasitos obtidos ao término foi  $1 \times 10^8$  parasitos (MOLL *et al.*, 2013).

#### 4.2.2 Extração dos complexos proteicos e análise por BN-PAGE

O gel do tipo BN-PAGE foi utilizado para o estudo de complexos proteicos solúveis de estágios tardios de *P. falciparum*. Para extração dos complexos proteicos, o sedimento contendo  $1 \times 10^8$  parasitos foi lisado com 200  $\mu$ L de solução de lise não desnaturante, composta por Bis-tris-HCl 20 mM pH 7,5, ácido aminocapróico 500 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, glicerol 10% e Triton x-100 0,1%. O sedimento foi ressuspendido lentamente, incubado por 30 minutos no gelo e o material insolúvel foi separado por centrifugação a 14.000 rpm por 15 min a 4°C. Foram pipetados 20  $\mu$ L de amostra nos poços do gel (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1991).

O BN-PAGE foi confeccionado com gradiente de 5 a 18% de acrilamida em tampão-base composto por 50 mM de Bis-Tris-HCL pH 7 e 500 mM de ácido aminocapróico. Para polimerização do gel foram adicionados 0,1% de TEMED e 1% de persulfato de amônio. O tampão catódico foi preparado com Tricina 50 mM; Bis-tris 15 mM/HCl, pH 7 e Commassie blue G-250 0,02%. O tampão anódico continha Bis-tris/HCl 50 mM; pH 7. A eletroforese foi realizada com uma corrente constante de 25 mA, à temperatura ambiente por 1 hora (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1991).

#### 4.2.3 BN-BLOT

Após a retirada do aparato de eletroforese, o gel foi incubado por 10 minutos no tampão de transferência contendo 25 mM Tris; 192 mM glicina, 20% metanol e 0,1% SDS. A membrana de PVDF (Sigma™, Immobilon®-P, 0,45  $\mu$ m) foi incubada em metanol por 10 minutos para ativação. Os complexos proteicos do gel nativo foram transferidos para a membrana durante uma hora em voltagem constante de 100 V. A membrana foi lavada três vezes com uma solução contendo 90% metanol e 10% ácido acético para remoção do *background* de *Comassie*. A revelação do complexo antígeno-anticorpo foi realizada conforme descrito no tópico 4.1.8.

#### 4.2.4 Digestão das proteínas em gel

As duas bandas marcadas na membrana foram cortadas do BN-PAGE e descoradas com acetonitrila (ACN). Cada banda foi lavada com 50  $\mu$ L de acetonitrila e secada no SpeedVac™ SC100 (Savant™). As fatias de gel foram incubadas em tampão de redução contendo 100 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e DTT 10 mM por 1 h a 56 °C. As pontes dissulfeto reduzidas foram alquiladas por incubação em solução contendo 100 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e 55 mM de iodoacetamida por 45 min a 25°C. As fatias foram lavadas duas vezes com 100 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e duas vezes com acetonitrila

e, em seguida, secadas no SpeedVac™ SC100 (Savant™). As bandas foram reidratadas com o tampão de digestão composto de 50 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 12,5 ng/ $\mu\text{L}$  de tripsina de grau de sequenciamento (Promega) e incubados a 37°C por 18 h. Os peptídeos tripticos foram extraídos por meio da adição de 20  $\mu\text{L}$  de solução 0,1% TFA e sonicação por 10 minutos, seguida de duas adições sucessiva de 20  $\mu\text{L}$  de solução 0,1% TFA com concentrações crescentes de acetonitrila: 50% e 80% e sonicação, para solubilização dos peptídeos mais hidrofóbicos. Os digestos foram dessalinizados e os peptídeos foram solubilizados em TFA 0.1% para uma concentração de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , conforme explicado no tópico 4.1.5.

#### **4.2.5 Aquisição dos espectros e análise dos dados**

Os peptídeos foram fragmentados por cromatografia líquida de alta resolução no sistema de cromatografia líquida UltiMate® 3000 Nano LC (Dionex) em coluna do tipo C18. A separação cromatográfica foi realizada usando eluição com 98% de fase A (ácido fórmico 0,1%) e 2% do solvente B (ACN 95% v/v, ácido fórmico 0,1 % v/v) durante 10 minutos, seguido de 25 minutos de um gradiente crescente de B 10-35% e de 10 minutos de B 90%. Os peptídeos foram eluídos da coluna analítica dentro do espectrômetro com ajuda de uma sonda nanospray. O LTQ Orbitrap Elite operou no modo Aquisição Dependente de Dados por meio do uso do programa Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific). As configurações utilizadas para aquisições dos espectros foram descritas no tópico 4.1.6.

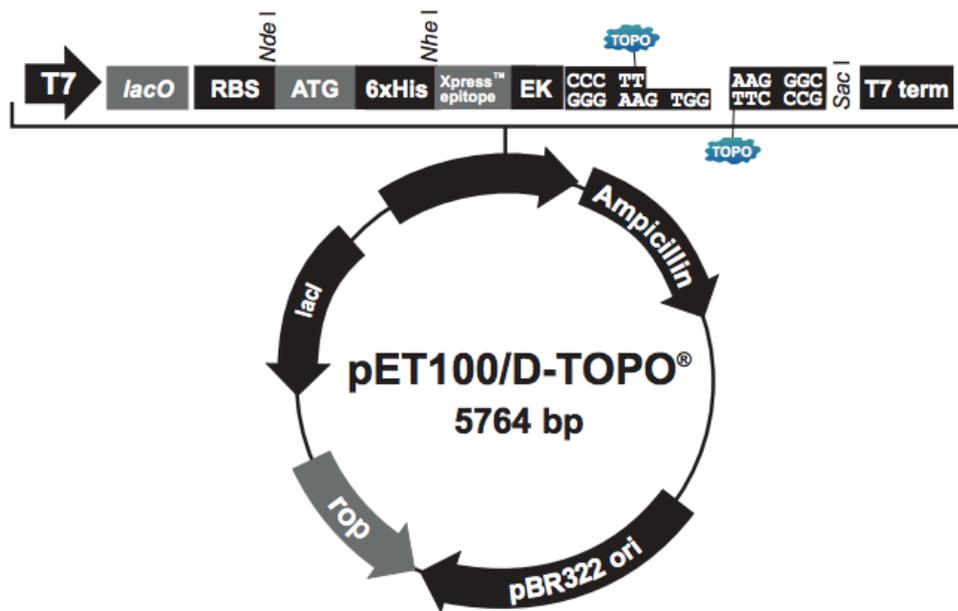
### **4.3 Obtenção da APEX2 recombinante e otimização da marcação de proteínas de superfície por biotilação**

#### **4.3.1 Expressão da APEX2 recombinante**

O gene da APEX2 foi sintetizado e clonado no vetor de expressão pET-100/D-TOPO (Novagen) pela empresa ThermoFisher, regulada pelo promotor T7 para expressão em *Escherichia coli*, a sequência da proteína está contida no Anexo 1 e o vetor está ilustrado na Figura 5. As bactérias competentes foram incubadas com 5 ng do plasmídeo por 30 min no gelo. Após esse período, foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 45 segundos e incubação no gelo por 30 min. A cultura foi deixada para crescer em 800  $\mu\text{L}$  de meio SOC a 37 °C por 1 h sob agitação de 200 rpm. Em meio LB ágar contendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina, 60  $\mu\text{L}$  da cultura foram

plaqueados. As placas foram incubadas por 16 horas na estufa a 37°C para o crescimento das colônias isoladas.

Uma colônia foi crescida em um pré-inóculo contendo 5 mL de meio LB e ampicilina (na concentração 100 µg/mL) a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm por 18 h. Após transcorrido esse período, 4 mL do pré-inóculo foram transferidos para 400 mL de LB suplementado também com ampicilina. O inóculo cresceu a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, até atingir OD600 de 0,4 a 0,5 (Leitora de microplacas Spectra-Max M5, Molecular Devices).



**Figura 5: Vetor de expressão pET100/D-TOPO. Fonte: ThermoFisher Scientific.**

A expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de duas concentrações de IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*): 1 mM e 0,5 mM. A cultura induzida com 1 mM de IPTG foi mantida sob crescimento por 3 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm, já a com 0,5 mM de IPTG foi incubada por 18 horas a temperatura ambiente e sob agitação de 200 rpm. As culturas foram centrifugadas em centrífuga CF16RXII (Hitachi) a 2.000 xg por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e as bactérias sedimentadas foram lisadas em reagente BugBuster® (Novagen) na proporção de 5 mL para cada uma grama de sedimento de bactérias. A mistura foi deixada sob agitação leve por 7 minutos em temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C para separação das frações solúvel e insolúvel.

### 4.3.2 *Western Blotting* das frações bacterianas

As frações solúvel e insolúvel foram fervidas por 5 minutos em tampão Laemmli para desnaturação das proteínas. Do lisado obtido, 10  $\mu$ L foram aplicados no gel de 12% de acrilamida para a eletroforese do tipo SDS-PAGE.

Para verificar a expressão da APEX recombinante, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran®, 0.45, GE Healthcare) conforme o protocolo da sessão 4.1.8. A membrana foi incubada com o anticorpo primário Anti-His diluído 1:2000 em TBST e 1% (m/v) de leite desnatado por 1h30min em temperatura ambiente. Após três lavagens com TBST, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo acoplado a peroxidase HRP (*horseradish peroxidase*) diluído 1:30.000 por 1,5 h. Por fim, a membrana foi lavada sete vezes com TBST e o complexo proteína-anticorpo foi visualizado pela adição do substrato quimioluminescente (ECL™ Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

### 4.3.3 Purificação da APEX2 por cromatográfica de afinidade

Após a confirmação da expressão da APEX recombinante nas frações solúveis via *Western blotting*. O lisado bacteriano foi submetido a purificação por cromatografia de afinidade em resina His-Bind (Sigma) carregada com níquel. Antes da passagem do lisado, 500  $\mu$ L da resina foram depositados na coluna e o conteúdo foi equilibrado com o tampão-base (Tris-HCl 50 mM pH 8 e NaCl 500 mM). O extrato foi passado na velocidade de 0,6 mL/min. A coluna foi lavada com 30 volumes de tampão-base com 5 mM de Imidazol e quatro volumes com 20 mM. As eluições foram realizadas com quatro volumes de coluna das concentrações de 50 mM, 100 mM e 200 mM. As frações obtidas da purificação foram analisadas por SDS-PAGE 12% e *western blotting*. As frações eluídas com 100 mM foram dialisadas com a membrana (Dialysis Tubing D-9402, Sigma Albrich) em PBS por 18 horas e quantificadas no aparelho Qubit 2.

### 4.3.4 Teste da marcação por biotilação mediada pela APEX2 recombinante

Para testar se a APEX2 recombinante produzida estava ativa, foi conduzido um teste de biotilação. Na condição-teste 50  $\mu$ g de APEX2 foram colocados para reagir com 500  $\mu$ M de Biotina-Fenol (BF) e 10 mM de peróxido de hidrogênio em PBS em um volume final de 2 mL. As amostras controles continham: APEX2/BF e APEX2/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 10 minutos de incubação, as

amostras foram lisadas com tampão Laemmli, fervidos por 5 minutos e submetidas a eletroforese do tipo SDS-PAGE.

Para o ensaio de *Western blotting*, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Supported 0.45, GE Healthcare). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o Streptavidina-HRP (diluição de 1:10000 em TBST, com 1% (m/v) de leite desnatado) por 1h30 em temperatura ambiente. A membrana foi lavada sete vezes com TBST e as proteínas biotinizadas foram reveladas pela adição do substrato quimioluminescente (ECL™ Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Subfragmentação por lise seletiva com estreptolisina O

#### 5.1.1 Análise global das proteínas plasmodiais e humanas identificadas

A principal técnica utilizada para enriquecer o conteúdo associado a membrana da hemácia é a lise osmótica com tampões pouco concentrados. No entanto, o uso de uma solução hipotônica pode causar também a lise do parasito ou da membrana do vacúolo parasitóforo (VINCENSINI *et al.*, 2005). Em estudos proteômicos que utilizaram esse método, foram identificadas também proteínas da membrana do vacúolo parasitóforo. No presente estudo, a SLO foi utilizada para formar poros especificamente na membrana dos eritrócitos. A SLO já foi utilizada para analisar o exportoma (SIAU *et al.*, 2016), no entanto, até o momento, nenhum estudo tentou separar por centrifugação o lisado membranar do conteúdo solúvel do citoplasma. Após a centrifugação, não somente a membrana lisada, mas também as estruturas vesiculares associadas, como Maurer Clafths (MC's) e J-dots, podem se inserir no sedimento, assim como as proteínas que não tem domínio transmembrânico, mas que indiretamente se associam a membrana, as proteínas periféricas (VIVANCOS *et al.*, 2007). Portanto, após a lise e a centrifugação, são separadas 3 frações: membranar (FM), citoplasmática (FC) e parasitária (FP), que foram analisadas por microscopia óptica. Observa-se, na Figura 6, que na fração membranar pode-se observar as hemácias fantasmas e a fração parasitária continha poucas hemácias remanescentes.

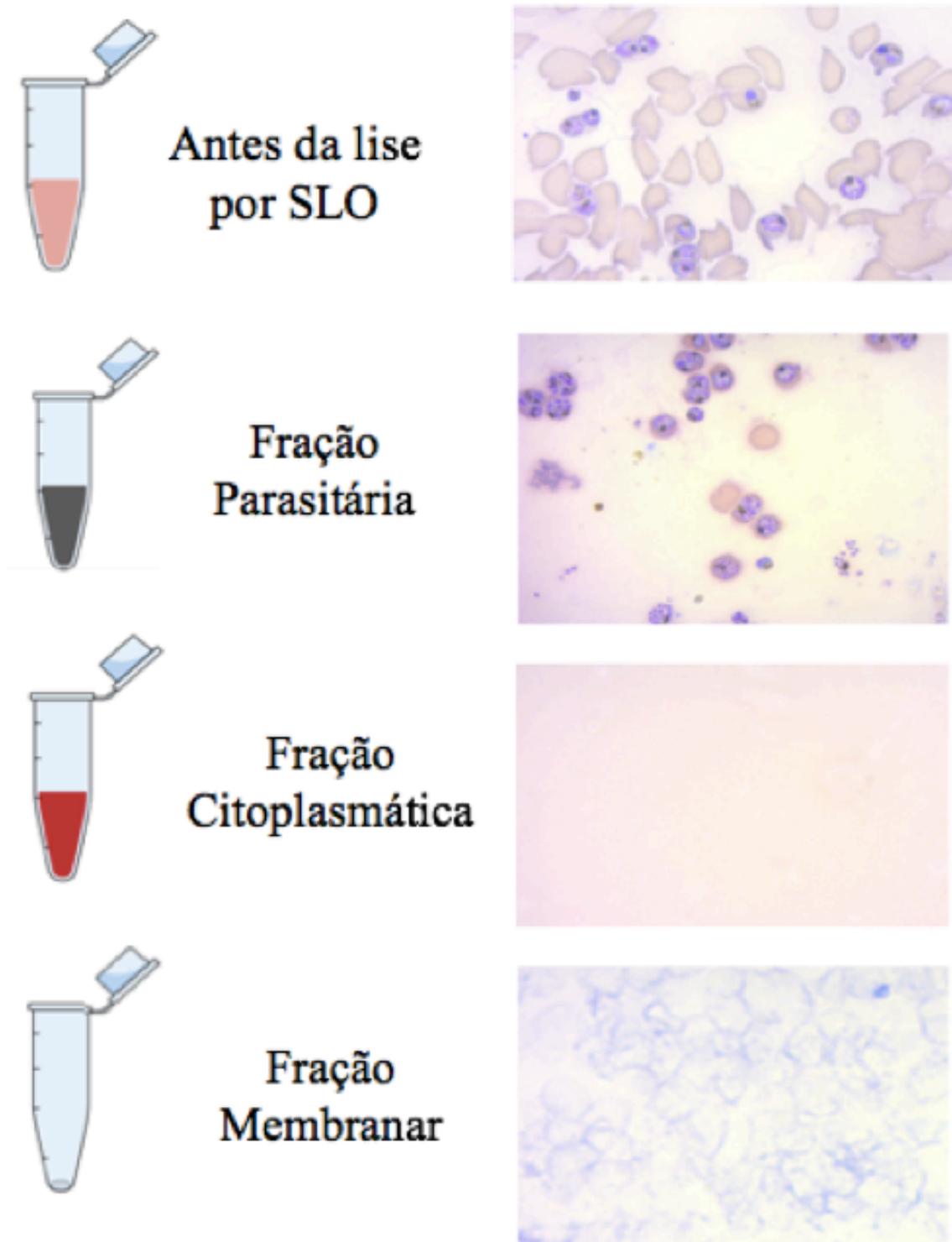
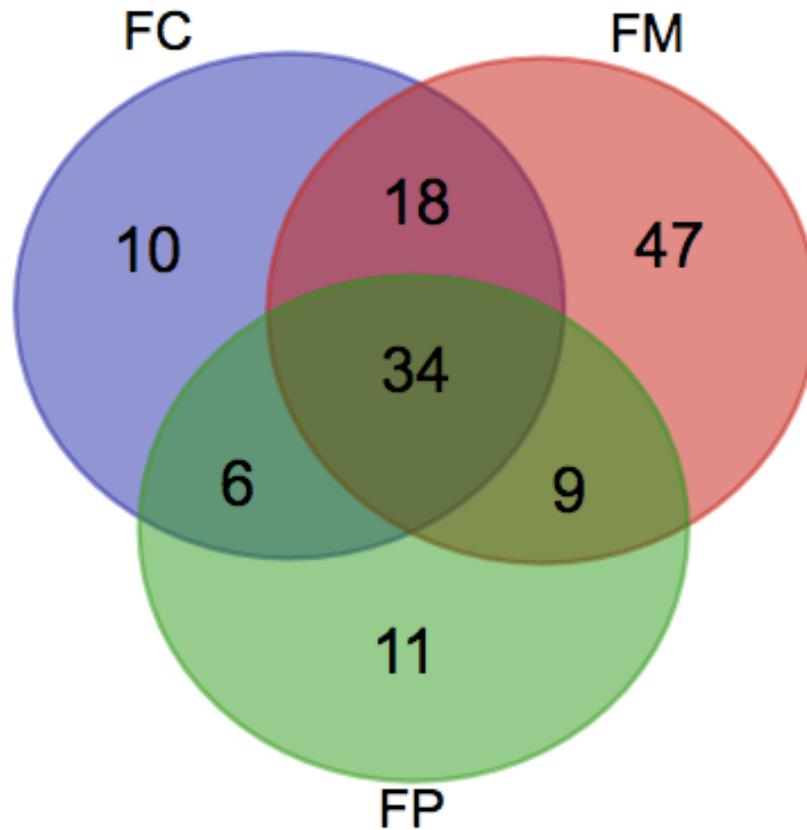


Figura 6: Imagens de microscopia óptica das frações obtidas a partir da lise seletiva por estreptolisina O.

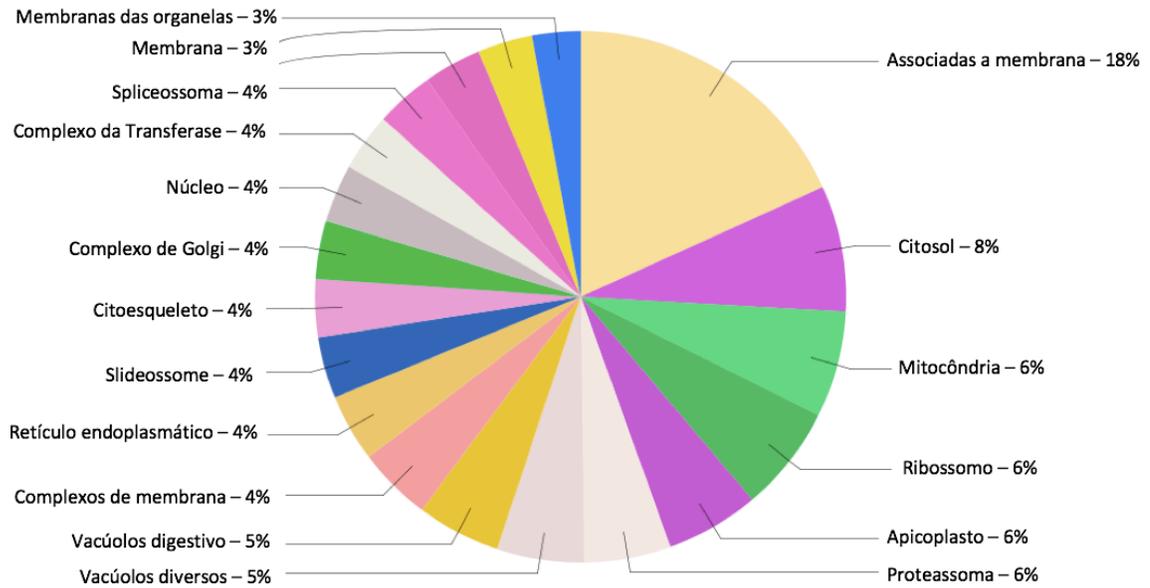
As frações foram submetidas a LC-MS/MS. Os espectros, obtidos a partir dos digestos trípticos, foram analisados pelo software PEAKS Studios 7.0 e foram comparados com o banco de dados de *P. falciparum* isolado 3D7 (Plasmodb) para identificação das proteínas parasitárias e com o banco de eritrócitos de *Homo sapiens* (UniProt), que era composto pela união das sequências fornecidos pelas buscas das palavras-chaves erythrocyte e red blood cells (no total, o banco formado continha 483 proteínas). De *P. falciparum*, foram identificadas 108 proteínas na fração membranar (FM), 21 na fração citoplasmática (FC) e 578 na fração parasitária (FP). Na análise contra o banco de *Homo sapiens* foram identificadas 108 proteínas na fração membranar, 68 na fração citoplasmática e 60 na fração parasitária. As proteínas humanas identificadas nas frações FP, FC e FM estão listadas, respectivamente, nos Anexos 2, 3 e 4, assim como as de *P. falciparum* na fração parasitária estão contidas no Anexo 5. O número de proteínas humanas identificadas em comum nas frações está representado no diagrama de Venn da Figura 7. Como esperado, foram detectadas mais proteínas de *P. falciparum* na fração parasitária. No entanto na fração membranar eritrocitária, foram identificadas o mesmo número de proteínas de 108 para ambos *P. falciparum* e *Homo sapiens*. Foram identificadas menos proteínas tanto de *Homo sapiens* quanto de *P. falciparum* na FC, isso pode ter ocorrido devido a grande quantidade de hemoglobina nessa amostra, já que o excesso de peptídeos de uma proteína pode suprimir o sinal de outros peptídeos. Alguns estudos realizaram fragmentação por SDS-PAGE para reduzir a complexidade e o conteúdo de hemoglobina das frações (SIAU *et al.*, 2016; BARK *et al.*, 2018)

Bryk e Wisniewski, em 2017, realizaram um estudo que identificou quantitativamente as proteínas das hemácias fantasmas (*ghosts*) e observaram que foram enriquecidas 10 proteínas por meio do fracionamento por lise hipotônica. Todas essas proteínas foram também identificadas na fração membranar no nosso estudo, que são: espectrina alpha e beta, banda 3, anirina, banda 4.1, banda 4.2, *Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4*, *55 kDa erythrocyte membrane protein*, *Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1* e *Ammonium transporter Rh type A*.

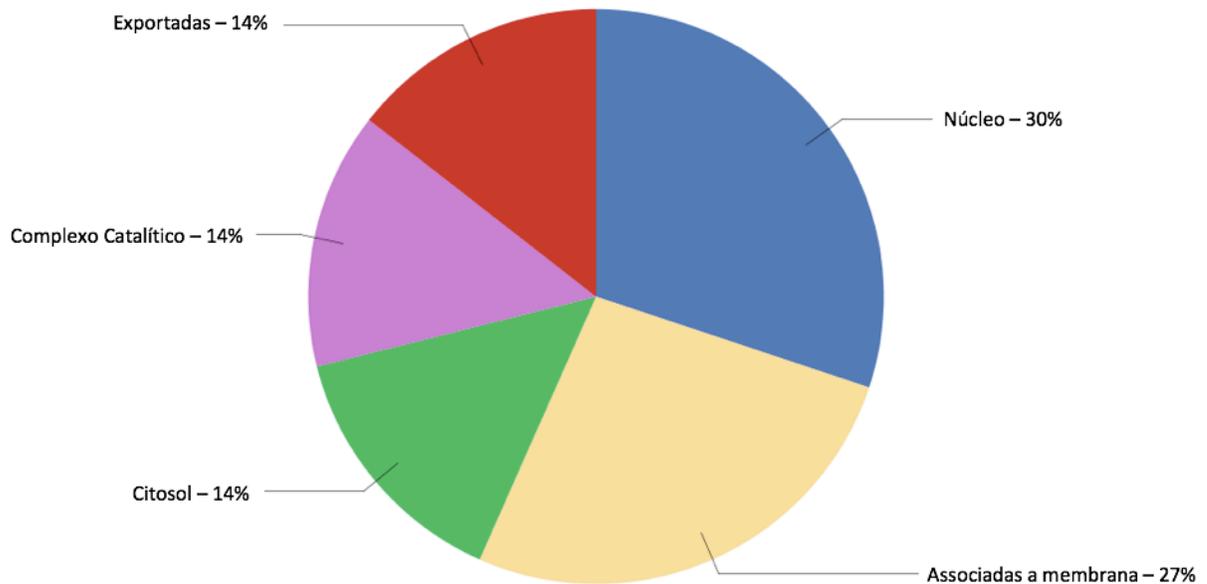


**Figura 7: Diagrama de Venn das proteínas de *Homo sapiens* identificadas nas frações FC (Fração Citoplasmática), FM (Fração Membranar) e FP (Fração parasitária).**

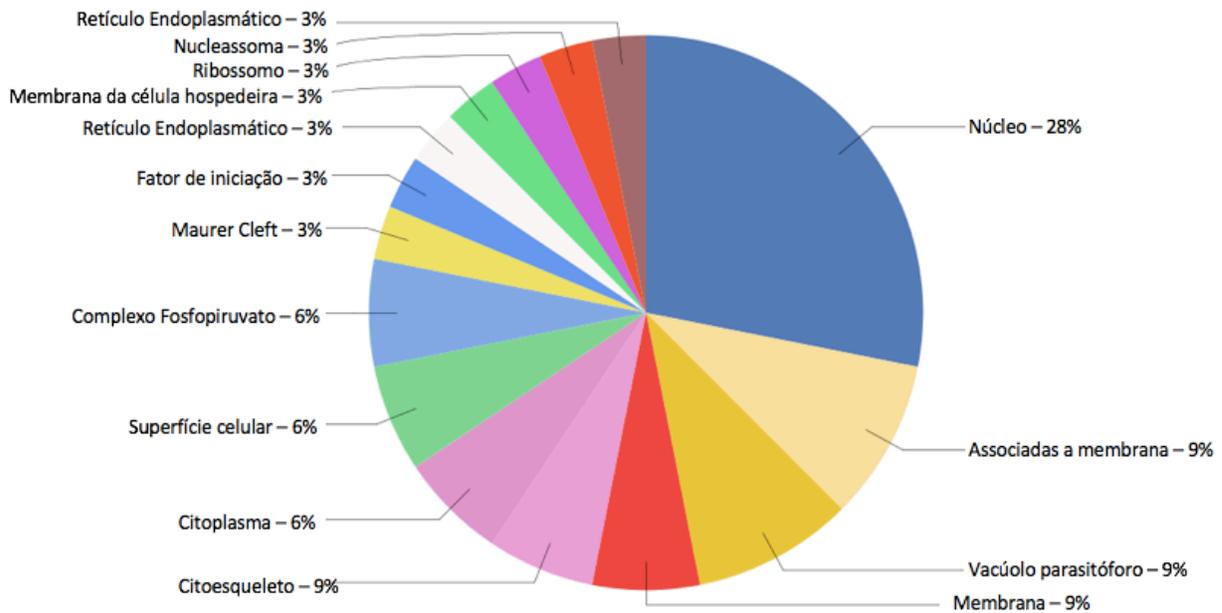
As anotações funcionais a partir de termos GO para composição celular foram buscadas pelo *software Blast2Go* e estão representadas nas Figuras 8, 9 e 10. O *Blast2Go* realiza uma busca para identificar similaridades no genoma e proteoma em diferentes espécies a fim de inferir o local e a função das proteínas, ou seja, esse programa realiza uma pesquisa *online* por sequências similares por alinhamento (blast), busca assinaturas proteicas comuns e classifica as proteínas por meio da utilização de um sistema de ontologia (ASHBURNER *et al.*, 2011; ZDOBNOV; APWEILER, 2001). As análises demonstraram que a maioria das proteínas de *P. falciparum* identificadas na fração membranar, estão alocadas no núcleo (30%) e na membrana (27%). Ademais, 14% das proteínas foram anotadas como proteínas exportadas. As frações citoplasmática e parasitária demonstraram maior variedade de localizações anotadas. Proteínas de organelas do parasito foram identificadas apenas na FP, por exemplo apicoplasto, vacúolo digestivo, complexo de Golgi e mitocôndria.



**Figura 8:** Gráfico representativo das anotações GO quanto a localização celular das 578 proteínas de *Plasmodium falciparum* identificadas na fração enriquecida em parasitos (FP) (software *Blast2go*).



**Figura 1:** Gráfico representativo das anotações GO quanto a localização celular das 108 proteínas de *Plasmodium falciparum* identificadas na fração enriquecida em hemácias fantasmas (FM) (software *Blast2go*).



**Figura 2:** Gráfico representativo das anotações GO quanto a localização celular das 21 proteínas de *Plasmodium falciparum* identificadas na fração enriquecida em conteúdo citoplasmático das hemácias (FC) (software *Blast2go*).

### 5.1.2 As proteínas de *Plasmodium falciparum* identificadas nas 3 frações, citoplasmática, de membrana eritrocitária e do parasito

A Figura 11 ilustra o grau de similaridade do perfil proteico de *P. falciparum* entre as três frações. As proteínas sintetizadas são exportadas até a membrana eritrocitária por vesículas, percorrem o vacúolo parasitóforo, trafegam pelo citoplasma da hemácia e são depositadas na membrana ou nas estruturas periféricas (SPILLMAN; BECK; GOLDBERG, 2015a). É esperado que as proteínas do exportoma se encontrem nas três frações, no entanto, a redução da complexidade da FM aliada a redução do conteúdo de hemoglobina pode contribuir na identificação de proteínas pouco abundantes nessa fração.

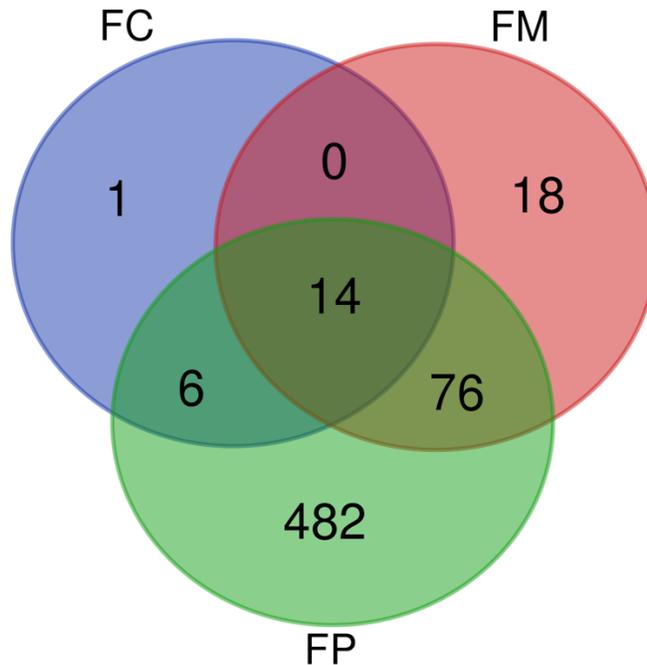


Figura 11: Diagrama de Venn das proteínas de *Plasmodium falciparum* identificadas nas frações FC (Fração Citoplasmática), FM (Fração Membranar) e FP (Fração Parasitária).

### 5.1.3 As proteínas de *Plasmodium falciparum* identificadas na fração membranar eritrocitária e na fração citoplasmática

Algumas das proteínas identificadas apenas na FM, são componentes conhecidos do exportoma, como ETRAMP (*Early transcribed membrane protein 14.1*), *Erythrocyte binding antigen-181* (EBA-181), MESA, CLAG 3.1, EMP3 e PHISTa (WARNCKE; VAKONAKIS; BECK, 2016). Além disso, 10 dentre as 18 proteínas contém domínio transmembrânico ou sinal de exportação PEXEL (Tabela 1).

**Tabela 1: As 18 proteínas identificadas apenas na fração membranar**

Plasmo ID	Descrição	Domínio TM	PEXEL
PF3D7_0102500	<i>Erythrocyte binding antigen-181</i>	S	
PF3D7_0202000	<i>Knob-associated histidine-rich protein</i>		S
PF3D7_0402000	<i>Plasmodium exported protein (PHISTa)</i>	S	S
PF3D7_0927400	<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>		
PF3D7_1361200	<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>		
PF3D7_0500800	<i>Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen</i>		S
PF3D7_1401400	<i>Early transcribed membrane protein 14.1</i>	S	
PF3D7_1211800	<i>polyubiquitin</i>		

PF3D7_0512600	<i>Ras-related protein Rab-1B</i>		
PF3D7_0601900	<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>	S	
PF3D7_0501600	<i>rhoptry-associated protein 2</i>		
PF3D7_0302500	<i>cytoadherence linked asexual protein 3.1</i>		
PF3D7_0201900	<i>erythrocyte membrane protein 3</i>	S	S
PF3D7_0729900	<i>dynein heavy chain, putative</i>		
PF3D7_0702500	<i>Plasmodium exported protein, unknown function</i>	S	S
PF3D7_0711000	<i>AAA family ATPase, CDC48 subfamily</i>	S	
PF3D7_0513800	<i>ras-related protein Rab-1A</i>		
PF3D7_1353100	<i>Plasmodium exported protein, unknown function</i>	S	S

S = sim

Na Tabela 2, estão listadas as proteínas identificadas na fração enriquecida em conteúdo membranar e estruturas associadas. Para comparação, foram selecionados trabalhos que analisaram proteínas de superfície, que enriqueceram o conteúdo das estruturas vesiculares (como j-dots e Maurer Clafits's), que realizaram análises de bioinformática para prever proteínas exportadas e que revisaram artigos de biologia molecular sobre proteínas do exportoma.

**Tabela 2** Proteínas plasmodiais da fração membranar que já foram mencionadas em outros estudos

Proteínas em comum	PlasmoID	Referências
<b>Proteínas associadas ao DNA e a síntese proteica</b>		
<i>purine nucleoside phosphorylase*</i>	PF3D7_0513300	Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>histone H2A.Z</i>	PF3D7_0320900	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>histone H4</i>	PF3D7_1105000	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>DNA/RNA-binding protein Alba 1</i>	PF3D7_0814200	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013

<i>cell division cycle protein 48 homologue, putative</i>	PF3D7_0619400	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>elongation factor 1-alpha</i>	PF3D7_1357100	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004
<i>40S ribosomal protein S11</i>	PF3D7_0516200	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>40S ribosomal protein S3A, putative</i>	PF3D7_0322900	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>60S ribosomal protein L3</i>	PF3D7_1027800	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>eukaryotic initiation factor 4A</i>	PF3D7_1468700	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>40S ribosomal protein S23, putative</i>	PF3D7_0306900	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>60S ribosomal protein L6, putative</i>	PF3D7_1338200	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>40S ribosomal protein S7, putative</i>	PF3D7_1302800	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>DNA/RNA-binding protein Alba 3</i>	PF3D7_1006200	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>40S ribosomal protein S6</i>	PF3D7_1342000	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>40S ribosomal protein S8e, putative</i>	PF3D7_1408600	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>elongation factor 2</i>	PF3D7_1451100	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>60S acidic ribosomal protein P1, putative</i>	PF3D7_1103100	Florens <i>et al.</i> , 2004

<i>60S ribosomal protein L17, putative</i>	PF3D7_1351400	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>60S ribosomal protein L10, putative</i>	PF3D7_1414300	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>40S ribosomal protein S1</i>	PF3D7_1317800	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>40S ribosomal protein S25</i>	PF3D7_1421200	Florens <i>et al.</i> , 2004
<i>nucleosome assembly protein</i>	PF3D7_0919000	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>40S ribosomal protein S15</i>	PF3D7_1358800	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>histone H2B</i>	PF3D7_1105100	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>elongation factor 1-alpha</i>	PF3D7_1357000	Florens <i>et al.</i> , 2004 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>histone H2B variant</i>	PF3D7_0714000	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>40S ribosomal protein S3</i>	PF3D7_1465900	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>40S ribosomal protein S18, putative</i>	PF3D7_1126200	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>40S ribosomal protein S19</i>	PF3D7_0422400	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>60S ribosomal protein L27</i>	PF3D7_1460700	Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>60S ribosomal protein L2</i>	PF3D7_0516900	Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>histone H2A</i>	PF3D7_0617800	Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>histone H3</i>	PF3D7_0610400	Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>histone H3 variant</i>	PF3D7_0617900	Bark <i>et al.</i> , 2018
<b>Proteínas associadas ao exportoma</b>		

<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function* ♣	PF3D7_1401600	Prajapati <i>et al.</i> , 2013 Proellocks <i>et al.</i> , 2016 Sargeant <i>et al.</i> , 2006
<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTa), unknown function* ♣	PF3D7_0402000	Prajapati <i>et al.</i> , 2013 Proellocks <i>et al.</i> , 2016 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Sargeant <i>et al.</i> , 2006
<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function ♣	PF3D7_1201000	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Prajapati <i>et al.</i> , 2013 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Proellocks <i>et al.</i> , 2016 Zhang <i>et al.</i> , 2017 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Sargeant <i>et al.</i> , 2006
<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc), unknown function* ♣	PF3D7_0801000	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Prajapati <i>et al.</i> , 2013 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Zhang <i>et al.</i> , 2017 Sargeant <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTb), unknown function ♣	PF3D7_0424600	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Prajapati <i>et al.</i> , 2013 Proellocks <i>et al.</i> , 2016 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Sargeant <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013
gamete antigen 27/25	PF3D7_1302100	Proellocks <i>et al.</i> , 2016
mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) ♣	PF3D7_0500800	Coppel <i>et al.</i> , 1998 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Sargeant <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function ♣	PF3D7_1149100	Florens <i>et al.</i> , 2004 Sargeant <i>et al.</i> , 2006

<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function* ♣	PF3D7_1353100	Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Sargeant <i>et al.</i> , 2006
conserved exported <i>Plasmodium</i> protein, unknown function*	PF3D7_0601900	Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function, unspecified product ♣	PF3D7_0730800	Prajapati <i>et al.</i> , 2013 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013
<i>Plasmodium</i> exported protein, unknown function* ♣	PF3D7_0702500	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1 ♣	PF3D7_1240900	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Proellocks <i>et al.</i> , 2016 Sargeant <i>et al.</i> , 2006 Bark <i>et al.</i> , 2018
erythrocyte membrane protein 3* ♣	PF3D7_0201900	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Proellocks <i>et al.</i> , 2016
EMP1-trafficking protein (PTP4)* ♣	PF3D7_0730900	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Sargeant <i>et al.</i> , 2006
knob-associated histidine-rich protein (KHARP) ♣	PF3D7_0202000	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Sargeant <i>et al.</i> , 2006
cytoadherence linked asexual protein 9 (CLAG 9)*	PF3D7_0935800	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Bark <i>et al.</i> , 2018
cytoadherence linked asexual protein 3.1 (CLAG 3.1)	PF3D7_0302500	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Bark <i>et al.</i> , 2018
erythrocyte binding antigen-181 (EBA181)*	PF3D7_0102500	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013

<i>reticulocyte binding protein 2 homologue a*</i>	PF3D7_1335400	Gulanan, <i>et al.</i> , 2013 Sahar <i>et al.</i> , 2011
<i>ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA)</i>	PF3D7_0102200	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Proellocks <i>et al.</i> , 2016 Florens <i>et al.</i> , 2004 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Sargeant <i>et al.</i> , 2006
<i>early transcribed membrane protein 14.1 (ETRAMP)*</i>	PF3D7_1401400	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Proellocks <i>et al.</i> , 2016
<i>GBP130 protein* ♣</i>	PF3D7_1016300	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Zhang <i>et al.</i> , 2017 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Sargeant <i>et al.</i> , 2006
<b>Chaperonas</b>		
<i>14-3-3 protein ♣</i>	PF3D7_0818200	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>heat shock protein 40</i>	PF3D7_1437900	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	PF3D7_0320300	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>heat shock protein 90</i>	PF3D7_0708400	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005

<i>heat shock protein 70</i>	PF3D7_0818900	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005
<i>BIP</i>	PF3D7_0917900	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Zhang <i>et al.</i> , 2017 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005
<i>protein disulfide isomerase*</i>	PF3D7_0827900	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Zhang <i>et al.</i> , 2017 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>endoplamin, putative</i>	PF3D7_1222300	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Zhang <i>et al.</i> , 2017 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<b>Proteínas do metabolismo</b>		
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	PF3D7_1462800	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005
<i>phosphoglycerate kinase</i>	PF3D7_0922500	Zhang <i>et al.</i> , 2017 Bark <i>et al.</i> , 2018 Florens <i>et al.</i> , 2004
<i>enolase</i>	PF3D7_1015900	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Bark <i>et al.</i> , 2018 Florens <i>et al.</i> , 2004 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013

<i>fructose-bisphosphate aldolase</i>	PF3D7_1444800	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Bark <i>et al.</i> , 2018 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005
<i>pyruvate kinase</i>	PF3D7_0626800	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>lactate dehydrogenase*</i>	PF3D7_1324900	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Bark <i>et al.</i> , 2018 Florens <i>et al.</i> , 2004 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>phosphoglycerate mutase, putative</i>	PF3D7_1120100	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>macrophage migration inhibitory factor</i>	PF3D7_1229400	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Bark <i>et al.</i> , 2018
<b>Proteínas do citoesqueleto</b>		
<i>actin I</i>	PF3D7_1246200	Mantel <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>tubulin beta chain</i>	PF3D7_1008700	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<b>Proteínas da rópria</b>		
<i>rhoptry-associated protein 1 (RAP1)</i>	PF3D7_1410400	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>rhoptry-associated protein 2 (RAP2)</i>	PF3D7_0501600	Mantel <i>et al.</i> , 2013 Proellocks <i>et al.</i> , 2016 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<b>Proteassoma e turnover de proteínas</b>		
<i>proteasome subunit alpha type-5, putative</i>	PF3D7_0727400	Mantel <i>et al.</i> , 2013 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>26S protease regulatory subunit 6B, putative</i>	PF3D7_0413600	Florens <i>et al.</i> , 2004
<i>26S protease regulatory subunit 6A, putative</i>	PF3D7_1130400	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018

<i>26S protease regulatory subunit 6A, putative</i>	PF3D7_1130400	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>26S protease regulatory subunit 10B, putative</i>	PF3D7_1306400	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>26S protease regulatory subunit 8, putative</i>	PF3D7_1248900	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>26S protease regulatory subunit 4, putative</i>	PF3D7_1008400	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>26S protease regulatory subunit 7, putative</i>	PF3D7_1311500	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>polyubiquitin</i>	PF3D7_1211800	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>ubiquitin domain-containing protein DSK2</i>	PF3D7_1113400	Florens <i>et al.</i> , 2004
<b>Produção de ácidos graxos</b>		
<i>phosphoethanolamine N-methyltransferase</i>	PF3D7_1343000	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<b>Outras classes</b>		
<i>macrophage migration inhibitory factor</i>	PF3D7_1229400	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>V-type proton ATPase catalytic subunit A</i>	PF3D7_1311900	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>GTP-binding nuclear protein RAN/TC4</i>	PF3D7_1117700	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005
<i>conserved Plasmodium protein, unknown function</i>	PF3D7_1471600	Florens <i>et al.</i> , 2004
<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	PF3D7_1132200	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>ras-related protein Rab-1B</i>	PF3D7_0512600	Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>AAA family ATPase, CDC48 subfamily*</i>	PF3D7_0711000	Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>conserved protein, unknown function</i>	PF3D7_0813300	Bark <i>et al.</i> , 2018

<i>ornithine aminotransferase</i>	PF3D7_0608800	Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>ras-related protein Rab-1A</i>	PF3D7_0513800	Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>T-complex protein 1 subunit delt</i>	PF3D7_1357800	Bark <i>et al.</i> , 2018

\* Proteínas com domínio transmembrânico

♠ Proteínas com peptídeo sinal PEXEL

Sargeant *et al.*, 2006, estimaram a presença de 428 proteínas no exportoma por análises de *clustering*, que identificaram as principais famílias e os locais conservados do genoma onde contém a maioria das sequências para proteínas exportadas. Além disso, os autores realizaram uma busca por motivos comuns, como peptídeo sinal PEXEL, regiões transmembrânicas e múltiplas alpha hélices. Algumas proteínas preditas por Sargeant e colaboradores, em 2006, foram também identificadas na FM, como GBP130, MESA, EMP1, RESA, PTP4 e KAHRP.

Até o momento, dois estudos estudaram proteínas de superfície enriquecidas de *P. falciparum* e submeteram a amostra a uma análise proteômica por LC-MSMS. O primeiro foi realizado por Florens e colaboradores, em 2004, que utilizaram a técnica de marcação química das proteínas de superfície com uma biotina acoplada ao grupo N-hidroxisucinimida (NHS) e ao grupo maleimido. O segundo artigo foi publicado mais recentemente, em 2017, por Bark e colaboradores e utilizou tanto a técnica de *shave off* quando a marcação por biotilação com a Biotina -NHS.

Florens e colaboradores, em 2014, relataram a identificação de 423 proteínas nas amostras enriquecidas. Das 423, 69 proteínas foram identificadas em comum com o nosso estudo. Dentre essas estão as proteínas preditas para se encontrarem nas róprias, PF3D7\_1410400 (*rhoptry associated protein 1*) e PF3D7\_0501600 (*rhoptry associated protein 2*). Os autores sugeriram que a presença dessas proteínas nas amostras enriquecidas se deve a perda de integridade dos esquizontes durante o preparo de amostras. No entanto, essas proteínas já foram identificadas em outro trabalho que investigou proteínas de microvesículas (MANTEL *et al.*, 2013) e por Bark *et al.* Portanto, essas proteínas podem ter outras funções nas formas velhas de *P. falciparum*.

A investigação mais completa das proteínas de superfície foi realizada por Bark e colaboradores, em 2018, porque além de utilizarem duas técnicas de enriquecimento realizaram também uma abordagem quantitativa por iTRAQ (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*), para diferenciar as proteínas que foram identificadas em maior concentração nas amostras enriquecidas, e fracionaram as proteínas em bandas de gel para reduzir a complexidade

das amostras e aumentar o número de identificações. Por isso, esse estudo identificou antígenos de superfície que são raramente identificados, em estudos proteômicos, devido a baixa abundância e sazonalidade na expressão como proteínas das famílias: surfín (PF3D7\_0113100, PF3D7\_0830800), RIFIN (PF3D7\_0900700, PF3D7\_1372700, PF3D7\_0808900, PF3D7\_0732200, PF3D7\_1200200, PF3D7\_0600300, PF3D7\_1000500) e STEVOR (PF3D7\_0832600). Ao todo, os autores identificaram 989 proteínas, sendo que 118 delas são preditas no exportoma e 82 também foram identificadas no nosso estudo.

Zhang e colaboradores, em 2017, focaram no estudo do conteúdo proteico dos j-dots e observaram que grandes quantidades dessas estruturas vesiculares permaneciam no *pellet* após lise hipotônica e centrifugação de 1.000 a 80.000 *xg*. Para reduzir a identificação de proteínas contaminantes, os autores procederam a um *crosslinking* seguido de uma imunoprecipitação com uma proteína que já foi descrita como componente dos J-dots, a Hsp70x. Esse estudo demonstrou também que os j-dots foram incapazes de atravessar os poros de 30 nm, quando utilizadas quantidades pequenas de SLO (3 unidades) que não causam a lise da membrana da hemácia. A partir da permeabilização com SLO, os autores trataram as células com proteinase K para compreender quais proteínas se encontravam dentro dos j-dots. Apesar de que a proteína alvo não foi encontrada na fração membrana, algumas das proteínas identificadas como parceiras internas da HSP70x por Zhang e colaboradores (2017) foram também identificadas nesse estudo, como *rhoptry associated protein 1*, GBP130, PfPDI-8, HSP70 (PF3D7\_0917900) e endoplasmín (PF3D7\_1222300). No entanto, não há como discriminar se essas proteínas, no nosso estudo, foram identificadas dos J-dots ou de outros compartimentos.

O subproteoma dos Maurer's Clefts (MC's) pode ser recuperado por meio de lises hipotônicas, já que, principalmente nos estágios tardios, essas organelas permanecem próximas a membrana e transferem proteínas para a superfície (BLISNICK *et al.*, 2000). A SLO não é capaz de lisar os MC's (VIVANCOS *et al.*, 2007), portanto, espera-se que a fração enriquecida de conteúdo associado a membrana no nosso estudo contenha também componentes dos Maurer Clefts (MC's). Vincensini, *et al.*, em 2005, realizaram uma abordagem proteômica dos MC's. Dentre as 78 proteínas identificadas pelos autores, 28 proteínas pertencem a maquinaria de tradução do parasito (proteínas ribossômicas e fatores de alongação). A partir da nossa estratégia experimental, 31 das 108 identificadas na fração membrana também pertencem a essa classe. Vincensini e colaboradores sugerem que essas proteínas sejam contaminantes, pois são largamente expressas. Outros estudos de proteínas de superfície de *P. falciparum* também identificaram essas classes e

estudos sorológicos observaram que os pacientes produzem anticorpos contra fatores de alongação (FONTAINE *et al.*, 2010). Portanto, a presença de proteínas de tradução gênica no exportoma de *P. falciparum* ainda requer confirmação. Interessantemente, a proteína phosphoethanolamine-N-methyl transferase também foi identificada em comum, esse achado reforça a hipótese de que os MC's atuam na biossíntese de fosfolipídeos para a membrana.

As hemácias infectadas por *P. falciparum* produzem microvesículas (0.1–1 µm de tamanho) que exercem efeitos imunomoduladores e atuam como mensageiros para o controle da população de parasitos. Mantel *et al.*, 2013, se dedicaram a caracterização proteica das microvesículas. Os autores enriqueceram as microvesículas por centrifugação e filtração do sobrenadante e demonstraram que moléculas de DNA são secretadas e estimulam os macrófagos a liberar citocinas, que aumentam o sequestro na microvasculatura. Além disso, as vesículas contêm microRNA que podem induzir a formação de gametócitos após endocitose por outras hemácias parasitadas. Assim como no presente trabalho, Mantel e colaboradores identificaram muitas proteínas associadas ao DNA, como histona H3 (PF3D7\_0610400), histona H2B (PF3D7\_1105100), *DNA/RNA-binding protein Alba 3* (PF3D7\_1006200), dentre outras. Além de proteínas associadas ao DNA, Mantel *et al.*, identificaram, em comum com o presente estudo, proteínas associadas a membrana dos eritrócitos infectados, tais quais CLAG 9, CLAG 3.1, EBA-181 (PF3D7\_0102500), MESA, EMP1, dentre outras.

Alampalli e colaboradores, em 2018, enriqueceram as proteínas dos *knobs*, que são protusões de membrana criadas pelo parasito, por meio de lise osmótica, solubilização com Triton-X-100, fragmentação com gradiente de sacarose e por eletroforese. A partir da análise dos peptídeos trípticos extraídos do gel, os autores identificaram as seguintes proteínas de *P. falciparum* GBP130, KHARP, MESA, PHISTb (PF3D7\_1201000), *elongation factor 1-alpha*, PHISTb (PF3D7\_0532400) e RhopH3 (PF3D7\_0905400). Com exceção das duas últimas, essas proteínas foram também identificadas na FM. Com relação as proteínas de *Homo sapiens* contidas nos *knobs*, todas as proteínas listadas pelo autor foram também identificadas na FM, que são aniquiririna, espectrina, banda 3, dinamina, banda 4.2 e HSP70. Essas observações sugerem que os *knobs* foram enriquecidos no sedimento de membrana.

Logo no início do estágio de anel se pode observar um aumento da permeabilidade da membrana da hemácia a uma gama de nutrientes, como ânions, cátions, açúcares e nucleotídeos. O transporte de proteínas para a membrana do eritrócito é essencial para absorção de nutrientes e excreção de resíduos tóxicos do metabolismo, como o ácido láctico. CLAG (*cytoadherence-linked*

*asexual gene*) 3.1/3.2 e PSAC (do inglês *Plasmodium surface anion channel*) são alguns canais conhecidos (DESAI; BEZRUKOV; ZIMMERBERG, 2000; SHARMA *et al*, 2015). Na FM, foram identificadas as proteínas CLAG 3.1 e CLAG 9, possivelmente relacionadas com o transporte de nutrientes na membrana da hemácia.

Observa-se que 5 proteínas da família PHIST (*Plasmodium helical interspersed subtelomeric*) foram identificadas na fração membranar (PF3D7\_1401600, PF3D7\_0402000, PF3D7\_1201000, PF3D7\_0801000, PF3D7\_0424600). As funções dessa classe de proteínas foram revisadas por Prajapati e Singh, em 2013. Essa família é composta de 72 proteínas em *P. falciparum* e todas contêm sinal de exportação PEXEL. As PHIST podem ser divididas em 3 classes a depender dos domínios proteicos presentes: a, b e c. As PHIST classe “a” são pequenas e possuem apenas um peptídeo sinal PEXEL, as do grupo “b” contêm um domínio DnaJ, comum em chaperonas, e as do grupo c são muito variáveis. As PHISTs parecem estar relacionadas com a modificação da rigidez das hemácias, por meio da interação com a banda 4.1, a PHIST mais conhecida que realiza essa função é a RESA (PARISH *et al.*, 2013b). As PHISTs também podem se localizar nos MC’s, como descrito para a PTP2 (PF3D7\_0731100) (MAIER *et al.*, 2008).

Nota-se que nesse estudo não foram identificados marcadores de vacúolo parasitóforo como EXP2 (PF3D7\_1471100) e EXP1 (PF3D7\_1121600), os quais foram enriquecidos em lise osmótica por Vicensini *et al.*, a proteína PTEX150 (PF3D7\_1436300) que foi identificada em ensaio de biotilação da superfície por Florens *et al.*, e a HSP101 (PF3D7\_1116800) que foi enriquecida no estudo de proteínas de membrana por Bark *et al.* e por Mantel *et al.* A especificidade da lise por SLO pode ter contribuído para uma lise muito reduzida da membrana do vacúolo parasitóforo.

Fontaine e colaboradores, em 2010, realizaram ensaios de eletroforese bidimensional com extratos de hemácias parasitadas e submeteram a *western blotting* com soro de paciente não expostos ao *P. falciparum* e brevemente expostos para identificar os antígenos imunogênicos. Interessantemente, as proteínas HSP70 (PF3D7\_0818900) e *elongation factor 1-alpha* (PF3D7\_1357000) demonstraram imunogenicidade, a primeira é uma chaperona e a segunda está envolvida na maquinaria de tradução, degradação de proteínas e transdução de sinal. Essas proteínas também foram identificadas na fração membranar (FM) do nosso estudo.

As proteínas identificadas na fração membranar que não foram descritas em outros estudos são: PF3D7\_1361200 (*conserved Plasmodium protein*), PF3D7\_1202900 (*high mobility group protein B1*), PF3D7\_0520900 (*adenosylhomocysteinase*), PF3D7\_1461300 (*40S ribosomal protein*

S28e), PF3D7\_0422700 (*eukaryotic initiation factor 4A-III, putative*), PF3D7\_0527100 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 N, putative*), PF3D7\_1434500 (*dynein-related AAA-type ATPase, putative*), PF3D7\_0729900 (*dynein heavy chain, putative*), PF3D7\_0927400 (*conserved Plasmodium protein*) e PF3D7\_1346400 (*VPS13 domain-containing protein*). As duas proteínas da classe das dineínas (PF3D7\_0729900 e PF3D7\_1434500) são pouco estudadas, porém sabe-se que essa classe de proteínas atua na formação de vesículas, portanto elas podem estar envolvidas na secreção de proteínas (DAHER *et al.*, 2010).

As proteínas quinases da família FIKK, que contém o domínio conservado Phe- Ile- Lys- Lys., foram identificadas por Bark e colaboradores (2018), porém não foram encontradas no nosso estudo. De 17 FIKK quinases preditas para serem exportadas, 5 já foram confirmadas no exportoma em áreas como, a ME e MC's (KATS *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2007). O parasito induz mudanças no estado de fosforilação tanto das próprias proteínas quanto das proteínas da célula hospedeira, como as do citoesqueleto espectrina, anquirina, actina e banda 4.1 (PANTALEO *et al.*, 2010; SOLYAKOV *et al.*, 2011; WU, YANG *et al.*, 2009). A mudança no estado de fosforilação das proteínas pode alterar a função e localização das mesmas. Algumas proteínas citoplasmáticas podem se alojar na membrana e se tornarem neo-antígenos, ou seja, em soro de pacientes infectados, podem ser encontrados auto-anticorpos contra proteínas citoplasmáticas da hemácia como HSP70, aducina, espectrina e banda 3 por serem recrutadas para a membrana durante a infecção por *P. falciparum* (BANUMATHY; SINGH; TATU, 2002; BERZINS; WAHLGREN; PERLMANN, 1983; WAHLGREN; BERZINS; PERLMANN, 1983). Essas quatro proteínas foram identificadas na FM.

Wu e colaboradores, em 2009, realizaram um enriquecimento do fosfoproteoma, fracionaram as amostras por SDS-PAGE e analisaram os peptídeos trípticos por LC-MSMS. Os autores diferenciaram as proteínas do parasito das do eritrócito via marcação metabólica e observaram a fosforilação de 77 proteínas da hemácia após infecção pelo *P. falciparum*. Os autores identificaram 14 dessas proteínas, dentre elas as seguintes foram também identificadas no nosso estudo: espectrina, banda 4.1, aducina, dematina, actina, tropomiosina, HSP70, tropomodulina.

A proteína 14-3-3 de *P. falciparum* é um componente conhecido do exportoma, porém sua função ainda não foi totalmente compreendida. Lalle e colaboradores, em 2011, demonstraram por análises de *pull down* e coimunoprecipitação a interação entre a 14-3-3 com a dematina, que é um componente do citoesqueleto. Também já foi sugerido que essa proteína funcione como uma chaperona (SILES-LUCAS; GOTTSTEIN, 2003). Em células de mamífero, essa proteína funciona

como um cofator da proteína GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) e regula os processos dependentes de fosforilação (TZIVION; AVRUCH, 2002; YUAN; AGARWAL-MAWAL; PAUDEL, 2004). A 14-3-3 foi identificada na FM e na FC, o que reforça sua presença no exportoma.

As proteínas componentes do proteossoma e as relacionadas com o metabolismo foram amplamente identificadas, como poder ser observado na tabela 2. Apesar de terem sido detectadas também em outros estudos, a presença dessas proteínas no exportoma ainda requer confirmação. A via glicolítica de *P. falciparum* ocorre no citoplasma do parasito, por isso alguns autores acreditam que a presença dessas proteínas se deva a contaminação devido a lise de alguns parasitos durante o preparo de amostra (VINCENSINI *et al.*, 2005). No entanto, tem sido proposto que a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase atua também no transporte de vesículas em mamíferos (SIROVER, 1999) e em *P. falciparum*, de forma dependente de proteínas GTPase Rab (DAUBENBERGER *et al.*, 2003). Na fração membranar, foram encontradas também duas proteínas no tipo Rab, PF3D7\_0512600 e PF3D7\_0513800, que podem participar também do transporte vesicular. O proteossoma típico de eucariontes (26S), que foi identificado na fração membranar, já foi descrito no núcleo e no citoplasma do *P. falciparum* (KRISHNAN; WILLIAMSON, 2018)

As proteínas da fração citoplasmática estão listadas na Tabela 3 e também foram averiguadas quanto a identificação nos mesmos estudos. As proteínas que não foram descritas ou mencionadas em estudos anteriores são: PF3D7\_0309200 (*serine/threonine protein kinase, putative*), PF3D7\_0527100 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative*), PF3D7\_0322000 (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*), PF3D7\_0810000 (*acyl-CoA binding protein, putative*) e PF3D7\_0422700 (*eukaryotic initiation factor 4A-III, putative*).

**Tabela 3 Proteínas plasmodiais da fração citoplasmática da hemácia mencionadas em outros estudos**

Proteínas em comum	PlasmoID	Referências
<i>BIP</i>	PF3D7_0917900	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Zhang <i>et al.</i> , 2017 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005

<i>fructose-bisphosphate aldolase</i>	PF3D7_1444800	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>L-lactate dehydrogenase*</i>	PF3D7_1324900	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>antigen 332, DBL-like protein</i>	PF3D7_1149000	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>GTP-binding nuclear protein RAN/TC4</i>	PF3D7_1117700	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005
<i>14-3-3 protein</i>	PF3D7_0818200	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>phosphoglycerate kinase</i>	PF3D7_0922500	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	PF3D7_1462800	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>GBP130 protein * ♣</i>	PF3D7_1016300	Fontaine <i>et al.</i> , 2011 Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mundwiler-Pachlatko <i>et al.</i> , 2013 Prajapati <i>et al.</i> , 2013 Zhang <i>et al.</i> , 2017 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005
<i>enolase</i>	PF3D7_1015900	Lanzer <i>et al.</i> , 2006 Mantel <i>et al.</i> , 2013 Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Vicensini <i>et al.</i> , 2005

<i>histone H2B variant</i>	PF3D7_0714000	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018 Mantel <i>et al.</i> , 2013
<i>Plasmodium exported protein, unknown function</i> ♣	PF3D7_1149100	Florens <i>et al.</i> , 2004
<i>nucleosome assembly protein</i>	PF3D7_1203700	Florens <i>et al.</i> , 2004 Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>acyl-CoA binding protein, ACBP2</i>	PF3D7_1001200	Florens <i>et al.</i> , 2004
<i>ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>	PF3D7_1365900	Bark <i>et al.</i> , 2018
<i>gamete antigen 27/25</i>	PF3D7_1302100	Bark <i>et al.</i> , 2018 Proellocks <i>et al.</i> , 2016

\* Proteínas com domínio transmembrânico

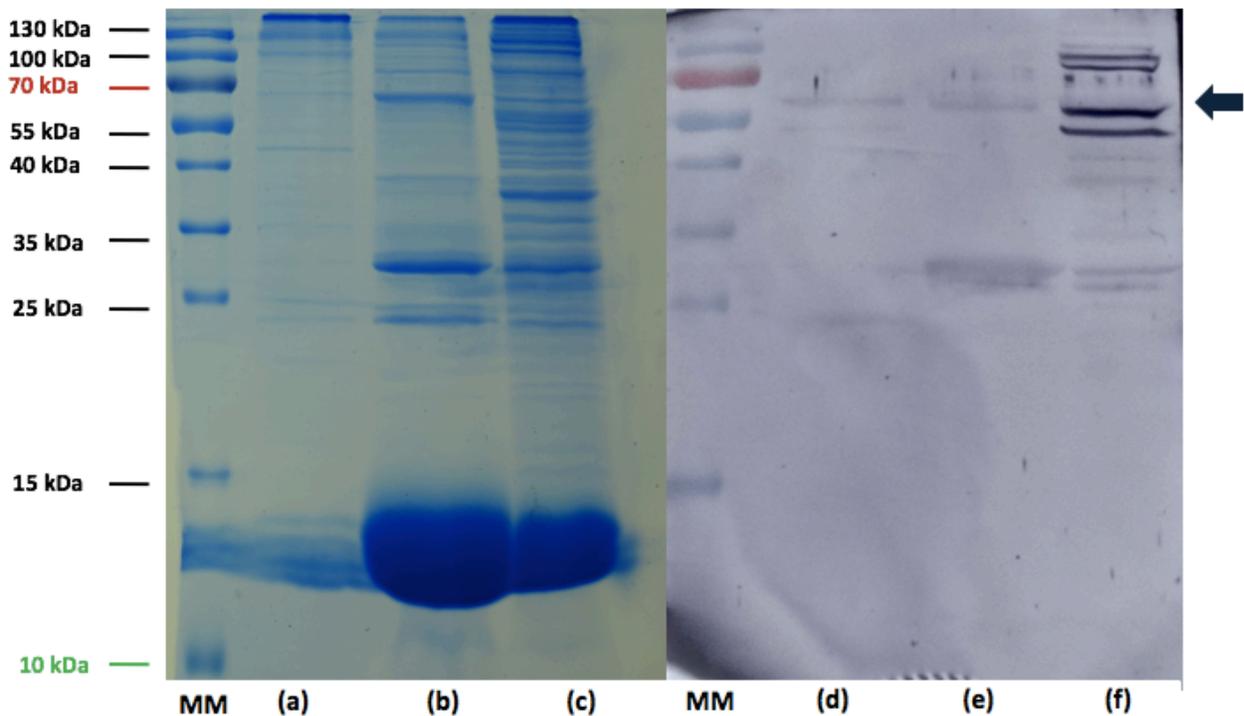
♣ Proteínas com peptídeo sinal PEXEL

Três antígenos de *P. falciparum* foram identificados no nosso estudo, a EBA-181 (PF3D7\_0102500) e o *reticulocyte binding protein 2*, na FM, e o antígeno 332, na FC. Foi descrito por Lanzillotti e Coetzer, em 2006, que o antígeno EBA-181 se liga a na Banda 4.1 do citoesqueleto da hemácia, essa ligação pode estar envolvida tanto no aumento da rigidez da célula, quanto na invasão. Com relação ao *reticulocyte binding protein 2a*, até o momento foi descrito o seu envolvimento com a invasão das células vermelhas pelos merozoítos (GUNALAN *et al.*, 2013, SAHAR *et al.*, 2011), portanto essa proteína identificada na FM poderia sugerir uma contaminação por merozoítos ou a mesma desempenha funções ainda não identificadas nas formas tardias intraeritrocitárias. O antígeno 332 de *P. falciparum* é uma proteína periféricas dos MC's. Nos estágios finais de desenvolvimento, essa proteína provavelmente se associa com a actina e contribui para o aumento da rigidez da célula parasitada. Apesar de ser associada com a ME, essa proteína foi identificada na FC (GLENISTER *et al.*, 2009; HODDER *et al.*, 2009; NILSSON *et al.*, 2012; WALLER *et al.*, 2010).

O antígeno 27/25 é conhecido como um marcador precoce do processo de gametogênese e começa a ser altamente expresso aproximadamente 35 horas após invasão. Ensaio de imunofluorescência detectaram essa proteína em vesículas no citoplasma da célula hospedeira e posteriormente na membrana (BAKER *et al.*, 1994; BRUCE *et al.*, 1994; JOSLING; LLINÁS, 2015). Isso pode explicar porque esse antígeno foi identificado tanto na FM quanto na FC.

### 5.1.3 PfpDI-8 é exportada até a membrana do eritrócito

Para validar a presença da PfpDI-8 nas frações, realizou-se uma análise por *western blotting* com anticorpo anti-PfpDI8 das frações preparadas sob as mesmas condições. Apesar de não ter sido identificada na fração citoplasmática (FC) por espectrometria de massas, a PfpDI-8 foi revelada por *western blotting* nas três frações FM, FC e FP. Esse resultado pode ser visualizado na Figura 12, que mostra o perfil eletroforético das amostras e a marcação na membrana de nitrocelulose em uma região próxima ao marcador molecular de 55 kDa. A imunodeteccção provavelmente ocorreu na proteína correta, já que a PfpDI-8 tem 55 kDa de massa.



**Figura 3: Validação da presença da PfpDI-8 nas frações por *western blotting*.** As amostras do enriquecimento foram lisadas com os tampões RIPA/Laemmli e analisadas por SDS-PAGE 12%. Em cada poço do gel foram aplicados 20  $\mu$ L das amostras: (a) FM (b) FC (c) FP. Após separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Supported 0.45  $\mu$ M, GE Healthcare). A membrana foi incubada com o soro policlonal primário anti-PDI (1:250) e anticorpo secundário anti-IgG (1:30.000) de coelho acoplado a fosfatase alcalina. A PfpDI-8 foi revelada com substrato NBT/BCIP (Sigma Fast™) nas amostras: (d) FM (e) FC (f) FP. MM: Marcador Molecular.

Existem evidências que reforçam a presença da PfpDI-8 no exportoma do *P. falciparum*. Por uma abordagem proteômica, Vincensini e colaboradores, em 2005, identificaram a PfpDI-8 nos Maurer's Clefts. Vários antígenos de membrana contêm ligações dissulfeto que são essenciais para suas conformações adequadas, como a EMP1. Conforme abordado nas sessões anteriores,

proteínas integrantes do exportoma atravessam a membrana do vacúolo parasitóforo pelo complexo PTEX na forma não dobrada, logo elas precisam ser renaturadas quando adentram o citoplasma da hemácia parasitada. Se a PfPDI-8 constituir parte do exportoma, ela provavelmente auxilia as proteínas recém-exportadas a formar suas ligações dissulfeto nas posições corretas. Em um estudo de coexpressão realizado por Mahajan e colaboradores, em 2006, a PfPDI-8 auxiliou no dobramento dependente de ligações dissulfeto do antígeno de membrana EBA-175 (ELSWORTH; CRABB; GILSON, 2014). A PfPDI-8 foi identificada em trabalhos que estudaram proteínas de superfície (FLORENS *et al.*, 2004, BARK *et al.*, 2018), microvesículas (MANTEL *et al.*, 2013), exportoma (SARGEANT *et al.*, 2006, FONTAINE *et al.*, 2011), J-dots (ZHANG *et al.*, 2017) e MCs (VINCENSINI *et al.*, 2005).

## 5.2 Identificação das parceiras proteicas intraparasitárias da PfPDI-8 por BN-BLOT

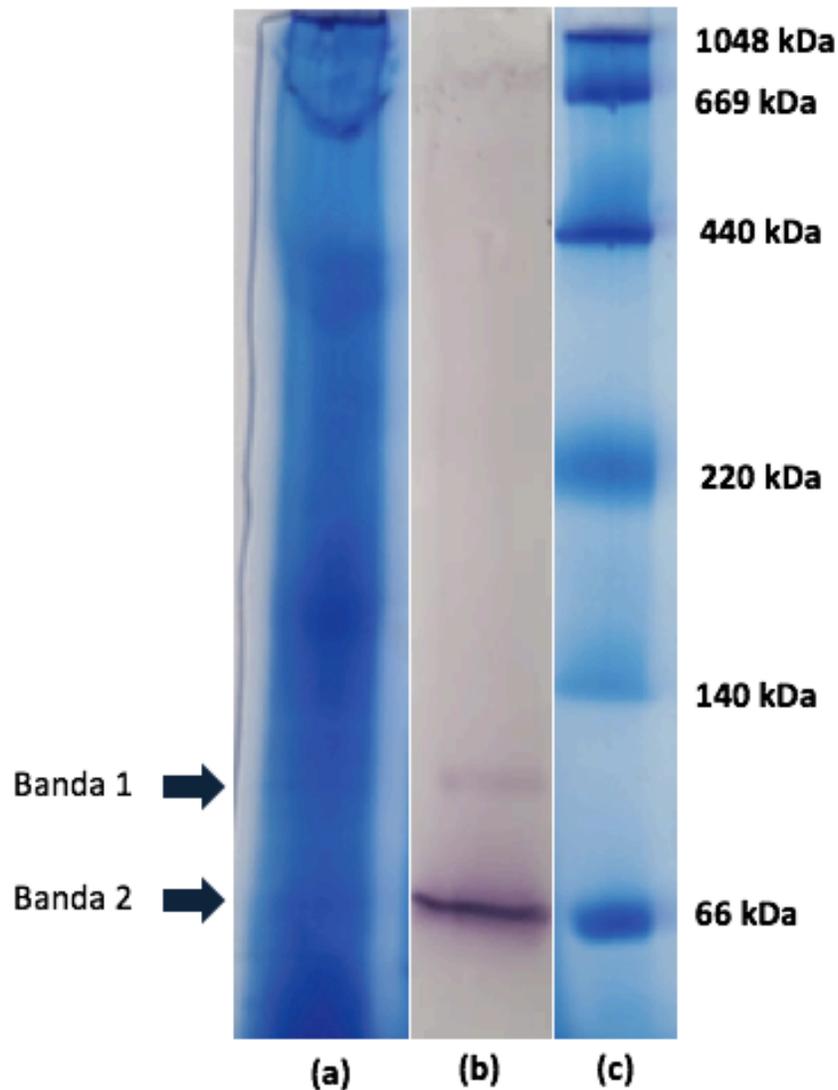
O *Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (BN-PAGE) é um método de eletroforese capaz de separar complexos proteicos a partir do uso do *Comassie Blue* que fornece carga e impede a formação de novos complexos não fisiológicos no extrato. Muitos trabalhos elucidaram complexos proteicos celulares por meio da análise dos peptídeos trípticos extraídos das bandas do gel por espectrometria de massas (DA SILVA *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2017; MARION *et al.*, 1997). Em amostras pouco complexas, pode-se obter uma separação mais nítida dos grupos de proteínas, por outro lado os complexos não são claramente separados em amostras que possuem muita variedade com pouca abundância. Uma amostra proteica de cultura de *P. falciparum* é repleta de complexos, já que ela contém hemácias não-infectadas remanescentes, ainda que tenha sido realizado um processo de separação dos *ghosts*, e parasitadas e essas últimas podem conter parasitos de variados estágios, mesmo que a cultura tenha sido submetida a uma técnica de sincronização. Por isso, a utilização da técnica de *western blotting* a partir do BN-PAGE torna-se essencial para encontrar complexos específicos em amostras de *P. falciparum* (SESSLER *et al.*, 2012).

A fim de reduzir a complexidade da amostra e encontrar com maior facilidade o complexo da PfPDI-8, realizou-se uma lise seletiva com saponina para romper uma grande parte das hemácias não-parasitadas e extrair os parasitos dos eritrócitos infectados. A lise por saponina, nas condições-padrão, é capaz de solubilizar parcialmente também as proteínas do vacúolo parasitóforo. Logo, a maior parte da amostra submetida ao BN-PAGE, nesse trabalho, era composta por parasitos nas

formas de trofozoítos e esquizonte extraídos da célula hospedeira. Apesar dos indícios de que essa proteína faz parte do exportoma, buscou-se nessa análise a caracterização de complexos intraparasitários. O estudo das proteínas parceiras da PfPDI-8 especificamente na célula hospedeira por BN-PAGE requer a otimização de uma técnica de lise que ao mesmo tempo separe o exportoma e preserve os complexos.

A amostra foi pipetada em dois poços do gel nativo, gerando duas corridas paralelas. Dessas corridas, uma foi utilizada para a transferência das proteínas para a membrana de PVDF e a outra foi utilizada para extrair os peptídeos dos locais marcados no *western blotting* (WB) (Figura 13). Observa-se que duas bandas foram marcadas no WB: a banda 2 na altura de aproximadamente 66 kDa e a Banda 1 de aproximadamente 120 kDa.

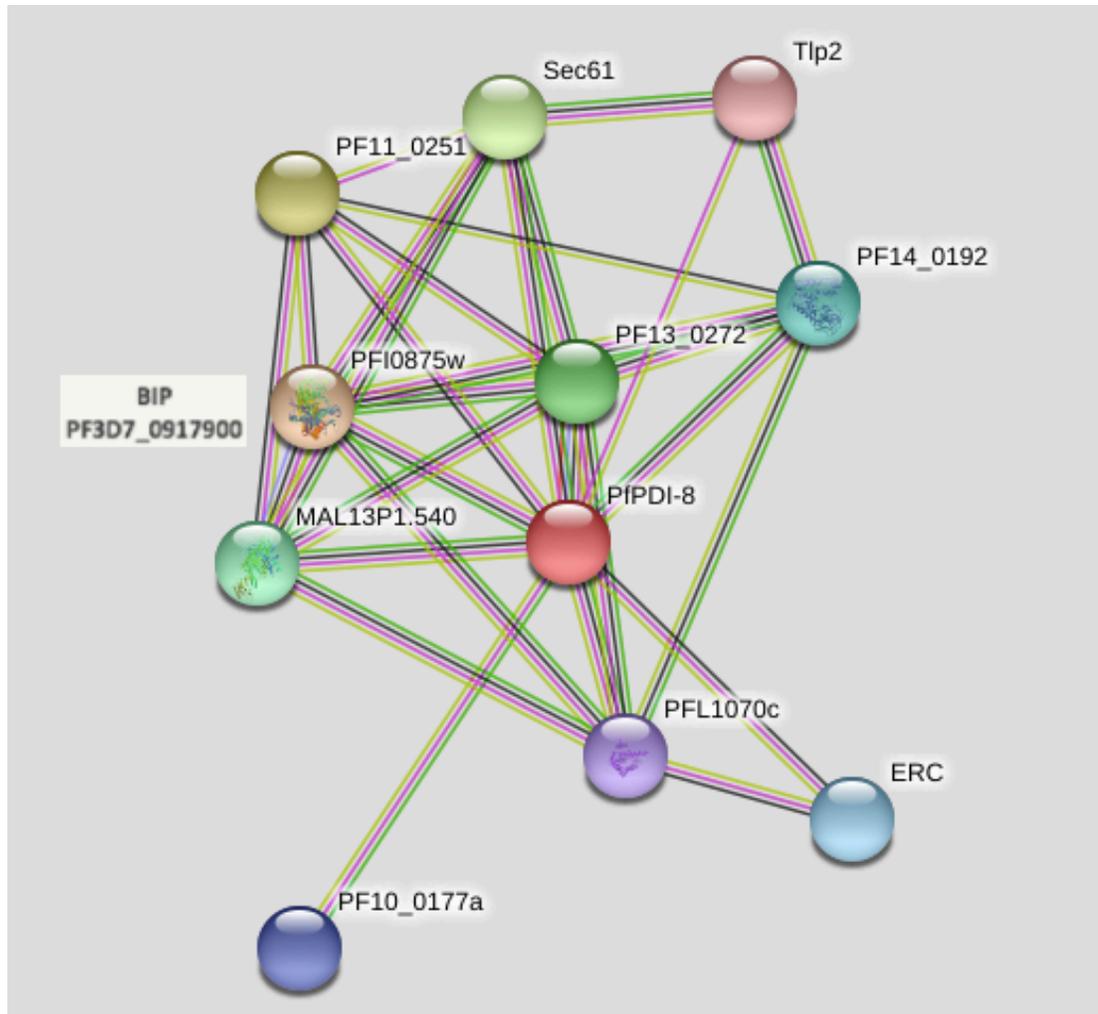
Ambas as bandas foram cortadas do gel e as proteínas foram alquiladas, reduzidas e tratadas com tripsina. Os peptídeos trípticos foram extraídos do gel e analisados por espectrometria de massas do tipo LC-MSMS. Em ambas as bandas, a PDI foi identificada. Na banda 2, foram identificadas 175 proteínas com pelo menos um peptídeo único e FDR menor que 1%. Devido a baixa massa da Banda 2, possivelmente a marcação visualizada seja referente a própria proteína PfPDI-8 descomplexada que foi solubilizada durante a lise. Na banda 1 foram identificadas 113 proteínas, as quais estão listadas no Anexo 6. A fim de analisar quais dessas proteínas se complexariam com a proteína de interesse para gerar um complexo de aproximadamente 110 kDa, a massa da PfPDI-8 foi somada a de cada proteína identificada e o resultado dessa operação está listado também no Anexo 6. Das 113, 21 proteínas, quando associadas com a PDI, formariam um complexo de mais de 110kDa. Uma das desvantagens do BN-PAGE para estudo de complexos proteicos é a identificação concomitante de um *background* de proteínas no gel que podem não estar associados ao complexo.



**Figura 4: Identificação das parceiras proteicas da PfPDI-8 por BN-BLOT.** (a) BN-PAGE 5-18% (m/v) do extrato de complexos proteicos solúveis de estágios tardios de *P. falciparum* (b) Detecção dos complexos proteicos que contém a PfPDI-8 por *Western blotting* com anticorpo anti-PDI (c) Marcador Molecular: proteínas de massa conhecida: tiroglobulina – 669 kDa, ferritina - 440 kDa, catalase - 232 kDa, lactato-desidrogenase - 140 kDa, albumina bovina - 66 kDa (HMW Calibration Kit- GE Healthcare).

A fim de avaliar quais das 21 proteínas poderiam formar um complexo com a PfPDI-8, utilizou-se o programa STRING - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (<http://string-db.org/>) na versão 11.0 para buscar a rede de interações preditas para proteína de interesse (Figura 14). O *software* STRING é uma plataforma virtual que fornece dados de interações entre proteínas, tanto físicas (diretas) quanto funcionais (indiretas). O STRING inclui, em seu banco, dados de várias fontes, como vizinhança genômica (linhas verdes-escuras), fusão gênica (linhas vermelhas), co-ocorrência entre espécies (linhas azuis-escuras), co-expressão na

mesma ou em outras espécies (linhas roxas), dados experimentais (linhas rosas), bases de dados (linhas azuis-claras) e mineração de dados na literatura (linhas verdes-claras). O software atribui também um *score* que é o resultado da ponderação entre os valores atribuídos a cada fonte. O valor de confiança no software varia entre 0 e 0.99, sendo 0.99 a confiança mais alta. Os *scores* de interação das proteínas da rede da PfpDI-8 estão listados na Figura 15.



**Figura 14: Rede de interações da proteína PfpDI-8 predita pela plataforma STRING 11.0.** A proteína PFI0875w equivale a BIP (PF3D7\_0917900), a única proteína predita como parceira pelo STRING que também colocalizou com a PfpDI-8 (em vermelho) na análise por BN-PAGE.

**Your Input:**

PfPDI-8 Protein disulfide isomerase (483 aa)

**Predicted Functional Partners:**

		Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[Homology]	Score
PF10875w	Chaperone DnaK; 78 kDa glucose-regulated protein homolog; Belongs to the heat shock protein 70 family (652 aa)	●			●	●	●	●	●	0.984
PF11_0251	Uncharacterized protein; Endoplasmic reticulum oxidoreductin, putative (465 aa)				●	●		●		0.921
Sec61	Preprotein translocase, SecY subunit; Sec61 alpha subunit, PfSec61 (472 aa)				●	●		●		0.918
PF13_0272	Thioredoxin-related protein, putative (208 aa)		●		●	●		●	●	0.912
MAL13P1.540	Heat shock protein 70 (Hsp70), putative (932 aa)				●	●		●		0.882
PF14_0192	Glutathione reductase; Belongs to the class-I pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family (500 aa)				●	●		●		0.854
ERC	Membrane-associated calcium-binding protein (343 aa)				●	●		●		0.831
PF10_0177a	Serine/threonine-protein phosphatase (2166 aa)					●		●		0.815
PFL1070c	Uncharacterized protein; Endoplasmic homolog, putative (821 aa)				●	●		●		0.815
Tlp2	Uncharacterized protein; Thioredoxin (128 aa)					●		●		0.807

**Figura 15: Scores de interações das proteínas com a PfPDI-8 preditos pela plataforma STRING 11.0.** Os valores levam em consideração os parâmetros: vizinhança genômica (*neighborhood*), fusão gênica (*gene fusion*), co-ocorrência entre espécies (*cooccurrence*), co-expressão na mesma ou em outras espécies (*coexpression*), dados experimentais (*experiments*), bancos de dados (*database*) e mineração de dados na literatura (*textmining*).

Dentre as 11 proteínas do interatoma predito pelo STRING, somente a proteína BIP/HSP70 (PF3D7\_0917900) também se colocou com a PfPDI-8 na Banda 1 do BN-PAGE e a soma desse complexo teria aproximadamente 127 kDa. A interação com essa proteína foi predita devido a análises de vizinhança genômica, co-expressão na mesma e em outras espécies e mineração de dados na literatura. A interação da BIP com a PfPDI-8 gerou o maior valor de *score* dentre as proteínas parceiras preditas: 0,984. A colocação dessas proteínas no retículo endoplasmático foi verificado em dois estudos (MAHAJAN *et al.*, 2006; MOURAY *et al.*, 2007). Já foi também demonstrado que a BIP se liga nas proteínas durante o tráfego intracelular por vesículas advindas do retículo endoplasmático (TONKIN *et al.*, 2006). Apesar de que análises de fluorescência não permitiram a visualização da BIP na hemácia parasitada, estudos proteômicos identificaram essa proteína no exportoma, na superfície, nos J-dots e nos MC's, como demonstrado nas Tabelas 2 e 3. No nosso estudo, a BIP e a PfPDI-8 foram identificadas na fração membranar e na fração citoplasmática. Entretanto, a possível interação sugerida pelo resultado do BN-PAGE foi observada dentro do parasito, pois os parasitos foram tratados com saponina para retirar os *ghosts* e o conteúdo do lúmen do vacúolo parasitóforo.

Não se pode descartar a possibilidade que a Banda 1 seja composta de uma forma dimerizada da PfPDI-8, visto que a soma de duas PDIs seria de aproximadamente 110 kDa. Mouray e colaboradores, em 2007, purificaram a PDI e realizaram uma caracterização bioquímica. A partir de uma análise de gel filtração em coluna Superdex 75 HR10/30, os autores observaram que a PDI tem uma tendência de 80% em se manter na forma monomérica.

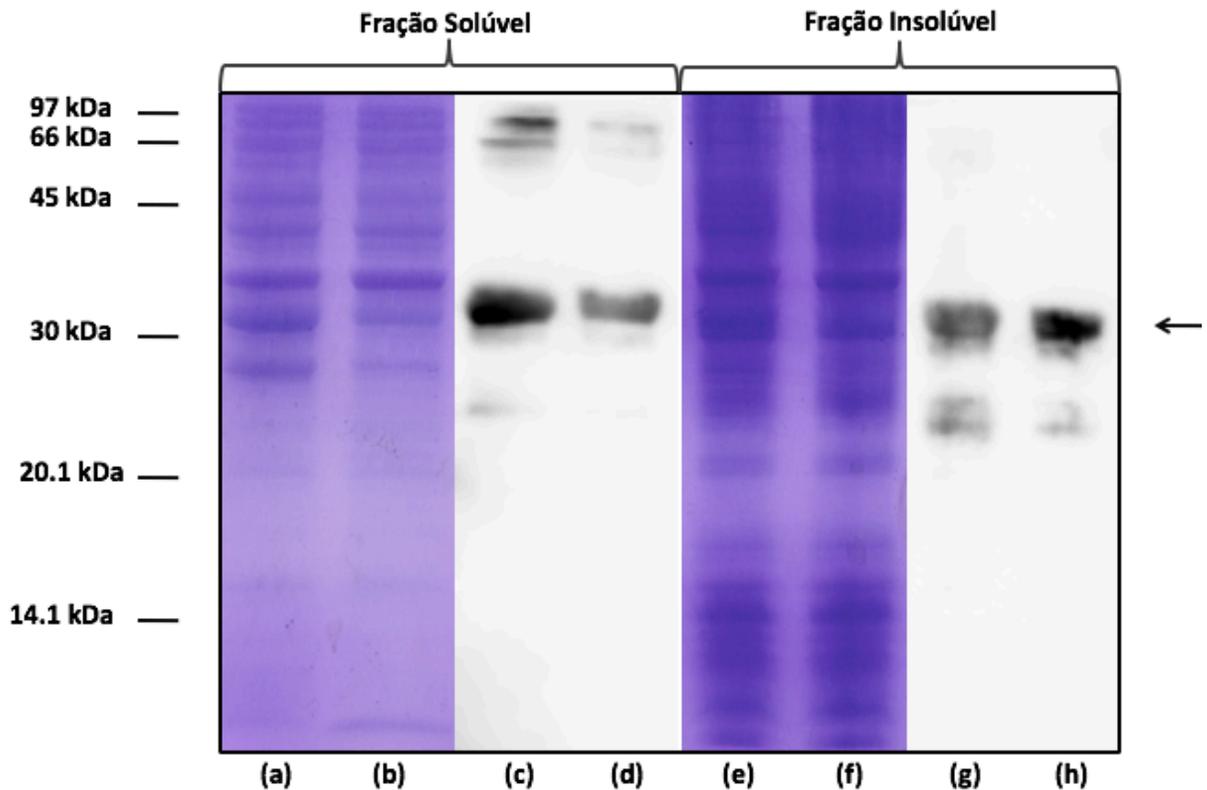
### 5.3 Marcação de proteínas por biotilação via APEX2 recombinante

O gene da APEX foi clonado no vetor de expressão pET-100/D-TOPO (Novagen) pela empresa ThermoFisher para expressão em *E. coli*. A expressão é regulada pelo promotor T7 e esse plasmídeo permite a produção da proteína recombinante fusionada com uma cauda de 6 histidinas na porção N-terminal e contém um sítio de enteroquinase (EK) (que permite a remoção das caudas) e um gene marcador de resistência ao antibiótico ampicilina. Foi adicionado também ao vetor um peptídeo flag na região N-terminal da sequência da proteína. No anexo 1 está descrita a sequência da APEX2 clonada no vetor.

A massa molecular teórica predita para APEX2, calculada pelo *software* ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) e adicionada a cauda de histidina e ao flag, é 30 kDa. A enzima recombinante contém 282 aminoácidos e seu ponto isoelétrico teórico é 5,34.

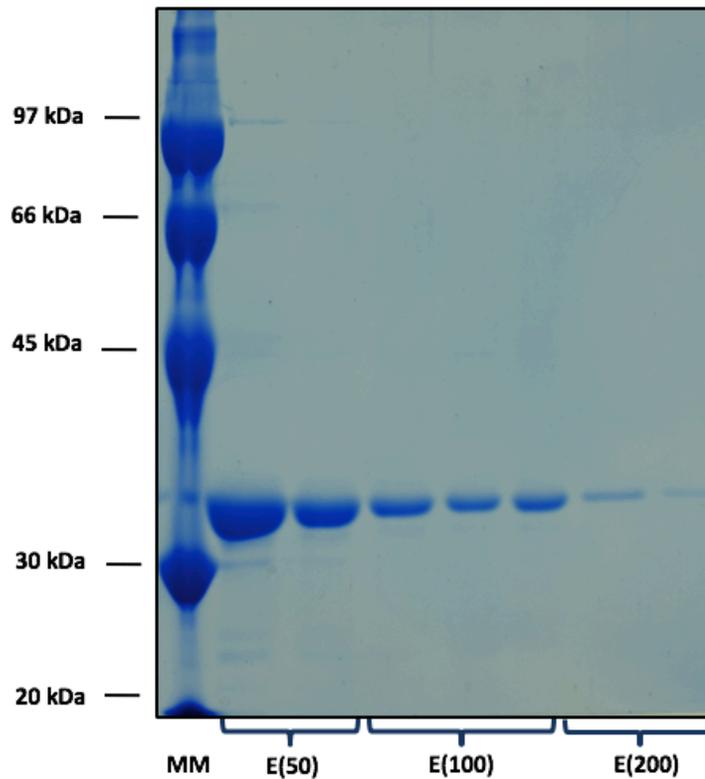
Para expressar a proteína recombinante, o plasmídeo foi introduzido, via transformação (por choque térmico) de células *E. coli* competentes da linhagem bacteriana BL21DE3. A indução da expressão foi realizada em duas condições testes inicialmente: IPTG 1 mM a uma temperatura de 37°C durante 3h e IPTG 0,5 mM em temperatura ambiente durante a noite toda. Para verificar o nível de expressão, os extratos solúveis e insolúveis, preparados por lise da bactéria com BugBuster™, foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE 12% (Figura 16). Foi verificado que o extrato solúvel apresentou uma abundante quantidade de proteína com aproximadamente 30 kDa.

Para confirmar a expressão da APEX2 recombinante, um teste de WB foi conduzido utilizando-se a fração solúvel e insolúvel de *E. coli*. No ensaio foi possível verificar a presença da proteína recombinante em ambas as frações. A condição que permitiu a expressão de uma maior quantidade de APEX2 na forma solúvel foi a 1 mM de IPTG, 37°C por 3h, como pode ser observado na Figura 16.

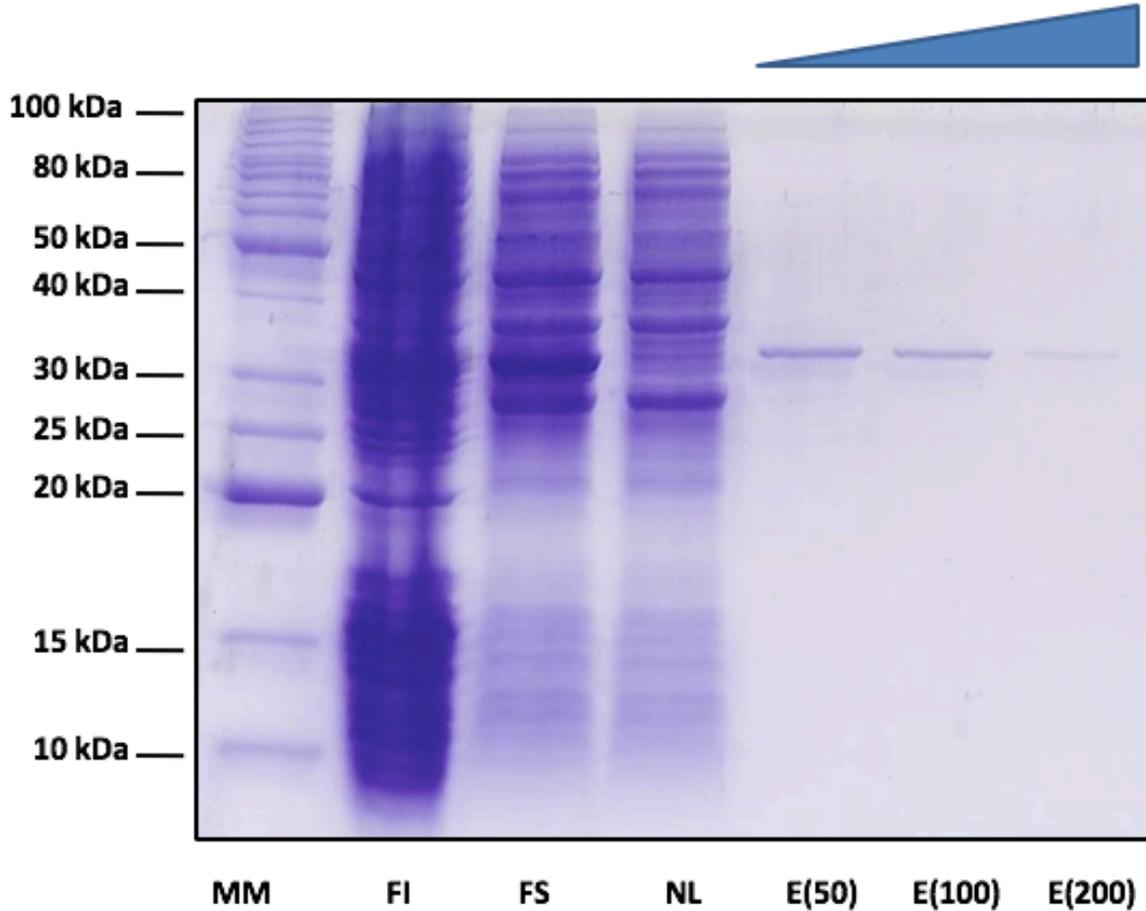


**Figura 5: Análise da expressão da APEX2 recombinante nas frações solúvel e insolúvel.** (a) Gel de poliacrilamida 12% (corado com azul de *Coomassie Blue*) da fração solúvel de BL21(DE3) induzidas a 37°C por 3 h com 1 mM IPTG. (b) indução a 25°C por 18 h com 0,5 mM IPTG. (c) e (d) *Western blotting* com anticorpo anti-His das frações solúveis (a) e (b) respectivamente. (e) Gel de poliacrilamida 12% da fração insolúvel de BL21(DE3) induzidas a 37°C por 3 h com 1 mM IPTG e (f) a 25°C por 18 h com 0,5 mM IPTG. (g) e (h) *Western blotting* com anticorpo anti-His das frações solúveis (e) e (f) respectivamente.

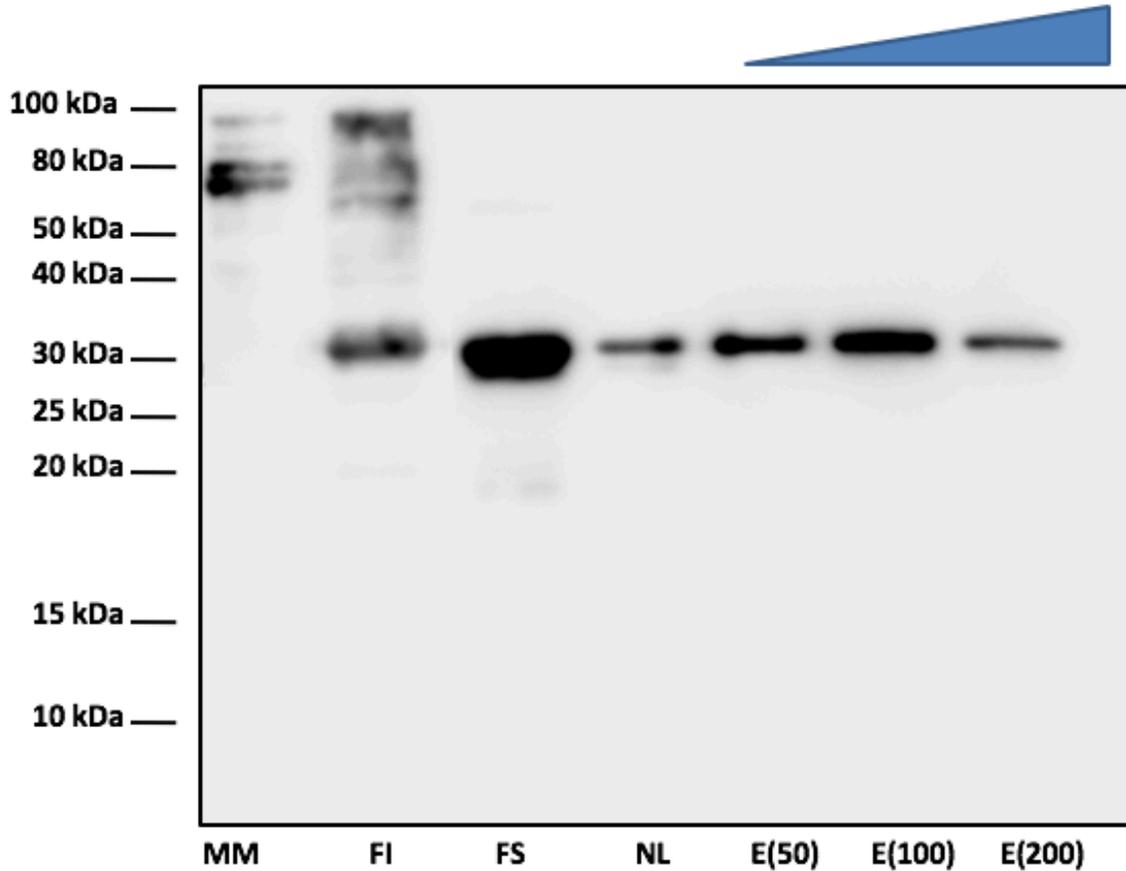
Ao término da indução, a amostra foi lisada, centrifugada e submetida a purificação em coluna de resina níquel-agarose. A fração solúvel (sobrenadante) foi adicionada à resina e, após lavagem extensiva, a proteína recombinante foi eluída com tampão contendo crescentes concentrações de imidazol (50 a 200 mM). As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 12% para avaliar a quantidade de APEX2 nas frações eluídas e o grau de pureza. Observou-se que a proteína começou a ser liberada em grandes quantidades com 50 mM de imidazol, porém essas frações continham também muitos contaminantes. Em contraste, as frações eluídas com 100 mM de Imidazol são mais limpas e a apresentam concentrações razoáveis de APEX2 (Figura 17 e 18). Para confirmar se a proteína purificada era a APEX2 recombinante, foi realizado um segundo ensaio de WB utilizando as amostras no gel de SDS-PAGE 12% da Figura 18. O resultado dessa análise confirmou a presença da APEX2 recombinante nas frações eluídas (Figura 19).



**Figura 17: Purificação da fração solúvel da APEX2 recombinante por cromatografia de afinidade.** Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de *Coomassie Blue*. (MM) marcador molecular (Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit, 17-0446-01) (em kDa). Eluições foram realizadas com 50 mM de Imidazol E(50), com 100 mM de Imidazol E(100) e com 200 mM de Imidazol E(200). Em cada poço do gel foi aplicado 10  $\mu$ L de amostra.

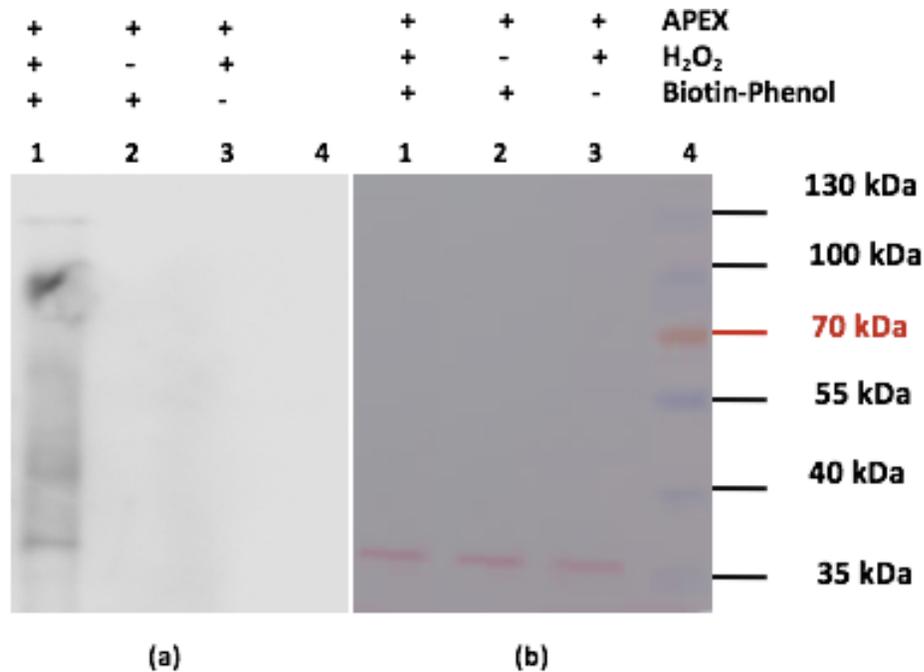


**Figura 18: Purificação da fração solúvel da APEX2 recombinante por cromatografia por afinidade.** Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de *Coomassie Blue*. Em cada poço do gel foram aplicados 10  $\mu$ L de amostra: (MM) marcador molecular (kDa) BenchMark™ Protein Ladder – Invitrogen, (FI) fração insolúvel, (FS) fração solúvel, (NL) fração não-ligada. Eluições foram realizadas com quatro volumes de 50 mM de Imidazol E(50), de 100 mM de Imidazol E(100) e de 200 mM de Imidazol E(200).



**Figura 19: *Western blotting* da purificação da APEX2 recombinante.** A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo primário anti-calde de 6 histidinas, secundário anti-IgG e revelada com substrato quimioluminescente (ECL TM Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

As frações eluídas a 100 mM foram submetidas a diálise para remoção do imidazol e troca do tampão para o PBS. O tampão PBS foi usado por ser o de escolha em testes de atividade com a APEX2 (LEE *et al.*, 2015). Para averiguar se a APEX2 recombinante produzida estava ativa e se as condições da reação estavam adequadas, foi conduzido um teste da atividade da biotilação (Figura 20). Observa-se que somente o poço que continha a recombinante, o agente oxidante  $H_2O_2$  e a Biotina-Fenol foi marcado no *Western blotting*. Nota-se que outras proteínas foram marcadas, isso pode ter ocorrido devido a maior sensibilidade da detecção por WB quando comparada a da coloração por vermelho *Ponceau*, ou seja, as proteínas contaminantes da purificação que não foram evidenciadas pelo Ponceau podem ter sido detectadas pelo substrato quimioluminescente.



**Figura 6: Teste de atividade da APEX2.** (a) Coloração da membrana com *Ponceau* e (b) Revelação das proteínas biotiniladas com substrato quimioluminescente (ECL™ Prime Western blotting detection reagent, GE Healthcare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). No poço 4 continha marcadores moleculares (Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained). Na posição 1 foi realizado um teste de biotinylation pela APEX2 na presença de biotina-fenol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os poços 2 e 3 são os controles desse ensaio que não continham um dos componentes da reação.

Esse trabalho descreve a primeira vez que a APEX2 foi proposta para marcar as proteínas de superfície, no entanto a HRP (*horseradish peroxidase*) já foi utilizada para esse intento por Jiang e colaboradores, em 2012. Os autores optaram pelo uso de um reagente aromático fluorescente para marcação, a fluoresceína conjugada com arylazida, e expressaram uma HRP acoplada a subunidade B da toxina da cólera para se ligar ao receptor *ganglioside* GM1. As proteínas marcadas foram purificadas por meio do uso de anticorpos anti-fluoresceína imobilizados em uma resina e identificadas por espectrometria de massas. A partir dessa abordagem, os autores conseguiram enriquecer proteínas que conhecidamente interagem com GM1, como CD44 e *Neural cell adhesion molecule 1* (L1CAM). Jiang *et al* relataram também que descartaram o uso da biotina-arylazida, pois esse composto foi capaz de penetrar a membrana da célula e ser transformado em radical por proteínas endógenas, o que levou a marcação de proteínas intracelulares. A biotina-arylazida tem a estrutura semelhante a biotina-tiramida utilizada nesse estudo. O reagente fluoresceína-arylazida, diferentemente da biotina-fenol, não ultrapassa a membrana e ele também pode ser usado na marcação pela APEX2. Além da biotina-fenol, a biotina-arylazida e a biotina-fenol podem ser

utilizados para marcação de proteínas de superfície a partir da APEX2 recombinante que teve sua produção otimizada nesse trabalho, já que a APEX2 e a HRP são promíscuas quando ao substrato.

## 6 CONCLUSÕES

Apesar da redução do número de casos, a malária ainda é considerada a parasitose mais grave e o *Plasmodium falciparum* é a espécie responsável pelo maior número de mortes (WHO, 2018). O desenvolvimento de novos fármacos requer o conhecimento da biologia do parasito, de suas proteínas essenciais e de como elas interagem entre si. O *P. falciparum* reforma amplamente a hemácia e exporta proteínas próprias para permitir a realização de vários processos celulares inexistentes na célula hospedeira que são essenciais para sua sobrevivência e esse arsenal de proteínas pode conter alvos moleculares para o desenho de novas drogas (SPILLMAN; BECK; GOLDBERG, 2015a). Além de conhecer os componentes do exportoma, é importante descobrir também quais são as proteínas exportadas que ficam expostas ao sistema imune, ou seja, as proteínas de superfície, pois elas podem também ser alvos para o desenho de vacinas recombinantes, como foi realizado para a CSP (PARTNERSHIP, 2014). Portanto, nesse trabalho foi otimizada uma abordagem para o subfracionamento do exportoma por lise seletiva com *Streptolysin O* e foi iniciado uma estratégia de biotilação das proteínas de superfície com a ascorbato peroxidase 2 (APEX2). Além disso, buscou-se identificar as parceiras intraparasitárias da proteína PfPDI-8 por *Native blotting*. Os dois primeiros métodos ainda não haviam sido testados, enquanto o BN-BLOT já foi utilizado para estudo de outros complexos proteicos de *P. falciparum* (ZHANG *et al.*, 2017).

Após o subfracionamento do exportoma por lise seletiva com SLO, foram geradas três frações: membrana, citoplasmática e parasitária. As anotações funcionais geradas pelo *Blast2Go* demonstraram a presença de proteínas de organelas intraparasitárias, como mitocôndria, vacúolo digestivo e apicoplasto, apenas na fração parasitária. Essa análise também demonstrou que 41% das proteínas da fração membrana foram anotadas como pertencentes ao exportoma ou associadas a membrana. A fração citoplasmática gerou um número reduzido de identificações, apesar de grande variedade de proteínas visualizadas na análise por SDS-PAGE, provavelmente pelo excesso de hemoglobina nessa fração

Algumas proteínas conhecidas do exportoma, como ETRAMP, EBA-181, MESA, CLAG 3.1, EMP3, EMP1 e PHISTa, foram identificadas apenas na fração membrana. Além dessas, outras proteínas exportadas já estudadas foram identificadas na FM, como GBP130, EMP1, RESA, PTP4, KAHRP, antígeno 27/25, *reticulocyte binding protein 2a*, CLAG 9. Assim como observado em estudos que enriqueceram proteínas de superfície, foram identificadas muitas proteínas envolvidas com a síntese proteica, associadas ao DNA ou relacionadas ao metabolismo e alguns

estudos já sugeriram que essas últimas podem estar envolvidas em funções diferentes no exportoma, como a sinalização celular. Conforme esperado, foram identificadas chaperonas, proteínas da família PHIST e proteínas do citoesqueleto. As proteínas identificadas podem se localizar na membrana, em estruturas associadas ou organelas como MCs e J-dots, já que da SLO não lisa amplamente essas estruturas (VIVANCOS *et al.*, 2007, ZHANG *et al.*, 2017). Famílias de antígeno de membrana pouco abundantes, como SURFIN, RIFIN e STEVOR não foram identificadas. Também não foram identificadas proteínas conhecidas da membrana do vacúolo parasitóforo, o que reforça a especificidade da lise por SLO, como HSP101 e EXP2. Componentes importantes do exportoma foram também identificados na fração citoplasmática, como antígeno 332, proteína 14-3-3, HSP70, GBP130 e antígeno 27/25.

Para validar a presença da PfPDI-8 nas frações, realizou-se uma análise por *western blotting*. Apesar de não ter sido identificada na FC, a PDI foi marcada nas três frações FM, FC e FP. Existem outras evidências da presença dessa proteína no exportoma e, por ser uma chaperona, sua função pode estar associada ao posicionamento correto das ligações dissulfeto em proteínas recém-exportadas. Ainda não é claro se essa proteína se encontra dispersa no citosol, ou associada a alguma estrutura vesicular dentro da célula parasitada. Além dessa localização, existem indícios da presença da PfPDI-8 no retículo endoplasmático. Nesse trabalho, realizou-se uma análise das parceiras intraparasitárias da PfPDI-8 por BN-BLOT e observou-se que a PfPDI-8 se colocalizou na banda do BN-PAGE com uma proteína também conhecida do RE, a BIP. Essa interação requer confirmação por outros métodos.

Esse trabalho buscou otimizar condições de expressão e purificação APEX2 para utilizá-la para a marcação de proteínas de superfície de eritrócitos infectados com *P. falciparum*. O teste de atividade demonstrou que a enzima produzida foi capaz de biotinar a mesma e as proteínas contaminantes da purificação apenas com a presença do substrato e o agente oxidante, biotina-fenol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente.

Esse trabalho buscou explorar duas técnicas inovadoras para estudo do exportoma. A lise seletiva por SLO seguida de centrifugação é de fácil execução e permitiu a identificação de muitos componentes conhecidos do exportoma. A desvantagem dessa técnica é que ela não permite diferenciar a posição exata das proteínas dentro da célula parasitada. Esse estudo demonstrou a possibilidade de utilização da APEX2 para biotinação de proteínas de superfície, porém essa técnica ainda requer otimizações quanto às condições de reação para marcação do subproteoma de

superfície de *Plasmodium falciparum*. Por último, esse estudo utilizou a técnica de BN-PAGE e WB para investigar os complexos proteicos que contém a PfpDI-8.

## 7 PERSPECTIVAS

Um maior conhecimento do conteúdo do exportoma foi obtido nesse estudo e isso pode auxiliar trabalhos futuros que se proponham a testar a imunogenicidade das proteínas identificadas e desenvolver vacinas com múltiplos alvos.

A otimização da análise de complexos associados a proteínas específicas em extratos de *P. falciparum* por BN-BLOT abriu caminho para a análise de outras interações pelo nosso grupo. Essas análises dependem de anticorpos específicos, para que apenas complexos contendo a proteína alvo sejam marcados.

Nesse trabalho, foram analisados os dados de identificações das frações obtidas pelo subfracionamento do exportoma por lise seletiva com estreptolisina O de apenas uma replicata. Todavia, foram conduzidos mais três experimentos independentes e as amostras estão digeridas, dessalinizadas e aguardando somente a análise por espectrometria de massas. A identificação consistente dessas proteínas em mais de um experimento independente aumenta o nível de evidência e confiabilidade da presença dessas no exportoma.

A partir da otimização da produção da APEX2 recombinante, o grupo continuará testando formas de utilizá-la para marcar proteínas de superfície em condições variadas de reação.

## REFERÊNCIAS

- ALAMPALLI, Varshini *et al.* Proteome and Structural Organization of the Knob Complex on the Surface of the *Plasmodium* Infected Red Blood Cell. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 12, n. 4, p. 1–11, 2018.
- ALONSO, Pedro; NOOR, Abdisalan. The global fight against malaria is at crossroads. **The Lancet**, v. 390, n. 10112, p. 2532–2534, 2017.
- ANONG, William *et al.* Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. **Blood**, v. 114, n. 9, p. 1904–1912, 2009.
- ANTINORI, Spinello *et al.* *Plasmodium knowlesi*: The emerging zoonotic malaria parasite. **Acta Tropica**, v. 125, n. 2, p. 191–201, 2013.
- ASHBURNER, Michael *et al.* Gene Ontology : tool for the unification of biology. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2011.
- ASHLEY, Elizabeth. *et al.* Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 1533–4406, p. 411–423, 2014.
- BAKER, Arian *et al.* Subcellular localization of Pfsl6, a *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen. **Parasitology**, v. 108, n. 2, p. 129–137, 1994.
- BANNISTER, Lawrence *et al.* A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitology Today**, v. 16, n. 10, p. 427–433, 2000a.
- BANNISTER, Lawrence *et al.* Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts. **Parasitology**, v. 121, p. 273–287, 2000b.
- BANUMATHY, Gowrishankar; SINGH, Varsha; TATU, Utpal. Host chaperones are recruited in membrane-bound complexes by *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 6, p. 3902–3912, 2002.
- BARBER, Bridget *et al.* Parasite Biomass-Related Inflammation, Endothelial Activation, Microvascular Dysfunction and Disease Severity in Vivax Malaria. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2015.
- BARBER, Bridget *et al.* The Treatment of *Plasmodium knowlesi* Malaria. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 242–253, 2017.
- BARK, Sandra *et al.* Quantitative Proteomic Profiling Reveals Novel *Plasmodium falciparum* Surface Antigens and Possible Vaccine Candidates. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 17, n. 1, p. 43–60, 2017.
- BECK, Josh *et al.* PTEX component HSP101 mediates export of diverse malaria effectors into host erythrocytes. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 592–595, 2014a.

BECK, Josh *et al.* HSP101/PTEX mediates export of diverse malaria effector proteins into the host erythrocyte. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 592, 2014b.

BERZINS, Klavs; WAHLGREN, Mats; PERLMANN, Paul. Studies on the specificity of anti-erythrocyte antibodies in the serum of patients with malaria. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 54, n. 2, p. 313–8., 1983.

BLISNICK, Thierry *et al.* Pfsbp1, a Maurer's cleft *Plasmodium falciparum* protein, is associated with the erythrocyte skeleton. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 111, n. 1, p. 107–121, 2000.

BODDEY, Justin; COWMAN, Alan. *Plasmodium* Nesting: Remaking the Erythrocyte from the Inside Out. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 243–269, 2013a.

BRASIL. *MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica Brasília – DF 2010 Série A. Normas e Manuais Técnicos*. 2010. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/bvs>>.

BRYK, Agata H.; WIŚNIEWSKI, Jacek R. Quantitative analysis of human red blood cell proteome. **Journal of proteome research**, v. 16, n. 8, p. 2752-2761, 2017.

BROWN, Audrey C.; GULER, Jennifer L. SLOPE: A two-part method for the enrichment of ring stage *Plasmodium falciparum* parasites. **bioRxiv**, p. 474338, 2018.

BRUCE, Marian C. *et al.* Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium falciparum* sexual stage antigen Pfs16. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, n. 1, p. 11–22, 1994.

BULLEN, Hayley E. *et al.* Biosynthesis, localization, and macromolecular arrangement of the *Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins (PTEX). **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 11, p. 7871–7884, 2012.

BURGHHAUS, Petra; LINGELBACH, Klaus. Luciferase , When Fused to an N-terminal Signal Peptide , Is Secreted from Transfected *Plasmodium falciparum* and Transported to the Cytosol of Infected Erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 26838–26845, 2001.

BUTLER, Anthony; WU, Yu-Lin. Artemisinin (qinghaosu): a new type of antimalarial drug. **Chemical Society Reviews**, v. 21, p. 85–90, 1992.

RUG, Melanie *et al.* Export of virulence proteins by malaria-infected erythrocytes involves remodeling of host actin cytoskeleton. **Blood Journal of Hematology**, v. 124, n. 23, p. 3459–3469, 2016.

ÇIMEN, Burak. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, n. 1–2, p. 1–11, 2008.

CLAESSENS, Antoine *et al.* Generation of Antigenic Diversity in *Plasmodium falciparum* by Structured Rearrangement of Var Genes During Mitosis. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 12, 2014.

COHEN, Jessica; SARAN, Indrani; YAVUZ, Elif. Drug Packaging Health Information and Medication Adherence : Evidence from Malaria Treatment in Uganda. 2016.

COOKE, Brian. *et al.* A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells. **Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 6, p. 899–908, 2006.

COWMAN, Alan; BERRY, Drew; BAUM, Jake. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 6, p. 961–971, 2012.

COX, Francis. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 5, p. 1–9, 2010.

DA SILVA, Adelson *et al.* Secretomic Analysis Reveals Multi-Enzymatic Complexes in *Trichoderma reesei* Grown in Media Containing Lactose or Galactose. **Bioenergy Research**, v. 8, n. 4, p. 1906–1911, 2015.

DAHER, Wassim *et al.* *Plasmodium falciparum* dynein light chain 1 interacts with actin/myosin during blood stage development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 26, p. 20180–20191, 2010.

DAUBENBERGER, Claudia *et al.* The N'-terminal domain of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the apicomplexan *Plasmodium falciparum* mediates GTPase Rab2-dependent recruitment to membranes. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 8, p. 1227–1237, 2003.

DE KONING-WARD, Tania *et al.* *Plasmodium* species: Master renovators of their host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 494–507, 2016.

DESAI, Sanjay A.; BEZRUKOV, Sergey M.; ZIMMERBERG, Joshua. A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 1001, 2000.

DHORDA, Mehul *et al.* Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: A cross-sectional survey of the K13 molecular marker. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 415–421, 2015.

DLUZEWSKI, A R *et al.* Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. **Journal of Cell Science**, v. 92, n. Pt 4, p. 691–699, 1989.

DOOLAN, Denise; DOBAÑO, Carlota; BAIRD, Kevin. Acquired immunity to Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 13–36, 2009.

EHMAN, Eric *et al.* Filling the void: Proximity-based labeling of proteins in living cells. **Trends Cell Biology**, v. 46, n. 5, p. 1247–1262, 2017a.

ELSCHENBROICH, Sarah *et al.* Isolation of cell surface proteins for mass spectrometry-based proteomics. **Expert review of proteomics**, v. 7, n. 1, p. 141–154, 2010.

ELSWORTH, Brendan; CRABB, Brendan; GILSON, Paul. Protein export in malaria parasites: An update. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 355–363, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de Diagnostico Laboratorial da Malaria. 2010. Disponível em: < [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_diagnostico\\_laboratorial\\_malaria\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf)>.

FARQUHARSON, Lorna *et al.* Health beliefs and communication in the travel clinic consultation as predictors of adherence to malaria chemoprophylaxis. **British Journal of Health Psychology**, v. 9, n. 2, p. 201–217, 2004.

FIRAT-KARALAR, Elif *et al.* Proximity interactions among centrosome components identify regulators of centriole duplication. **Current Biology**, v. 24, n. 6, p. 664–670, 2014.

FLORENS, Laurence *et al.* A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 520–6, 2002.

FLORENTA, Isabelle *et al.* Cloning of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase homologue by affinity purification using the antiplasmodial inhibitor 1, 4-bis {3-[N-(cyclohexyl methyl) amino] propyl} piperazine. **FEBS letters**, v. 484, n. 3, p. 246-252, 2000.

FLORENS, Laurence *et al.* Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 1–11, 2004.

FONTAINE, Albin *et al.* *Plasmodium falciparum* infection-induced changes in erythrocyte membrane proteins. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 545–556, 2012.

FONTAINE, Albin *et al.* Specific antibody responses against membrane proteins of erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum* of individuals briefly exposed to malaria. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 276, 2010.

FRANKLAND, Sarah *et al.* Delivery of the malaria virulence protein PfEMP1 to the erythrocyte surface requires cholesterol-rich domains. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 5, p. 849-860, 2006.

GILSON, Paul *et al.* Host cell remodelling in malaria parasites: a new pool of potential drug targets. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2–3, p. 119–127, 2017.

GLENISTER, Fiona *et al.* Functional alteration of red blood cells by a megadalton protein of *Plasmodium falciparum*. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 919–928, 2009.

GOMES, Helder *et al.* Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. **Journal of Biotechnology**, v. 254, n. May, p. 51–58, 2017.

GONÇALVES, Bronner *et al.* Pregnant women: an overlooked asset to *Plasmodium falciparum* malaria elimination campaigns? **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 510–518, 2017.

GRIFFIN, Noelle; SCHNITZER, Jan. Overcoming key technological challenges in using mass spectrometry for mapping cell surfaces in tissues. **Molecular & cellular proteomics**, v. 10, n. 2, p. R110.000935, 2011.

GUIZETTI, Julien; SCHERF, Artur. Silence, activate, poise and switch! Mechanisms of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 718–726, 2013.

GUNALAN, Karthigayan *et al.* The role of the reticulocyte-binding-like protein homologues of *Plasmodium* in erythrocyte sensing and invasion. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 35–44, 2013.

HEMINGWAY, Janet *et al.* Averting a malaria disaster : will insecticide resistance derail malaria control? **The Lancet**, v. 6736, n. 15, p. 12–15, 2016.

HILLER, Luisa *et al.* A Host-Targeting Signal in Virulence Proteins Reveals a Secretome in Malarial Infection. **Science**, v. 1934, n. 2004, p. 1934–1938, 2012.

HODDER, Anthony *et al.* Analysis of structure and function of the giant protein Pf332 in *Plasmodium falciparum*. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 48–65, 2009.

HOFFMAN, Stephen *et al.* Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 8, p. 1155–1164, 2002.

HUNG, Victoria *et al.* Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. **Nature protocols**, v. 11, n. 3, p. 456–75, 2016.

ITO, Tokashi. *et al.* A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4569–4574, 2002.

JIANG, Songlin *et al.* A proteomics approach to the cell-surface interactome using the enzyme-mediated activation of radical sources reaction. **Proteomics**, v. 12, n. 1, p. 54–62, 2012.

JOHNSON, Robert *et al.* Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 11, p. 1407–1417, 2005.

JOSLING, Gabrielle A.; LLINÁS, Manuel. Sexual development in *Plasmodium* parasites: Knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 573–587, 2015.

KATS, Lev *et al.* An exported kinase (FIKK4.2) that mediates virulence-associated changes in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 319–328, 2014.

KEMMINK, Johan *et al.* The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. **Current Biology**, v. 7, n. 4, p. 239–245, 1997.

KIRK, Kiaran *et al.* *Plasmodium* permeomics: membrane transport proteins in the malaria parasite. In: *Malaria: Drugs, Disease and Post-genomic Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. p. 325-

356.

KIM, Dae; ROUX, Kyle. Filling the Void : Proximity- Based Labeling of Proteins in Living Cells. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 11, p. 1–14, 2016.

KINDERMANS, Jean-Marie *et al.* Ensuring sustained ACT production and reliable artemisinin supply. **Malaria journal**, v. 6, n. 1, p. 125, 2007.

KLAPPA, Peter *et al.* The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. **EMBO Journal**, v. 17, n. 4, p. 927–935, 1998.

KLEINSCHMIDT, Immo *et al.* Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: a WHO-coordinated, prospective, international, observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 640–649, 2018.

KRISHNAN, Karthik; WILLIAMSON, Kim. The proteasome as a target to combat malaria: Hits and Misses. **Translational Research**, v. 198, p. 40-47, 2018.

KUBLIN, James *et al.* Complete attenuation of genetically engineered *Plasmodium falciparum* sporozoites in human subjects. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. January, p. 1–11, 2017.

KÜGLER, Marion *et al.* Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE). **Photosynthesis Research**, v. 53, n. 1, p. 35-44, 1997.

KÜLZER, Simone *et al.* Parasite-encoded Hsp40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the *P. falciparum*-infected erythrocyte. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 1398–1420, 2010.

KUMI, Kwame *et al.* Parasitology International The *Plasmodium knowlesi* MAHRP2 ortholog localizes to structures connecting Sinton Mulligan ' s clefts in the infected erythrocyte. **Parasitology International**, v. 67, n. 4, p. 481–492, 2018.

KUN, F J *et al.* A putative *Plasmodium falciparum* exported serine / threonine protein kinase. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 85, n. 1, p. 41-51, 1997.

LAEMMLI, Ulrich Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LALLE, Marco *et al.* Dematin, a component of the erythrocyte membrane skeleton, is internalized by the malaria parasite and associates with *Plasmodium* 14-3-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1227–1236, 2011.

LALLOO, David *et al.* UK malaria treatment guidelines 2016. **Journal of Infection**, v. 72, n. 6, p. 635–649, 2016.

LAM, Stephanie *et al.* Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proteomics. v.

12, n. 1, p. 51–54, 2015.

LANZILLOTTI, Roberto; COETZER, Theresa. The 10 kDa domain of human erythrocyte protein 4.1 binds the *Plasmodium falciparum* EBA-181 protein. **Malaria Journal**, v. 5, p. 1–9, 2006.

LAUER, Sabine *et al.* A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. **Science**, v. 276, n. 5315, p. 1122–1125, 1997.

LEE, Jisu *et al.* An enhanced ascorbate peroxidase 2/antibody-binding domain fusion protein (APEX2-ABD) as a recombinant target-specific signal amplifier. **Chemical Communications**, v. 51, n. 54, p. 10945–10948, 2015.

LLANOS-CUENTAS, Alejandro *et al.* Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria: A multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. **The Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1049–1058, 2014.

MACHER, Bruce; YEN, Ten-Yang. Proteins at membrane surfaces-a review of approaches. **Molecular bioSystems**, v. 3, n. 10, p. 705–713, 2007.

MAGOWAN, Cathleen *et al.* *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1502, n. 3, p. 461–470, 2000.

MAGUIRE, Patricia; SHERMAN, Irwin. Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 105–112, 1990.

MAHAJAN, Babita *et al.* Protein disulfide isomerase assisted protein folding in malaria parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 9, p. 1037–1048, 2006.

MAIER, Alexander *et al.* Exported Proteins Required for Virulence and Rigidity of *Plasmodium falciparum*-Infected Human Erythrocytes. **Cell**, v. 134, n. 1, p. 48–61, 2008.

MANOUSSOPOULOS, Ioannis N.; TSAGRIS, Mina. Native electrophoresis and western blot analysis: method and applications. **Protein Blotting and Detection**. Humana Press, Totowa, NJ, 2009. p. 277-287.

MANTEL, Pierre-yves *et al.* Article Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System. **Cell host & microbe**, v. 13, n. 5, p. 521-534, 2013.

MARSH, Kevin; KINYANJUI, Sophia Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 1–2, p. 51–60, 2006.

MARTELL, Jeffrey *et al.* Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 11, 2012.

MARTI, Matthias *et al.* Proteins to the host erythrocyte targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. **Science**, v. 1930, n. 2004, p. 1930–1934, 2010.

MATTHEWS, Kathryn *et al.* The *Plasmodium* translocon of exported proteins (PTEX) component thioredoxin-2 is important for maintaining normal blood-stage growth. **Molecular Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 1167–1186, 2013.

MATTHEWS, Kathryn; PITMAN, Ethan; DE KONING-WARD, Tania. Illuminating how malaria parasites export proteins into host erythrocytes. **Cellular microbiology**, p. e13009, 2019.

MAYER, Christina *et al.* Structural analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) intracellular domain reveals a conserved interaction epitope. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7182–7189, 2012.

MERING, Von *et al.* Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. **Nature**, v. 417, p. 399–403, 2002.

MILANI, Katharine; SCHNEIDER, Timothy; TARASCHI, Theodore. Defining the Morphology and Mechanism of the Hemoglobin Transport Pathway in *Plasmodium falciparum* -Infected Erythrocytes. **Erythrocyte Cell**, v. 14, n. 4, p. 415–426, 2015.

MILLAR, SCOTT, Janet Cox-Singh. Human infections with *Plasmodium knowlesi*—zoonotic malaria. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 7, p. 640–648, 2015.

MILLHOLLAND, Melanie G. *et al.* The Malaria Parasite Progressively Dismantles the Host Erythrocyte Cytoskeleton for Efficient Egress. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 12, p. M111.010678, 2011.

MOLL, Kirsten *et al.* Methods in Malaria Research. **Evaluation**, p. 1- 3,17-21, 2008.

MORRISWOOD, Brooke *et al.* Novel bilobe components in *Trypanosoma brucei* identified using proximity-dependent biotinylation. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 2, p. 356–367, 2013.

MOURAY, Elisabeth *et al.* Biochemical properties and cellular localization of *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 337–346, 2007.

MUNDWILER-PACHLATKO, Esther; BECK, Hans-Peter. Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. 19987–19994, 2013.

NIANG, Makhtar; YAM, Xue; PREISER, Peter. The *Plasmodium falciparum* STEVOR Multigene Family Mediates Antigenic Variation of the Infected Erythrocyte. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 2, p. e1000307, 2009.

NILSSON, Sandra *et al.* *Plasmodium falciparum* Antigen 332 Is a Resident Peripheral Membrane Protein of Maurer's Clefts. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

NOEDL, Harald *et al.* Evidence of Artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 24, p. 2619–2620, 2008.

NOLTE, Dagmar *et al.* A *Plasmodium falciparum* blood stage antigen highly homologous to the glycophorin binding protein GBP. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 49, n. 2, p. 253–264, 1991.

NUNES, Marta *et al.* A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 391–403, 2007.

OBERLI, Alexander *et al.* A *Plasmodium falciparum* PHIST protein binds the virulence factor PfEMP1 and comigrates to knobs on the host cell surface. **FASEB Journal**, v. 28, n. 10, p. 4420–4433, 2014.

PACHLATKO, Esther *et al.* MAHRP2, an exported protein of *Plasmodium falciparum*, is an essential component of Maurer's cleft tethers. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1136–1152, 2010.

PANTALEO, Antonella *et al.* Analysis of changes in tyrosine and serine phosphorylation of red cell membrane proteins induced by *P. falciparum* growth. **Proteomics**, v. 10, n. 19, p. 3469–3479, 2010.

PARISH, Lindsay A. *et al.* A member of the *Plasmodium falciparum* PHIST family binds to the erythrocyte cytoskeleton component band 4.1. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2013a.

PARTNERSHIP. RTS, S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP (2014). Efficacy and safety of the RTS, S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. **PLoS medicine**, v. 11, n. 7, p. e1001685, 2014.

PEI, Xinhong *et al.* *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) destabilizes erythrocyte membrane skeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 26754–26758, 2007.

PEI, Xinhong *et al.* Structural and functional studies of interaction between *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and erythrocyte spectrin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 31166–31171, 2005.

PINTO, Sônia. Growth and Differentiation on a Trypanosome. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, n. 4, p. 225–230, 1993.

PIRNESKOSKI, Annamari *et al.* Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10374–10381, 2004.

PLEWES, Katherine; TURNER, Gareth; DONDORP, Arjen. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of coma and acute kidney injury complicating *falciparum* malaria. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 69–77, 2018.

PRAJAPATI, Surendra; SINGH, Om. Remodeling of human red cells infected with *Plasmodium*

*falciparum* and the impact of PHIST proteins. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 51, n. 3, p. 195–202, 2013.

QUEIROZ, Rayner *et al.* Comprehensive proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell surface proteins by two complementary methods. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, p. 3255–3263, 2013.

RAMACHANDRAN, Rajesh *et al.* Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 11, p. 823–827, 2002.

REGEV-RUDZKI, Neta *et al.* Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. **Cell**, v. 153, n. 5, p. 1120–1133, 2013.

RICHIE, Thomas *et al.* Progress with *Plasmodium falciparum* sporozoite (PfSPZ)-based malaria vaccines. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7452–7461, 2015.

RIECKMANN, Kelsen *et al.* Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against *falciparum* malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, n. Suppl. 1, p. 261–265, 1979.

ROSSJOHN, Jamie *et al.* Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 685–692, 1997.

ROUX, Kyle *et al.* A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 6, p. 801–810, 2012.

RUDRAPAL, Mithun brief review on malaria and current antimalarial drugs. **Current Pharma Research**, v. 1, n. 3, p. 286–292, 2011.

SAHAR, Tajali *et al.* *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding-like homologue protein 2 (PfRH2) is a key adhesive molecule involved in erythrocyte invasion. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e17102, 2011.

SALOMAO, Marcela *et al.* Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 23, p. 8026–8031, 2008.

SANDERS, Paul *et al.* The N-terminus of EXP2 forms the membrane-associated pore of the protein exporting translocon PTEX in *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biochemistry**, v. 165, n. 3, p. 239–248, 2019.

SANTANA, Marli *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the brazilian amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 5, p. 301–306, 2013.

SARGEANT, Tobias *et al.* Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. **Genome Biology**, v. 7, n. 2, 2006.

SCHAGGER, Hermann; PFEIFFER, Kathy Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 8, p. 1777–1783, 2000.

SCHÄGGER, Hermann; VON JAGOW, Gebhard. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. **Analytical Biochemistry**, v. 199, n. 2, p. 223–231, 1991.

SHARMA, Paresh et al. A CLAG3 mutation in an amphipathic transmembrane domain alters malaria parasite nutrient channels and confers leupeptin resistance. **Infection and immunity**, v. 83, n. 6, p. 2566-2574, 2015.

SCHLEGEL, Amnon. Caveolins in cholesterol trafficking and signal transduction: implications for human disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 929, 2007.

SCHOLZEN, Anja; SAUERWEIN, Robert W. Immune activation and induction of memory: lessons learned from controlled human malaria infection with *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 224-235, 2016.

SESSLER, Nicole *et al.* Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteasome using Blue Native PAGE and label-free quantitative mass spectrometry. **Amino Acids**, v. 43, n. 3, p. 1119–1129, 2012.

SHI, Hui *et al.* Life Cycle-Dependent Cytoskeletal Modifications in *Plasmodium falciparum* Infected Erythrocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.

SIAU, Anthony *et al.* Proteome mapping of *Plasmodium*: Identification of the *P. yoelii* remodelome. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–11, 2016.

SILES-LUCAS, María Del Mar; GOTTSTEIN, Bruno. The 14-3-3 protein: A key molecule in parasites as in other organisms. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 12, p. 575–581, 2003.

SIROVER, Michael. New insights into an old protein: The functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1432, n. 2, p. 159–184, 1999.

SOLYAKOV, Lev *et al.* Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 512–565, 2011.

SPILLMAN, Natalie; BECK, Josh; GOLDBERG, Daniel. Protein Export into Malaria Parasite–Infected Erythrocytes: Mechanisms and Functional Consequences. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 813–841, 2015a.

SPILLMAN, Natalie; BECK, Josh; GOLDBERG, Daniel. Protein Export into Malaria Parasite–Infected Erythrocytes: Mechanisms and Functional Consequences. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 813–841, 2015b.

SRIRAM, Dharmarajan *et al.* Progress in the research of artemisinin and its analogues as

antimalarials: an update. **Natural Product Research**, v. 18, n. 6, p. 503–527, 2004.

STOLF, Beatriz *et al.* Protein Disulfide Isomerase and Host-Pathogen Interaction. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 1749–1761, 2011.

TAMEZ, Pamela *et al.* An erythrocyte vesicle protein exported by the malaria parasite promotes tubovesicular lipid import from the host cell surface. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 8, 2008.

TATU, Utpal, SINGH, Varsha, BANUMATHY, Gowrishankar. Host Chaperones Are Recruited in Membrane-bound Complexes by *Plasmodium falciparum*. **Biochemistry**, v. 277, n. 6, p. 3902–3912, 2002.

TILLEY, Leann *et al.* The twists and turns of Maurer's cleft trafficking in *P. falciparum*-infected erythrocytes. **Traffic**, v. 9, n. 2, p. 187–197, 2008.

TISHCHENKO, Oksana; TRUHLAR, Donald G. Benchmark Ab initio calculations of the barrier height and transition-state geometry for hydrogen abstraction from a phenolic antioxidant by a peroxy radical and its use to assess the performance of density functionals. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, n. 19, p. 2834–2839, 2012.

TOKUMASU, Fuyuki *et al.* Inward cholesterol gradient of the membrane system in *P. falciparum*-infected erythrocytes involves a dilution effect from parasite-produced lipids. **Biology open**, p. 529–541, 2014.

TONKIN, Christopher *et al.* Protein targeting to destinations of the secretory pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 4, p. 381–387, 2006.

TRAGER, William; JENSEN, James B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673–675, 1976.

TZIVION, Guri; AVRUCH, Joseph. 14-3-3 Proteins: Active Cofactors in Cellular Regulation by Serine/Threonine Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 5, p. 3061–3064, 2002.

VEMBAR, Shruthi; SCHERF, Artur; SIEGEL, Nicolai. Noncoding RNAs as emerging regulators of *Plasmodium falciparum* virulence gene expression. **Current Opinion in Microbiology**, v. 20, p. 153–161, 2014.

VIGILÂNCIA, Secretaria De. Boletim Epidemiológico n. 1 2013. v. 44, p. 1–16, 2013.

VINCENSINI, Laetitia *et al.* Proteomic Analysis Identifies Novel Proteins of the Maurer's Clefts, a Secretory Compartment Delivering *Plasmodium falciparum* Proteins to the Surface of Its Host Cell. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 582–593, 2005.

VIVANCOS, Ana *et al.* The Peroxiredoxin Tpx1 Is Essential as a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Scavenger and Elena Hidalgo. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. June, p. 2288–2295, 2007.

VOLONTÉ, Daniela *et al.* Flotillins/Cavatellins Are Differentially Expressed in Cells and Tissues and Form a Hetero-oligomeric Complex with Caveolins in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 18, p. 12702–12709, 2002.

WAHLGREN, Mats; BERZINS, Klavs; PERLMANN, Paul. Characterization of the humoral immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. **Clinical and experimental immunology**, v. 53, p. 127–134, 1983.

WALLER, Karena *et al.* Interaction of the exported malaria protein Pf332 with the red blood cell membrane skeleton. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 5, p. 861–871, 2010.

WARNCKE, Jan; VAKONAKIS, Ioannis; BECK, Hans-peter. *Plasmodium* Helical Interspersed Subtelomeric ( PHIST ) Proteins , at the Center of Host Cell Remodeling. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 4, p. 905-927, 2016.

WEISS, Greta; CRABB, Brendan; GILSON, Paul. Overlaying Molecular and Temporal Aspects of Malaria Parasite Invasion. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 284–295, 2016.

WELLEMS, Thomas; PLOWE, Christopher. Chloroquine-resistant malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 6, p. 770–776, 2001.

WELLS, Timothy; BURROWS, Jeremy; BAIRD, Kevin. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 145–151, 2010.

WELLS, Timothy; VAN HUIJSDUIJNEN, Rob Hooft; VAN VOORHIS, Wesley. Malaria medicines: a glass half full? **Nature reviews**, v. 14, n. 6, p. 424–442, 2015.

WHITE, Nicholas *et al.* Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WHO. Global technical strategy for malaria 2016-2030. *WHO Geneva*, p. 1–35, 2015. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176712/1/9789241564991\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176712/1/9789241564991_eng.pdf?ua=1)>.

WRIGHT, Gavin J.; RAYNER, Julian C. *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion: Combining Function with Immune Evasion. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 1–7, 2014.

WU, Yang *et al.* Identification of phosphorylated proteins in erythrocytes infected by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, 2009.

WU, Zhenyu *et al.* Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. January, p. 3066, 2018.

YUAN, Zongfei; AGARWAL-MAWAL, Alka; PAUDEL, Hemant K. 14-3-3 Binds to and mediates phosphorylation of microtubule-associated tau protein by Ser9-phosphorylated glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in the brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 25, p. 26105–26114, 2004.

ZDOBNOV, Evgeni M; APWEILER, Rolf. InterProScan – an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 847–848, 2001.

ZHANG, Qi *et al.* Proteomic analysis of exported chaperone/co-chaperone complexes of *P. falciparum* reveals an array of complex protein-protein interactions. **Scientific Reports**, v. 7, n. August 2016, p. 1–15, 2017.

**Anexo 1 – Sequência da APEX2 que foi clonada no vetor pET100/D-TOPO**

MRGS **HHHHHH**GMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFT **MDYKDDDDK**GKSYPTVSA  
DYQDAVEKAKKKLRGFIAEKRCAPLMetLRLAFHSAGTFDKGKTGGPFGTIKHPA  
ELAHSANGLDIAVRLLEPLKAEFPILSYADFYQLAGVVAVEVTGGPKVPFHPGRE  
DKPEPPPEGRLPDPTKGS DHLRDVFGKAMetGLTDQDIVALSGGHTIGAAHKERSG  
FEGPWTSNPLIFDNSYFTELLS GEKEGLLQLPSDKALLSDPVFRPLVDKYAADEDAF  
FADYAEAHQKLSSELGFADALQLPPLERLTL D

São destacadas as caudas de 6 histidinas e FLAG.

**Anexo 2 – Proteínas de *Homo sapiens* identificadas na fração parasitária**

<b>Código</b>	<b>(%)</b>	<b>Pep</b>	<b>Pep Únicos</b>	<b>Descrição</b>
<b>P68871</b>	710.05	99	183	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
<b>P69905</b>	700.27	99	132	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2
<b>P02042</b>	635.02	99	95	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBD PE=1 SV=2
<b>P02549</b>	602.12	53	112	Spectrin alpha chain erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTA1 PE=1 SV=5
<b>P02100</b>	285.80	36	16	Spectrin beta chain erythrocytic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTB PE=1 SV=5
<b>P11277</b>	524.35	31	44	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX2 PE=1 SV=5
<b>P0DMV8</b>	429.05	34	41	Catalase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAT PE=1 SV=3
<b>P0DMV9</b>	429.05	34	41	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1
<b>P32119</b>	492.22	92	41	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1B PE=1 SV=1
<b>P04040</b>	456.90	61	33	Actin alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTA1 PE=1 SV=1
<b>P68133</b>	397.53	49	27	Carbonic anhydrase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CA1 PE=1 SV=2
<b>P00915</b>	360.12	68	16	Protein 4.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB41 PE=1 SV=4
<b>P11171</b>	342.81	20	13	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3 PE=1 SV=2
<b>P02008</b>	242.01	24	13	Carbonic anhydrase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CA2 PE=1 SV=2
<b>P06753</b>	307.60	41	14	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOD1 PE=1 SV=2
<b>P00918</b>	305.52	67	15	Hemoglobin subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBE1 PE=1 SV=2
<b>P30043</b>	278.46	65	11	Flavin reductase (NADPH) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BLVRB PE=1 SV=3
<b>P38646</b>	218.30	9	7	Ankyrin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANK1 PE=1 SV=3
<b>P16157</b>	267.51	8	11	Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APEH PE=1 SV=4

<b>P00441</b>	294.84	84	10	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX6 PE=1 SV=3
<b>P04114</b>	129.04	0	2	Hemoglobin subunit zeta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBZ PE=1 SV=2
<b>P13798</b>	266.47	13	6	Stress-70 protein mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA9 PE=1 SV=2
<b>P00558</b>	198.66	16	6	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGK1 PE=1 SV=3
<b>P30041</b>	247.11	29	6	Bisphosphoglycerate mutase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BPGM PE=1 SV=2
<b>Q96RL7</b>	110.26	1	2	Phosphoglycerate mutase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BPGM PE=2 SV=1
<b>P07738</b>	192.02	21	4	Beta-adducin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADD2 PE=1 SV=3
<b>Q06830</b>	161.16	18	3	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1
<b>P35612</b>	181.76	7	4	Tropomodulin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMOD1 PE=1 SV=1
<b>P20020</b>	112.54	1	1	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOA PE=1 SV=2
<b>P62263</b>	180.58	19	4	Delta-aminolevulinic acid dehydratase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALAD PE=1 SV=1
<b>Q8IZD2</b>	86.87	0	1	Adenylate kinase isoenzyme 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AK1 PE=1 SV=3
<b>P04075</b>	148.62	21	4	Band 3 anion transport protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC4A1 PE=1 SV=3
<b>P07384</b>	90.15	1	1	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2
<b>P35916</b>	102.60	2	2	Glutaredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLRX PE=1 SV=2
<b>O60264</b>	88.45	1	1	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B1 PE=1 SV=4
<b>P0C0L5</b>	83.85	1	2	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS13A PE=1 SV=2
<b>P28289</b>	154.71	13	3	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HPRT1 PE=1 SV=2
<b>P11215</b>	59.58	1	1	Vascular endothelial growth factor receptor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLT4 PE=1 SV=3
<b>P00568</b>	139.31	20	4	Calpain-1 catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPN1 PE=1 SV=1
<b>P00492</b>	104.01	18	2	Glutathione reductase mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSR PE=1 SV=2

<b>P13716</b>	141.29	16	3	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMARCA5 PE=1 SV=1
<b>P35754</b>	115.45	25	1	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM1 PE=1 SV=2
<b>P46100</b>	81.54	0	1	Inactive histone-lysine N-methyltransferase 2E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KMT2E PE=1 SV=1
<b>Q01432</b>	85.28	1	2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMPDH2 PE=1 SV=2
<b>P17020</b>	64.34	1	1	AMP deaminase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AMPD3 PE=1 SV=1
<b>P18669</b>	87.24	16	3	Complement C4-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4B PE=1 SV=2
<b>P02730</b>	136.38	1	1	Transcriptional regulator ATRX OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATRX PE=1 SV=5
<b>Q9NY33</b>	74.93	4	1	Dipeptidyl peptidase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPP3 PE=1 SV=2
<b>Q08495</b>	74.44	3	1	Dematin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DMTN PE=1 SV=3
<b>P12268</b>	85.94	2	1	Lactoylglutathione lyase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLO1 PE=1 SV=4
<b>P00390</b>	89.37	4	1	GMP reductase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GMPR2 PE=1 SV=1
<b>P04035</b>	54.46	2	1	Zinc finger protein 16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF16 PE=1 SV=3
<b>Q04760</b>	73.58	5	1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF5A PE=1 SV=2
<b>O60602</b>	53.62	1	1	Integrin alpha-M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGAM PE=1 SV=2
<b>Q9P2T1</b>	66.38	3	1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGCR PE=1 SV=1
<b>Q68DB7</b>	40.19	7	1	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMGCR PE=3 SV=1
<b>P00491</b>	45.59	3	1	Urea transporter 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC14A1 PE=1 SV=2
<b>P63241</b>	59.70	5	1	Purine nucleoside phosphorylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNP PE=1 SV=2
<b>P24666</b>	64.30	6	1	Mothers against decapentaplegic homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DKFZp781O1323 PE=2 SV=1

**Anexo 3 – Proteínas de *Homo sapiens* identificadas na fração citoplasmática**

<b>Código</b>	<b>(%)</b>	<b>Pep</b>	<b>Pep Único</b>	<b>Descrição</b>
<b>P68871</b>	672.70	100	260	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
<b>P69905</b>	680.38	100	215	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2
<b>P02042</b>	583.60	100	125	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBD PE=1 SV=2
<b>P69892</b>	452.37	80	46	Hemoglobin subunit gamma-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBG2 PE=1 SV=2
<b>P69891</b>	442.32	80	44	Hemoglobin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBG1 PE=1 SV=2
<b>P02100</b>	306.46	41	28	Hemoglobin subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBE1 PE=1 SV=2
<b>P02549</b>	446.81	31	68	Spectrin alpha chain erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTA1 PE=1 SV=5
<b>P11277</b>	453.76	30	56	Spectrin beta chain erythrocytic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTB PE=1 SV=5
<b>P04040</b>	425.97	46	42	Catalase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAT PE=1 SV=3
<b>P32119</b>	396.43	80	28	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX2 PE=1 SV=5
<b>P00915</b>	353.75	69	24	Carbonic anhydrase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CA1 PE=1 SV=2
<b>P16157</b>	343.07	16	24	Ankyrin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANK1 PE=1 SV=3
<b>P30041</b>	323.19	46	15	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX6 PE=1 SV=3
<b>P00918</b>	294.83	44	14	Carbonic anhydrase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CA2 PE=1 SV=2
<b>P30043</b>	247.03	50	9	Flavin reductase (NADPH) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BLVRB PE=1 SV=3
<b>P02008</b>	210.13	30	11	Hemoglobin subunit zeta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBZ PE=1 SV=2
<b>P0DMV 8</b>	201.70	17	8	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1
<b>Q06830</b>	230.80	25	6	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1
<b>P30613</b>	219.82	18	7	Pyruvate kinase PKLR OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKLR PE=1 SV=2
<b>P00558</b>	214.25	21	7	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGK1 PE=1 SV=3

<b>P07738</b>	197.29	27	10	Bisphosphoglycerate mutase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BPGM PE=1 SV=2
<b>P06753</b>	160.30	20	5	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3 PE=1 SV=2
<b>P00568</b>	251.38	46	6	Adenylate kinase isoenzyme 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AK1 PE=1 SV=3
<b>P11413</b>	111.86	5	2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G6PD PE=1 SV=4
<b>P28289</b>	163.61	4	1	Tropomodulin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMOD1 PE=1 SV=1
<b>P00352</b>	187.86	7	4	Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2
<b>P27105</b>	233.90	14	4	Erythrocyte band 7 integral membrane protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STOM PE=1 SV=3
<b>P11171</b>	171.05	8	6	Protein 4.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB41 PE=1 SV=4
<b>POC0L4</b>	86.88	1	2	Complement C4-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4A PE=1 SV=2
<b>P13798</b>	164.89	13	7	Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APEH PE=1 SV=4
<b>P04075</b>	129.37	20	5	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOA PE=1 SV=2
<b>P11215</b>	64.25	1	1	Integrin alpha-M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGAM PE=1 SV=2
<b>POC0L5</b>	89.54	1	2	Complement C4-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4B PE=1 SV=2
<b>P00441</b>	142.46	46	4	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOD1 PE=1 SV=2
<b>Q96RL7</b>	87.19	0	1	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VPS13A PE=1 SV=2
<b>Q00013</b>	165.10	6	3	55 kDa erythrocyte membrane protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MPP1 PE=1 SV=2
<b>P46100</b>	89.47	1	2	Transcriptional regulator ATRX OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATRX PE=1 SV=5
<b>Q9Y2Q0</b>	73.70	1	1	Phospholipid-transporting ATPase IA OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP8A1 PE=1 SV=1
<b>Q9UKU0</b>	76.03	2	1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSL6 PE=2 SV=4
<b>P17020</b>	63.66	1	1	Zinc finger protein 16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF16 PE=1 SV=3
<b>Q08495</b>	99.12	14	3	Dematin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DMTN PE=1 SV=3

<b>P35612</b>	137.13	7	3	Beta-adducin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADD2 PE=1 SV=3
<b>Q03167</b>	69.62	4	3	Transforming growth factor beta receptor type 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGFBR3 PE=1 SV=3
<b>Q86VB7</b>	67.04	1	1	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD163 PE=1 SV=2
<b>P13716</b>	75.01	6	1	Delta-aminolevulinic acid dehydratase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALAD PE=1 SV=1
<b>Q9NZD4</b>	100.24	21	3	Alpha-hemoglobin-stabilizing protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHSP PE=1 SV=1
<b>P02730</b>	120.69	1	1	Band 3 anion transport protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC4A1 PE=1 SV=3
<b>P30566</b>	61.83	5	1	Adenylosuccinate lyase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADSL PE=1 SV=2
<b>P48507</b>	123.41	10	2	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GCLM PE=1 SV=1
<b>P08397</b>	94.68	2	1	Porphobilinogen deaminase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMBS PE=1 SV=2
<b>Q04760</b>	74.93	4	1	Lactoylglutathione lyase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLO1 PE=1 SV=4
<b>Q9H4A3</b>	36.01	0	1	Serine/threonine-protein kinase WNK1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WNK1 PE=1 SV=2
<b>Q13630</b>	106.90	4	1	GDP-L-fucose synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSTA3 PE=1 SV=1
<b>P19474</b>	42.15	1	1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM21 PE=1 SV=1
<b>P30711</b>	92.99	4	1	Glutathione S-transferase theta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSTT1 PE=1 SV=4
<b>Q9NP58</b>	48.95	1	1	ATP-binding cassette sub-family B member 6 mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCB6 PE=1 SV=1
<b>P00491</b>	108.60	9	2	Purine nucleoside phosphorylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNP PE=1 SV=2
<b>P24666</b>	84.41	6	1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACP1 PE=1 SV=3
<b>P68133</b>	37.65	3	1	Actin alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTA1 PE=1 SV=1
<b>P20023</b>	55.94	2	1	Complement receptor type 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CR2 PE=1 SV=2
<b>P07954</b>	83.81	4	1	Fumarate hydratase mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FH PE=1 SV=3

<b>P00390</b>	41.09	4	1	Glutathione reductase mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSR PE=1 SV=2
<b>Q9Y265</b>	72.09	2	1	RuvB-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RUVBL1 PE=1 SV=1
<b>P51993</b>	56.22	3	1	Alpha-(1 3)-fucosyltransferase 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FUT6 PE=1 SV=1
<b>Q8IZD2</b>	34.23	0	1	Inactive histone-lysine N-methyltransferase 2E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KMT2E PE=1 SV=1
<b>Q6ZSX4</b>	48.30	4	1	Band 4.1-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB41L2 PE=1 SV=1
<b>C9J381</b>	45.42	2	1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMPDH1 PE=1 SV=1
<b>A0A1K 0FU49</b>	41.60	5	1	Myoglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLNG PE=3 SV=1

**Anexo 4 – Proteínas de *Homo sapiens* identificadas na fração membranar**

<b>Código</b>	<b>(%)</b>	<b>Pep</b>	<b>Pep Único</b>	<b>Descrição</b>
<b>P02549</b>	767.55	97	475	Spectrin alpha chain erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTA1 PE=1 SV=5
<b>P68871</b>	584.88	100	176	Spectrin beta chain erythrocytic OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTB PE=1 SV=5
<b>P11277</b>	709.65	95	395	Ankyrin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANK1 PE=1 SV=3
<b>P16157</b>	662.57	80	276	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
<b>P69905</b>	576.03	99	156	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2
<b>P02042</b>	495.72	100	87	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBD PE=1 SV=2
<b>P11171</b>	493.37	65	105	Protein 4.1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB41 PE=1 SV=4
<b>P32119</b>	472.74	93	67	Band 3 anion transport protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC4A1 PE=1 SV=3
<b>P02730</b>	473.15	42	93	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX2 PE=1 SV=5
<b>P16452</b>	467.92	67	70	Erythrocyte membrane protein band 4.2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB42 PE=1 SV=3
<b>Q08495</b>	395.37	89	55	Catalase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAT PE=1 SV=3
<b>P68133</b>	388.10	63	44	Alpha-adducin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADD1 PE=1 SV=2
<b>P69892</b>	404.50	99	27	Hemoglobin subunit gamma-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBG2 PE=1 SV=2
<b>P04040</b>	443.71	83	53	55 kDa erythrocyte membrane protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MPP1 PE=1 SV=2
<b>P69891</b>	397.82	99	26	Hemoglobin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBG1 PE=1 SV=2
<b>P27105</b>	375.67	64	23	Dematin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DMTN PE=1 SV=3
<b>P35611</b>	434.41	57	49	Beta-adducin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADD2 PE=1 SV=3
<b>P02100</b>	226.57	38	12	Actin alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTA1 PE=1 SV=1
<b>Q00013</b>	399.13	83	40	Erythrocyte band 7 integral membrane protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=STOM PE=1 SV=3
<b>P06753</b>	348.06	68	43	Tropomyosin alpha-3 chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TPM3 PE=1 SV=2

<b>P35612</b>	394.29	53	37	Spectrin beta chain non-erythrocytic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SPTBN1 PE=1 SV=2
<b>Q01082</b>	332.78	6	31	Tropomodulin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TMOD1 PE=1 SV=1
<b>P28289</b>	329.14	71	25	Acylamino-acid-releasing enzyme OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APEH PE=1 SV=4
<b>P0DMV9</b>	292.82	37	27	Heat shock 70 kDa protein 1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1A PE=1 SV=1
<b>P07384</b>	289.25	30	25	Heat shock 70 kDa protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA1B PE=1 SV=1
<b>P13716</b>	269.22	53	19	Adenylate kinase isoenzyme 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AK1 PE=1 SV=3
<b>A0A384NPQ2</b>	270.39	80	15	Calpain-1 catalytic subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAPN1 PE=1 SV=1
<b>Q06830</b>	270.39	80	15	Epididymis secretory sperm binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=2 SV=1
<b>P30043</b>	222.82	74	11	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX1 PE=1 SV=1
<b>P13798</b>	299.10	38	19	Delta-aminolevulinic acid dehydratase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALAD PE=1 SV=1
<b>P13987</b>	243.29	39	8	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDOA PE=1 SV=2
<b>P00568</b>	291.58	71	13	CD59 glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD59 PE=1 SV=1
<b>P30613</b>	293.85	46	16	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACP1 PE=1 SV=3
<b>P04075</b>	248.69	55	16	Keratin type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KRT1 PE=1 SV=6
<b>P00915</b>	213.95	46	7	Hemoglobin subunit epsilon OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBE1 PE=1 SV=2
<b>P23634</b>	204.83	7	8	Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2
<b>P24666</b>	233.58	85	10	Flavin reductase (NADPH) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BLVRB PE=1 SV=3
<b>P04264</b>	231.25	19	9	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G6PD PE=1 SV=4
<b>P11166</b>	215.13	15	7	Solute carrier family 2 facilitated glucose transporter member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC2A1 PE=1 SV=2
<b>P17927</b>	200.91	6	9	Carbonic anhydrase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CA1 PE=1 SV=2

<b>P00352</b>	225.23	22	11	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATP2B4 PE=1 SV=2
<b>P07738</b>	186.17	41	8	Complement receptor type 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CR1 PE=1 SV=3
<b>P11413</b>	218.91	14	7	RuvB-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RUVBL1 PE=1 SV=1
<b>P07741</b>	196.74	53	7	Carbonic anhydrase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CA2 PE=1 SV=2
<b>Q9H4A3</b>	180.96	4	7	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRDX6 PE=1 SV=3
<b>Q9Y230</b>	172.51	10	5	GDP-L-fucose synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TSTA3 PE=1 SV=1
<b>P30041</b>	188.11	34	7	Bisphosphoglycerate mutase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BPGM PE=1 SV=2
<b>Q13630</b>	187.78	19	4	Phosphoglycerate mutase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BPGM PE=2 SV=1
<b>P00918</b>	194.41	33	8	Serine/threonine-protein kinase WNK1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WNK1 PE=1 SV=2
<b>Q96RL7</b>	81.67	1	2	RuvB-like 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RUVBL2 PE=1 SV=3
<b>Q92508</b>	130.57	1	3	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GCLM PE=1 SV=1
<b>Q9NP58</b>	148.15	10	5	Band 4.1-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB41L2 PE=1 SV=1
<b>Q9Y265</b>	195.26	20	7	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2 isoform CRA_c OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DKFZp564J1082 PE=2 SV=1
<b>Q6ZSX4</b>	164.59	14	6	S-phase kinase-associated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SKP1 PE=1 SV=2
<b>P48507</b>	170.82	15	3	Basigin (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC7A11 PE=4 SV=1
<b>P02724</b>	125.55	23	4	ATP-binding cassette sub-family B member 6 mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ABCB6 PE=1 SV=1
<b>P08174</b>	68.53	5	1	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGK1 PE=1 SV=3
<b>P63208</b>	159.17	47	4	Semaphorin-7A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SEMA7A PE=1 SV=1
<b>P04921</b>	95.60	27	3	Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PIEZO1 PE=1 SV=4
<b>P04114</b>	78.36	0	2	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM58 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM58 PE=2 SV=2

<b>P00558</b>	144.45	8	2	Ras-related protein Rap-2b OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAP2B PE=1 SV=1
<b>P23276</b>	122.31	9	4	Glycophorin-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GYP A PE=1 SV=2
<b>P00390</b>	118.23	6	2	Purine nucleoside phosphorylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PNP PE=1 SV=2
<b>P11215</b>	66.60	1	1	Porphobilinogen deaminase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HMBS PE=1 SV=2
<b>P08397</b>	122.57	19	4	Kell blood group glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KEL PE=1 SV=2
<b>P19474</b>	88.16	13	4	Fumarate hydratase mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FH PE=1 SV=3
<b>P61225</b>	126.71	30	4	Exportin-7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XPO7 PE=1 SV=3
<b>Q8NG06</b>	130.41	6	2	Glutathione reductase mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSR PE=1 SV=2
<b>O75326</b>	134.97	8	3	Methylosome subunit pICln OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLNS1A PE=1 SV=1
<b>P07954</b>	122.19	11	3	S-formylglutathione hydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ESD PE=1 SV=2
<b>P17020</b>	67.19	1	1	Adenylosuccinate lyase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADSL PE=1 SV=2
<b>P54105</b>	116.45	16	2	Uroporphyrinogen-III synthase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UROS PE=1 SV=1
<b>A0A346RCR1</b>	150.38	72	3	Glycophorin-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GYP C PE=1 SV=1
<b>P0C0L4</b>	54.50	1	1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM21 PE=1 SV=1
<b>Q9UIA9</b>	118.25	3	2	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2
<b>P00491</b>	124.84	17	3	Glutaredoxin-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GLRX PE=1 SV=2
<b>P10768</b>	114.28	22	3	40S ribosomal protein S17 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPS17 PE=1 SV=2
<b>P00747</b>	92.38	6	2	Complement decay-accelerating factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD55 PE=1 SV=4
<b>P30566</b>	100.06	6	2	Zinc finger protein 16 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF16 PE=1 SV=3
<b>D3DT02</b>	49.91	2	1	Integrin alpha-M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITGAM PE=1 SV=2
<b>P10746</b>	95.96	16	2	Ammonium transporter Rh type A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RHAG PE=1 SV=2

<b>P18669</b>	49.40	8	1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HPRT1 PE=1 SV=2
<b>P35754</b>	75.75	25	1	K light chain variable region (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 PE=2 SV=1
<b>Q02094</b>	63.04	6	1	Complement C4-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4A PE=1 SV=2
<b>P35916</b>	39.63	1	1	Complement C4-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4B PE=1 SV=2
<b>Q92835</b>	36.95	1	1	Cytochrome b reductase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYBRD1 PE=1 SV=1
<b>Q9UKV3</b>	38.17	1	1	Rh blood group antigen Evans OS=Homo sapiens OX=9606 PE=2 SV=1
<b>O60674</b>	39.92	1	1	Blood group Rh(D) polypeptide OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RHD PE=1 SV=3
<b>P20839</b>	33.37	2	1	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4A isoform CRA_a OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPB41L4A PE=4 SV=1
<b>Q9NY33</b>	48.09	2	1	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGAM1 PE=1 SV=2
<b>Q9UDY6</b>	34.88	2	1	Cathepsin E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CTSE PE=1 SV=3
<b>Q8NDB2</b>	27.48	2	1	Dipeptidyl peptidase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DPP3 PE=1 SV=2
<b>P08708</b>	71.60	19	1	Small integral membrane protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SMIM1 PE=1 SV=1
<b>Q13351</b>	32.42	1	1	Tyrosine-protein kinase JAK2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=JAK2 PE=1 SV=2
<b>P14091</b>	48.51	2	1	Vascular endothelial growth factor receptor 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLT4 PE=1 SV=3
<b>B2RUZ4</b>	43.75	28	1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACIN1 PE=1 SV=2
<b>A2NXP9</b>	57.73	8	1	Phosphatidylinositol 3 4 5-trisphosphate 5-phosphatase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=INPP5D PE=1 SV=2
<b>P51811</b>	33.75	6	1	Tripartite motif-containing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRIM10 PE=1 SV=3
<b>Q9UHQ9</b>	27.72	4	1	Atypical chemokine receptor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACKR1 PE=1 SV=3
<b>P00441</b>	27.93	14	1	Membrane transport protein XK OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XK PE=1 SV=5
<b>Q9P2T1</b>	33.71	3	1	GMP reductase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GMPR2 PE=1 SV=1

<b>P00492</b>	61.30	6	1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMPDH1 PE=1 SV=1
<b>Q53TN4</b>	53.99	4	1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMPDH1 PE=1 SV=2
<b>Q9UK74</b>	52.68	4	1	Krüppel-like factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KLF1 PE=1 SV=1
<b>Q16570</b>	34.15	2	1	NADH-cytochrome b5 reductase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R3 PE=1 SV=3
<b>P20719</b>	30.70	5	1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SOD1 PE=1 SV=2
<b>P22061</b>	29.80	11	1	NADH-cytochrome b5 reductase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CYB5R1 PE=1 SV=1
<b>P00387</b>	29.14	9	1	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BANK1 PE=1 SV=3

Anexo 5 – Proteínas de *Plasmodium falciparum* identificadas na fração parasitária

PlasmID	(%)	Pep.	Pep. Único	Descrição
PF3D7_0818900	65	68	62	heat shock protein 70
PF3D7_1015900	86	60	60	enolase
PF3D7_1462800	90	47	46	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PF3D7_0207600	46	52	48	serine repeat antigen 5
PF3D7_0608800	63	41	39	ornithine aminotransferase
PF3D7_1357000	78	40	40	elongation factor 1-alpha
PF3D7_1357100	78	40	40	elongation factor 1-alpha
PF3D7_1324900	51	20	18	L-lactate dehydrogenase
PF3D7_0917900	57	41	38	heat shock protein 70
PF3D7_1343000	90	32	30	phosphoethanolamine N-methyltransferase
PF3D7_1444800	62	33	33	fructose-bisphosphate aldolase
PF3D7_0922500	76	36	36	phosphoglycerate kinase
PF3D7_0708400	54	45	43	heat shock protein 90
PF3D7_0922200	62	30	30	S-adenosylmethionine synthetase
PF3D7_0619400	38	28	28	cell division cycle protein 48 homologue putative
PF3D7_0520900	30	16	16	adenosylhomocysteinase
PF3D7_1008700	50	19	19	tubulin beta chain
PF3D7_0627500	76	15	15	protein DJ-1
PF3D7_1016300	20	22	22	GBP130 protein
PF3D7_1134000	29	16	16	heat shock protein 70
PF3D7_1451100	26	19	19	elongation factor 2
PF3D7_0818200	83	25	25	14-3-3 protein
PF3D7_1246200	64	26	22	actin I
PF3D7_1302100	72	19	19	gamete antigen 27/25
PF3D7_0307200	44	19	19	60S ribosomal protein L7 putative
PF3D7_1235600	38	17	17	serine hydroxymethyltransferase
PF3D7_1011800	13	16	16	PRE-binding protein
PF3D7_1224300	27	22	22	polyadenylate-binding protein 1 putative
PF3D7_1222300	27	22	19	endoplasmic reticulum protein putative
PF3D7_1223100	27	16	16	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit
PF3D7_1004000	50	16	16	60S ribosomal protein L13 putative
PF3D7_0322900	54	19	19	40S ribosomal protein S3A putative
PF3D7_0814200	56	19	19	DNA/RNA-binding protein Alba 1
PF3D7_0903700	41	14	7	alpha tubulin 1

PF3D7_1228600	26	20	19	merozoite surface protein 9
PF3D7_0507100	47	18	18	60S ribosomal protein L4
PF3D7_0626800	52	24	24	pyruvate kinase
PF3D7_0813900	59	12	12	40S ribosomal protein S16 putative
PF3D7_1434300	23	11	11	Hsp70/Hsp90 organizing protein
PF3D7_0415900	44	13	13	60S ribosomal protein L15 putative
PF3D7_0511800	26	14	14	inositol-3-phosphate synthase
PF3D7_1424400	38	12	11	60S ribosomal protein L7-3 putative
PF3D7_0831700	34	19	12	heat shock protein 70
PF3D7_1130200	43	11	11	60S ribosomal protein P0
PF3D7_1117700	97	25	25	GTP-binding nuclear protein RAN/TC4
PF3D7_0317600	69	14	13	40S ribosomal protein S11 putative
PF3D7_0207700	15	13	8	serine repeat antigen 4
PF3D7_0306800	42	16	16	T-complex protein 1 subunit beta
PF3D7_1465900	63	17	17	40S ribosomal protein S3
PF3D7_1447000	44	14	13	40S ribosomal protein S5
PF3D7_1439900	70	17	16	triosephosphate isomerase
PF3D7_0705400	22	16	15	DNA replication licensing factor MCM7
PF3D7_0708800	17	14	14	heat shock protein 110
PF3D7_1309100	30	8	8	60S ribosomal protein L24 putative
PF3D7_1361900	39	12	9	proliferating cell nuclear antigen 1
PF3D7_0621200	55	18	17	pyridoxine biosynthesis protein PDX1
PF3D7_0905400	14	10	10	high molecular weight rhoptry protein 3
PF3D7_0422400	71	16	16	40S ribosomal protein S19
PF3D7_1311900	15	6	6	V-type proton ATPase catalytic subunit A
PF3D7_0827900	45	17	17	protein disulfide isomerase
PF3D7_1408600	38	9	9	40S ribosomal protein S8e putative
PF3D7_0517000	48	11	10	60S ribosomal protein L12 putative
PF3D7_1120100	46	12	12	phosphoglycerate mutase putative
PF3D7_0919000	30	9	9	nucleosome assembly protein
PF3D7_1242700	50	10	10	40S ribosomal protein S17 putative
PF3D7_1427900	27	11	11	leucine-rich repeat protein
PF3D7_1115600	42	9	8	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PF3D7_1203700	24	10	9	nucleosome assembly protein
PF3D7_0406100	19	7	7	V-type proton ATPase subunit B
PF3D7_1438900	38	6	6	thioredoxin peroxidase 1
PF3D7_1012400	58	15	15	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
PF3D7_0903900	40	7	7	60S ribosomal protein L32
PF3D7_1204300	45	7	7	eukaryotic translation initiation factor 5A

PF3D7_0322000	39	10	9	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PF3D7_1454400	16	11	11	aminopeptidase P
PF3D7_1229400	42	6	6	macrophage migration inhibitory factor
PF3D7_1342000	37	13	13	40S ribosomal protein S6
PF3D7_1341200	49	10	10	60S ribosomal protein L18 putative
PF3D7_0802200	39	10	10	1-cys peroxiredoxin
PF3D7_0932200	30	6	6	profilin
PF3D7_1460700	53	8	8	60S ribosomal protein L27
PF3D7_1366500	58	10	10	nucleoside diphosphate kinase
PF3D7_1351400	27	7	7	60S ribosomal protein L17 putative
PF3D7_1353900	30	5	5	proteasome subunit alpha type-7 putative
PF3D7_0814000	33	9	8	60S ribosomal protein L13-2 putative
PF3D7_1027300	11	5	5	peroxiredoxin
PF3D7_1365900	65	10	10	ubiquitin-60S ribosomal protein L40
PF3D7_0915400	9	10	10	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
PF3D7_1426000	41	8	8	60S ribosomal protein L21
PF3D7_0527000	9	6	6	DNA replication licensing factor MCM3 putative
PF3D7_1105400	28	6	6	40S ribosomal protein S4 putative
PF3D7_0513300	42	13	13	purine nucleoside phosphorylase
PF3D7_1027800	30	11	10	60S ribosomal protein L3
PF3D7_1311500	18	7	7	26S protease regulatory subunit 7 putative
PF3D7_1347500	31	11	10	DNA/RNA-binding protein Alba 4
PF3D7_1468700	22	7	7	eukaryotic initiation factor 4A
PF3D7_1015600	23	10	10	heat shock protein 60
PF3D7_0307100	33	5	5	40S ribosomal protein S12 putative
PF3D7_0419600	35	10	10	ran-specific GTPase-activating protein 1 putative
PF3D7_1424100	26	7	7	60S ribosomal protein L5 putative
PF3D7_0422300	29	8	1	alpha tubulin 2
PF3D7_1437900	17	7	6	HSP40 subfamily A
PF3D7_1446200	7	4	4	M17 leucyl aminopeptidase
PF3D7_1007900	14	6	6	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D putative
PF3D7_1019400	62	6	6	60S ribosomal protein L30e putative
PF3D7_0929400	8	8	7	high molecular weight rhoptry protein 2
PF3D7_0516200	40	8	8	40S ribosomal protein S11
PF3D7_1034900	10	6	6	methionine--tRNA ligase
PF3D7_0719600	27	5	5	60S ribosomal protein L11a putative
PF3D7_1006200	56	8	8	DNA/RNA-binding protein Alba 3
PF3D7_0920800	14	5	5	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase

PF3D7_1108600	35	11	11	endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein
PF3D7_0913200	25	6	6	elongation factor 1-beta
PF3D7_0813300	17	8	7	conserved protein unknown function
PF3D7_1474800	40	7	7	proteasome subunit alpha type-1 putative
PF3D7_0930300	4	5	5	merozoite surface protein 1
PF3D7_1346300	27	6	6	DNA/RNA-binding protein Alba 2
PF3D7_1130400	21	8	8	26S protease regulatory subunit 6A putative
PF3D7_0505800	22	3	3	small ubiquitin-related modifier
PF3D7_0727400	42	8	8	proteasome subunit alpha type-5 putative
PF3D7_0520000	50	8	8	40S ribosomal protein S9 putative
PF3D7_1104400	13	5	4	thioredoxin-like mero protein
PF3D7_1229500	9	5	4	T-complex protein 1 subunit gamma
PF3D7_1302800	27	8	8	40S ribosomal protein S7 putative
PF3D7_1232100	14	6	6	60 kDa chaperonin
PF3D7_0413600	27	8	8	26S protease regulatory subunit 6B putative
PF3D7_1105100	68	9	9	histone H2B
PF3D7_1441200	23	4	4	60S ribosomal protein L1 putative
PF3D7_1142600	31	5	5	60S ribosomal protein L35ae putative
PF3D7_0617200	16	5	5	conserved protein unknown function
PF3D7_0319600	29	4	4	elongation factor 1-delta putative
PF3D7_1129100	8	5	5	parasitophorous vacuolar protein 1
PF3D7_1341300	40	8	8	60S ribosomal protein L18-2 putative
PF3D7_1414300	24	5	5	60S ribosomal protein L10 putative
PF3D7_1431700	30	5	5	60S ribosomal protein L14 putative
PF3D7_1126200	21	4	4	40S ribosomal protein S18 putative
PF3D7_0614500	19	4	4	60S ribosomal protein L19
PF3D7_1306400	12	3	3	26S protease regulatory subunit 10B putative
PF3D7_1130100	64	8	8	60S ribosomal protein L38
PF3D7_1026800	21	4	4	40S ribosomal protein S2
PF3D7_1358800	21	3	3	40S ribosomal protein S15
PF3D7_1338200	23	5	4	60S ribosomal protein L6 putative
PF3D7_1115300	11	5	5	cysteine proteinase falcipain 2b
PF3D7_1115700	11	5	5	cysteine proteinase falcipain 2a
PF3D7_0925900	29	4	4	parasitophorous vacuolar protein 5 putative
PF3D7_1006800	23	5	5	single-strand telomeric DNA-binding protein GBP2 putative

PF3D7_0902800	7	5	4	serine repeat antigen 9
PF3D7_1113400	21	5	5	ubiquitin domain-containing protein DSK2 putative
PF3D7_0213100	12	3	3	protein SIS1
PF3D7_0316800	51	7	7	40S ribosomal protein S15A putative
PF3D7_1354500	10	3	3	adenylosuccinate synthetase
PF3D7_1344200	7	6	6	heat shock protein 110 putative
PF3D7_0211800	15	6	6	asparagine--tRNA ligase
PF3D7_0810000	63	5	4	acyl-CoA binding protein putative
PF3D7_1434500	1	7	3	dynein-related AAA-type ATPase putative
PF3D7_1008900	19	3	3	adenylate kinase
PF3D7_1149000	1	4	3	antigen 332 DBL-like protein
PF3D7_0624000	16	5	5	hexokinase
PF3D7_0217800	44	5	5	40S ribosomal protein S26
PF3D7_1136300	3	3	2	tudor staphylococcal nuclease
PF3D7_1333000	23	4	4	20 kDa chaperonin
PF3D7_0610800	7	5	4	transketolase
PF3D7_1317100	6	5	5	DNA replication licensing factor MCM4
PF3D7_1412500	18	5	1	actin II
PF3D7_0511000	32	5	5	translationally-controlled tumor protein homolog
PF3D7_0605100	5	4	3	RNA-binding protein putative
PF3D7_1205600	21	6	5	tetratricopeptide repeat protein putative
PF3D7_1460300	13	2	2	60S ribosomal protein L29 putative
PF3D7_1410600	9	4	4	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma putative
PF3D7_1311800	5	6	6	M1-family alanyl aminopeptidase
PF3D7_1109900	37	6	5	60S ribosomal protein L36
PF3D7_0934500	14	5	5	V-type proton ATPase subunit E putative
PF3D7_0110700	20	6	6	chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain putative
PF3D7_0807800	8	3	3	26S proteasome regulatory subunit RPN10 putative
PF3D7_1116700	7	3	3	dipeptidyl aminopeptidase 1
PF3D7_1132200	17	6	6	T-complex protein 1 subunit alpha
PF3D7_1248900	14	5	5	26S protease regulatory subunit 8 putative
PF3D7_0522400	0	6	2	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1360800	4	5	5	falcilysin
PF3D7_0207800	6	4	3	serine repeat antigen 3
PF3D7_1323400	29	6	6	60S ribosomal protein L23

<b>PF3D7_0209800</b>	25	7	6	ATP-dependent RNA helicase UAP56
<b>PF3D7_0503800</b>	29	5	3	60S ribosomal protein L31
<b>PF3D7_0305700</b>	39	4	4	ubiquitin-conjugating enzyme E2 putative
<b>PF3D7_1324300</b>	0	4	2	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
<b>PF3D7_0210100</b>	44	4	4	60S ribosomal protein L37ae putative
<b>PF3D7_1426100</b>	23	4	4	transcription factor BTF3 putative
<b>PF3D7_0207500</b>	9	7	5	serine repeat antigen 6
<b>PF3D7_0717700</b>	8	5	5	serine--tRNA ligase putative
<b>PF3D7_1110400</b>	3	4	3	RNA-binding protein putative
<b>PF3D7_1421200</b>	35	4	4	40S ribosomal protein S25
<b>PF3D7_0932300</b>	5	3	3	M18 aspartyl aminopeptidase
<b>PF3D7_1357800</b>	6	3	3	T-complex protein 1 subunit delta
<b>PF3D7_0205900</b>	3	2	2	26S proteasome regulatory subunit RPN1 putative
<b>PF3D7_1359400</b>	8	3	2	CUGBP Elav-like family member 1
<b>PF3D7_0934800</b>	10	2	2	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit
<b>PF3D7_0519400</b>	29	5	5	40S ribosomal protein S24
<b>PF3D7_0516900</b>	16	4	4	60S ribosomal protein L2
<b>PF3D7_1445900</b>	10	4	4	ATP-dependent RNA helicase DDX5 putative
<b>PF3D7_0819900</b>	22	2	2	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3 putative
<b>PF3D7_1021700</b>	0	5	2	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
<b>PF3D7_1252100</b>	2	3	3	rhoptry neck protein 3
<b>PF3D7_1331800</b>	12	2	2	60S ribosomal protein L23 putative
<b>PF3D7_1008400</b>	7	3	3	26S protease regulatory subunit 4 putative
<b>PF3D7_0527500</b>	13	4	4	Hsc70-interacting protein
<b>PF3D7_0730900</b>	5	7	7	EMP1-trafficking protein
<b>PF3D7_0710000</b>	1	3	1	conserved Plasmodium protein unknown function
<b>PF3D7_1401600</b>	8	4	4	Plasmodium exported protein (PHISTb) unknown function
<b>PF3D7_0807500</b>	11	2	2	proteasome subunit alpha type-6 putative
<b>PF3D7_1434600</b>	3	2	2	methionine aminopeptidase 2
<b>PF3D7_0721600</b>	7	2	2	40S ribosomal protein S5 putative
<b>PF3D7_1213800</b>	3	3	2	proline--tRNA ligase
<b>PF3D7_0714000</b>	22	4	4	histone H2B variant
<b>PF3D7_0813400</b>	6	4	4	conserved protein unknown function

PF3D7_0516400	6	2	2	phosducin-like protein 1 putative
PF3D7_0528200	6	3	2	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E putative
PF3D7_0309500	7	3	3	asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] putative
PF3D7_0617800	27	4	3	histone H2A
PF3D7_1323100	13	2	2	60S ribosomal protein L6 putative
PF3D7_0304800	2	4	1	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
PF3D7_0422200	1	4	1	erythrocyte membrane-associated antigen
PF3D7_1409800	9	4	4	CUGBP Elav-like family member 2 putative
PF3D7_1118200	2	2	1	heat shock protein 90 putative
PF3D7_0320300	6	2	2	T-complex protein 1 subunit epsilon
PF3D7_0804500	0	3	2	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
PF3D7_1436000	6	3	3	glucose-6-phosphate isomerase
PF3D7_0618300	30	3	3	60S ribosomal protein L27a putative
PF3D7_1144000	12	2	2	40S ribosomal protein S21
PF3D7_1212700	3	5	4	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A putative
PF3D7_0705700	19	2	2	40S ribosomal protein S29 putative
PF3D7_1466300	3	3	3	26S proteasome regulatory subunit RPN2 putative
PF3D7_1457200	35	2	2	thioredoxin 1
PF3D7_0728000	12	4	4	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
PF3D7_0309600	30	3	3	60S acidic ribosomal protein P2
PF3D7_0826700	24	5	5	receptor for activated c kinase
PF3D7_0916700	17	5	5	RNA-binding protein musashi putative
PF3D7_0113100	3	5	3	surface-associated interspersed protein 1.1 (SURFIN 1.1)
PF3D7_0214000	3	2	1	T-complex protein 1 subunit theta
PF3D7_0518300	9	2	2	proteasome subunit beta type-1 putative
PF3D7_0527100	30	4	4	ubiquitin-conjugating enzyme E2 N putative
PF3D7_0212400	0	3	1	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
PF3D7_1107900	1	3	1	mechanosensitive ion channel protein putative
PF3D7_0719700	17	3	3	40S ribosomal protein S10 putative
PF3D7_1335400	1	3	1	reticulocyte binding protein 2 homologue a
PF3D7_1335300	1	3	1	reticulocyte binding protein 2 homologue b

PF3D7_0306300	22	3	3	glutaredoxin 1
PF3D7_0807900	9	3	3	tyrosine--tRNA ligase
PF3D7_1343800	0	3	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1419800	6	3	3	glutathione reductase
PF3D7_1419800	5	3	3	glutathione reductase
PF3D7_0503300	13	3	3	serine/arginine-rich splicing factor 12
PF3D7_0305500	0	3	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1226600	8	2	1	proliferating cell nuclear antigen 2
PF3D7_1124600	5	2	2	ethanolamine kinase
PF3D7_0406900	1	3	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0218500	22	2	2	small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 putative
PF3D7_0923900	12	2	2	polyadenylate-binding protein 2 putative
PF3D7_1138500	6	4	4	protein phosphatase PPM2
PF3D7_0515300	1	3	1	phosphatidylinositol 3-kinase
PF3D7_0531100	1	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0935800	3	4	4	cytoadherence linked asexual protein 9
PF3D7_0911900	8	2	2	falstatin
PF3D7_0318200	2	4	3	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1
PF3D7_1018500	12	1	1	pre-mRNA-splicing factor RDS3 putative
PF3D7_0207400	5	5	4	serine repeat antigen 7
PF3D7_1105000	44	3	3	histone H4
PF3D7_1461300	18	1	1	40S ribosomal protein S28e putative
PF3D7_1454700	8	3	3	6-phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating
PF3D7_1024100	2	3	2	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0312800	21	3	2	60S ribosomal protein L26 putative
PF3D7_0506500	0	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1211700	8	4	4	DNA replication licensing factor MCM5 putative
PF3D7_0716800	6	2	1	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I putative
PF3D7_1420700	3	3	2	surface protein P113
PF3D7_0706000	4	3	3	importin-7 putative
PF3D7_0703700	10	2	2	conserved protein unknown function

PF3D7_1334200	6	3	2	chaperone binding protein putative
PF3D7_0317000	9	2	2	proteasome subunit alpha type-3 putative
PF3D7_1227300	1	3	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0802000	1	1	1	glutamate dehydrogenase putative
PF3D7_1219000	0	2	1	formin 2
PF3D7_1442100	28	2	2	replication factor A protein 3 putative
PF3D7_0524000	2	2	2	karyopherin beta
PF3D7_0502000	1	2	1	vacuolar protein sorting-associated protein 11 putative
PF3D7_1331100	1	2	1	DNA polymerase theta putative
PF3D7_0602200	4	1	1	MYND-type zinc finger protein putative
PF3D7_1364800	7	1	1	DNA-directed RNA polymerases I II and III subunit RPABC1 putative
PF3D7_0404600	1	4	3	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
PF3D7_0907700	9	2	2	proteasome activator 28 subunit beta putative
PF3D7_1336800	10	2	2	nuclear movement protein putative
PF3D7_1127100	18	2	2	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
PF3D7_1317800	23	3	3	40S ribosomal protein S19
PF3D7_1003500	30	3	3	40S ribosomal protein S20e putative
PF3D7_0532300	6	2	2	Plasmodium exported protein (PHISTb) unknown function
PF3D7_0931800	7	2	1	proteasome subunit beta type-6 putative
PF3D7_0413900	4	3	2	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13 putative
PF3D7_1251300	10	2	2	thymidylate kinase
PF3D7_1364100	2	2	1	6-cysteine protein
PF3D7_1305300	1	3	1	translational activator GCN1 putative
PF3D7_1414500	1	3	2	atypical protein kinase ABC-1 family putative
PF3D7_0113000	2	1	1	glutamic acid-rich protein GARP
PF3D7_0102200	1	1	1	ring-infected erythrocyte surface antigen
PF3D7_0828900	17	2	2	conserved protein unknown function
PF3D7_1441400	2	1	1	FACT complex subunit SSRP1 putative
PF3D7_0806700	1	3	1	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
PF3D7_1453700	12	2	2	HSP90 co-chaperone p23
PF3D7_1328100	8	2	2	proteasome subunit beta type-7 putative
PF3D7_1115400	1	1	1	cysteine proteinase falcipain 3

PF3D7_0910200	1	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1227100	2	1	1	DNA helicase 60
PF3D7_1428300	5	2	2	proliferation-associated protein 2g4 putative
PF3D7_0925800	1	2	1	armadillo repeat protein putative
PF3D7_0306900	20	4	3	40S ribosomal protein S23 putative
PF3D7_1029600	4	2	1	adenosine deaminase
PF3D7_1149100	3	1	1	Plasmodium exported protein unknown function
PF3D7_1149100	3	1	1	Plasmodium exported protein unknown function
PF3D7_1140200	8	2	2	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0406400	6	1	1	cytosolic glyoxalase II
PF3D7_0607000	2	2	1	translation initiation factor IF-2 putative
PF3D7_0829500	1	4	2	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1307200	5	2	1	DnaJ protein putative
PF3D7_1002400	9	2	2	transformer-2 protein homolog beta putative
PF3D7_1002400	9	2	2	transformer-2 protein homolog beta putative
PF3D7_1238100	11	2	2	calcyclin binding protein putative
PF3D7_1001200	27	2	1	acyl-CoA binding protein isoform 2 ACBP2
PF3D7_0811600	1	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_0722400	7	3	3	Obg-like ATPase 1 putative
PF3D7_1211600	1	2	1	lysine-specific histone demethylase 1 putative
PF3D7_0801000	2	3	3	Plasmodium exported protein (PHISTc) unknown function
PF3D7_0406500	1	3	1	NYN domain-containing protein putative
PF3D7_0517300	10	2	2	serine/arginine-rich splicing factor 1
PF3D7_1329100	1	3	1	myosin F putative
PF3D7_1036900	2	2	2	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0523200	1	2	1	heptatricopeptide repeat-containing protein putative
PF3D7_0505400	3	2	1	conserved protein unknown function
PF3D7_1361800	1	2	2	glideosome-associated connector
PF3D7_1402500	11	2	2	ribosomal protein S27a putative
PF3D7_1342800	4	2	2	phosphoenolpyruvate carboxykinase

PF3D7_1357900	6	1	1	pyrroline-5-carboxylate reductase putative
PF3D7_0619300	0	3	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1332900	2	3	2	isoleucine--tRNA ligase putative
PF3D7_1142500	29	3	3	60S ribosomal protein L28
PF3D7_1410400	5	2	2	rhoptry-associated protein 1
PF3D7_1022400	4	2	2	serine/arginine-rich splicing factor 4
PF3D7_1018700	2	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1423700	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1020900	17	2	2	ADP-ribosylation factor
PF3D7_0812400	2	1	1	karyopherin alpha
PF3D7_1432300	1	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0823200	7	2	1	RNA-binding protein putative
PF3D7_0706400	17	2	2	60S ribosomal protein L37
PF3D7_0308500	22	2	2	activator of Hsp90 ATPase putative
PF3D7_1224100	5	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_1351100	7	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_0608500	12	2	2	proteasome subunit alpha type-2 putative
PF3D7_1408700	0	2	1	conserved protein unknown function
PF3D7_1103100	8	1	1	60S acidic ribosomal protein P1 putative
PF3D7_0424200	1	2	1	reticulocyte binding protein homologue 4
PF3D7_0424600	7	2	2	Plasmodium exported protein (PHISTb) unknown function
PF3D7_0412300	2	2	1	phosphopantothenoylecysteine synthetase putative
PF3D7_1475400	0	2	1	cysteine repeat modular protein 4
PF3D7_0801900	0	3	2	lysine-specific histone demethylase putative
PF3D7_0721100	14	2	2	conserved protein unknown function
PF3D7_1465800	0	2	1	dynein beta chain putative
PF3D7_1216200	4	1	1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] putative
PF3D7_1436100	1	2	1	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
PF3D7_0710600	5	1	1	60S ribosomal protein L34
PF3D7_1449800	7	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_1014900	1	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1461900	1	1	1	valine--tRNA ligase putative

PF3D7_0815200	5	3	3	importin subunit beta putative
PF3D7_1201000	2	1	1	Plasmodium exported protein (PHISTb) unknown function
PF3D7_1408100	5	2	2	plasmepsin III
PF3D7_1442900	0	2	1	protein transport protein SEC7 putative
PF3D7_0204600	2	2	1	5'-3' exonuclease putative
PF3D7_0930800	0	2	1	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
PF3D7_1023100	1	3	2	dynein heavy chain putative
PF3D7_0109000	7	1	1	photosensitized INA-labeled protein PHIL1
PF3D7_1326300	3	1	1	RNA-binding protein putative
PF3D7_1407100	5	2	2	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin putative
PF3D7_1108400	8	2	2	casein kinase 2 alpha subunit
PF3D7_1366300	0	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1434200	22	2	2	calmodulin
PF3D7_1107000	20	2	2	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4 putative
PF3D7_1138100	10	1	1	ubiquitin-related modifier 1 putative
PF3D7_0512000	10	1	1	prefoldin subunit 6 putative
PF3D7_0320800	2	1	1	ATP-dependent RNA helicase DDX6
PF3D7_0528100	2	2	1	AP-1 complex subunit beta putative
PF3D7_0105300	4	1	1	cyclase-associated protein
PF3D7_0410600	3	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_1450500	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1140100	8	1	1	V-type proton ATPase subunit F putative
PF3D7_1119300	6	1	1	splicing factor U2AF small subunit putative
PF3D7_0922600	3	1	1	glutamine synthetase putative
PF3D7_0926700	2	1	1	glutamine-dependent NAD(+) synthetase putative
PF3D7_1236100	3	1	1	clustered-asparagine-rich protein
PF3D7_1361100	1	1	1	protein transport protein Sec24A
PF3D7_0704700	1	2	1	phosphopantetheine adenylyltransferase putative
PF3D7_0304200	1	1	1	EH domain-containing protein
PF3D7_0815600	7	1	1	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G putative
PF3D7_0935900	1	1	1	ring-exported protein 1
PF3D7_0918400	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function

PF3D7_1010700	8	1	1	dolichyl-phosphate-mannose--protein mannosyltransferase putative
PF3D7_1011700	3	1	1	DNA repair protein RAD23 putative
PF3D7_0603800	0	1	1	centrosomal protein CEP76 putative
PF3D7_1437200	2	1	1	ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit putative
PF3D7_1128100	4	1	1	prefoldin subunit 5 putative
PF3D7_1108500	4	1	1	succinyl-CoA synthetase alpha subunit putative
PF3D7_0106000	2	2	1	conserved protein unknown function
PF3D7_1475100	1	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1412300	16	2	2	nuclear transport factor 2 putative
PF3D7_0912500	6	2	1	SAP domain-containing protein putative
PF3D7_1321900	6	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_0707400	3	1	1	AAA family ATPase putative
PF3D7_0305100	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1231100	5	1	1	ras-related protein Rab-2
PF3D7_0822600	2	1	1	protein transport protein SEC23
PF3D7_0716400	9	1	1	transcription initiation factor IIA subunit 1 putative
PF3D7_1416900	6	1	1	prefoldin subunit 2 putative
PF3D7_1368100	9	2	2	26S proteasome regulatory subunit RPN11 putative
PF3D7_0404900	2	1	1	6-cysteine protein P41
PF3D7_0618800	1	1	1	heptatricopeptide repeat-containing protein putative
PF3D7_0909400	1	2	1	exoribonuclease putative
PF3D7_0933500	1	2	1	gamma-tubulin complex component putative
PF3D7_1134200	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0705500	1	2	1	inositol-phosphate phosphatase putative
PF3D7_1338300	3	1	1	elongation factor 1-gamma putative
PF3D7_0730800	8	1	1	Plasmodium exported protein unknown function unspecified product
PF3D7_0730800	8	1	1	Plasmodium exported protein unknown function unspecified product
PF3D7_1134800	5	2	2	coatomer subunit delta
PF3D7_0904800	2	1	1	replication protein A1 small fragment
PF3D7_1021600	5	1	1	deoxyribose-phosphate aldolase putative

PF3D7_1460800	2	1	1	snRNA-activating protein complex subunit 3 putative
PF3D7_1202900	20	1	1	high mobility group protein B1
PF3D7_0910900	3	2	1	DNA primase large subunit putative
PF3D7_0319700	1	2	1	ABC transporter I family member 1 putative
PF3D7_1408000	2	1	1	plasmepsin II
PF3D7_0804700	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0412400	0	1	1	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1
PF3D7_0426000	0	1	1	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1
PF3D7_0712900	0	1	1	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1
PF3D7_1360900	5	1	1	RNA-binding protein putative
PF3D7_1208900	1	1	1	protein phosphatase PPM11 putative
PF3D7_1118300	1	1	1	insulinase putative
PF3D7_0826100	0	1	1	HECT-like E3 ubiquitin ligase putative
PF3D7_1350100	2	1	1	lysine--tRNA ligase
PF3D7_1107300	0	1	1	polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 putative
PF3D7_0611700	22	1	1	60S ribosomal protein L39
PF3D7_1012600	2	1	1	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]
PF3D7_0421700	1	2	2	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1120000	1	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_1334800	5	1	1	MSP7-like protein
PF3D7_0210900	4	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1407800	4	1	1	plasmepsin IV
PF3D7_1349200	1	1	1	glutamate--tRNA ligase putative
PF3D7_1202100	5	1	1	SRAP domain-containing protein putative
PF3D7_1202100	5	1	1	SRAP domain-containing protein putative
PF3D7_0517400	1	1	1	FACT complex subunit SPT16 putative
PF3D7_0917600	2	1	1	pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP43 putative
PF3D7_1471600	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0629700	0	1	1	SET domain protein putative
PF3D7_1355100	1	1	1	DNA replication licensing factor MCM6
PF3D7_1416500	8	2	2	NADP-specific glutamate dehydrogenase
PF3D7_1341900	5	1	1	V-type proton ATPase subunit D putative
PF3D7_0622900	1	1	1	AP2 domain transcription factor AP2Tel

PF3D7_0520600	5	1	1	bis(5'-nucleosyl)-tetrphosphatase [asymmetrical]
PF3D7_0527900	2	1	1	ATP-dependent RNA helicase DDX41 putative
PF3D7_1413800	1	1	1	diphthamide biosynthesis protein 1 putative
PF3D7_0831100	0	1	1	surface-associated interspersed protein 8.1 (SURFIN 8.1)
PF3D7_0115000	0	1	1	surface-associated interspersed protein 1.3 (SURFIN 1.3)
PF3D7_0800700	0	1	1	surface-associated interspersed protein 8.3 (SURFIN 8.3)
PF3D7_1477600	0	1	1	surface-associated interspersed protein 14.1 (SURFIN 14.1)
PF3D7_0110400	5	1	1	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9 putative
PF3D7_1010600	12	2	2	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta
PF3D7_0724000	1	1	1	Rab GTPase activator and protein kinase putative
PF3D7_0708100	13	1	1	DNA-directed RNA polymerases I II and III subunit RPABC5 putative
PF3D7_1139800	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0416400	1	1	1	histone acetyltransferase putative
PF3D7_1008800	4	1	1	nucleolar protein 5 putative
PF3D7_1141900	2	1	1	inner membrane complex protein 1b putative
PF3D7_1328200	1	2	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1012200	3	1	1	rhoptry associated adhesin
PF3D7_1353300	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0610400	9	1	1	histone H3
PF3D7_0617900	9	1	1	histone H3 variant
PF3D7_1328000	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1335100	7	1	1	merozoite surface protein 7
PF3D7_1465500	1	1	1	potassium channel K2
PF3D7_0419400	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1103700	4	1	1	casein kinase II beta chain

PF3D7_1405600	5	1	1	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain putative
PF3D7_1431600	3	1	1	succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta putative
PF3D7_0504700	0	1	1	centrosomal protein CEP120 putative
PF3D7_1118000	6	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0107000	8	1	1	centrin-1
PF3D7_1325000	10	1	1	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6 putative
PF3D7_1410200	2	1	1	CTP synthase
PF3D7_0403400	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1212000	4	1	1	glutathione peroxidase-like thioredoxin peroxidase
PF3D7_0726800	9	1	1	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit OST2 putative
PF3D7_0732500	3	1	1	rifin
PF3D7_0504600	5	1	1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta mitochondrial putative
PF3D7_0724700	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0422700	4	1	1	eukaryotic initiation factor 4A-III putative
PF3D7_1409300	3	1	1	DNA damage-inducible protein 1 putative
PF3D7_1123900	7	1	1	13 kDa ribonucleoprotein-associated protein putative
PF3D7_1036600	3	1	1	conserved protein unknown function unspecified product
PF3D7_1036600	3	1	1	conserved protein unknown function unspecified product
PF3D7_1219900	6	1	1	ribulose-phosphate 3-epimerase putative
PF3D7_0529800	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1249100	2	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_0303700	3	1	1	lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex
PF3D7_API04300	1	1	1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' putative
PF3D7_1468100	0	1	1	kelch domain-containing protein putative
PF3D7_0804800	6	1	1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PF3D7_0223500	1	1	1	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1

PF3D7_1304900	9	1	1	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11 putative
PF3D7_1358900	2	1	1	GTP-binding protein putative
PF3D7_0606700	1	1	1	coatomer alpha subunit putative
PF3D7_1128300	1	1	1	ATP-dependent 6-phosphofructokinase
PF3D7_0817600	1	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_0803600	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1339600	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0526300	2	1	1	WD repeat-containing protein 55 putative
PF3D7_1402700	2	1	1	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein putative
PF3D7_1362200	2	1	1	RuvB-like helicase 3
PF3D7_1104000	1	1	1	phenylalanine--tRNA ligase beta subunit
PF3D7_1230700	1	1	1	protein transport protein SEC13
PF3D7_1444100	0	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0310400	1	1	1	parasite-infected erythrocyte surface protein
PF3D7_1301900	9	1	1	Plasmodium exported protein unknown function
PF3D7_1453900	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0605000	4	1	1	50S ribosomal protein L24 putative
PF3D7_1004400	2	1	1	RNA-binding protein putative
PF3D7_1143400	3	1	1	translation initiation factor eIF-1A putative
PF3D7_1035100	2	1	1	probable protein unknown function
PF3D7_1414000	6	1	1	26S proteasome regulatory subunit RPN13 putative
PF3D7_0532100	7	1	1	early transcribed membrane protein 5
PF3D7_1368600	11	1	1	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM9 putative
PF3D7_1108700	3	1	1	heat shock protein J2
PF3D7_1455900	4	1	1	polyprenol reductase putative
PF3D7_1422900	2	1	1	14-3-3 protein putative
PF3D7_1215300	17	1	1	10 kDa chaperonin
PF3D7_0322500	1	1	1	iron-sulfur assembly protein putative
PF3D7_0612900	2	1	1	nucleolar GTP-binding protein 1 putative
PF3D7_0614100	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1136500	5	1	1	casein kinase 1

PF3D7_1136500	5	1	1	casein kinase 1
PF3D7_0931400	4	1	1	PUB domain-containing protein putative
PF3D7_0806000	1	1	1	AAA family ATPase putative
PF3D7_1306800	3	1	1	RED-like protein putative
PF3D7_1473300	1	1	1	CKK domain-containing protein putative
PF3D7_1446600	10	1	1	centrin-2
PF3D7_0626700	3	1	1	ATPase
PF3D7_0923000	3	1	1	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3 putative
PF3D7_1404900	5	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0802500	1	1	1	inositol 5-phosphatase putative
PF3D7_1232500	1	1	1	CG2-related protein putative
PF3D7_0522900	1	1	1	zinc finger protein putative
PF3D7_1453800	1	1	1	glucose-6-phosphate dehydrogenase-6-phosphogluconolactonase
PF3D7_1215000	5	1	1	thioredoxin peroxidase 2
PF3D7_0402800	1	1	1	erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) pseudogene
PF3D7_1033700	2	1	1	bromodomain protein 1
PF3D7_1209200	7	1	1	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7 putative
PF3D7_1346400	2	1	1	VPS domain-containing protein
PF3D7_1100200	0	1	1	erythrocyte membrane protein 1 PfEMP1
PF3D7_0603400	1	1	1	trophozoite exported protein 1
PF3D7_0708000	1	1	1	cytoskeleton associated protein putative
PF3D7_0320900	0	2	1	histone H2A.Z
PF3D7_1012700	0	1	1	NLI interacting factor-like phosphatase putative
PF3D7_0910500	0	1	1	DNA repair protein REV1 putative
PF3D7_0605600	1	1	1	nucleoside diphosphate kinase putative
PF3D7_0814900	4	1	1	superoxide dismutase [Fe]
PF3D7_0926300	1	1	1	protein kinase putative
PF3D7_0816300	1	1	1	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0714500	4	1	1	transcription elongation factor s-II putative
PF3D7_1473400	1	1	1	conserved protein unknown function
PF3D7_1240900	1	2	1	Erythrocyte membrane protein 1
PF3D7_1417800	3	1	1	DNA replication licensing factor MCM2
PF3D7_1350200	12	1	1	small nuclear ribonucleoprotein E putative
PF3D7_0102900	3	1	1	aspartate--tRNA ligase

<b>PF3D7_0927300</b>	1	1	1	fumarate hydratase
<b>PF3D7_0524900</b>	2	1	1	S-adenosyl-L-methionine-dependent tRNA 4-demethylwyosine synthase putative
<b>PF3D7_1313800</b>	0	1	1	conserved Plasmodium membrane protein unknown function
<b>PF3D7_0927700</b>	3	1	1	serine/threonine protein phosphatase 4 putative

Anexo 6 – Proteínas de *Plasmodium falciparum* identificadas na Banda 1 do BN-PAGE

Código	(%)	Pep.	Pep. Único	Massa kDa	Massa+ PDI	Descrição
PF3D7_0708400	6	4	4	86	141	heat shock protein 90
PF3D7_0818900	13	7	4	73	128	heat shock protein 70
PF3D7_1134000	12	5	5	73	128	heat shock protein 70
PF3D7_0917900	11	6	5	72	127	heat shock protein 70
PF3D7_0105200	5	3	3	67	122	RAP protein putative
PF3D7_1322000	18	10	10	66	121	nucleoside-diphosphatase putative
PF3D7_1342800	7	3	3	66	121	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PF3D7_0919400	14	9	8	61	116	protein disulfide isomerase
PF3D7_0217900	8	6	5	60	115	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0320300	21	11	11	59	114	T-complex protein 1 subunit epsilon
PF3D7_0308200	7	4	4	59	114	T-complex protein 1 subunit eta
PF3D7_1235700	16	7	7	58	113	ATP synthase subunit beta mitochondrial
PF3D7_1357800	22	10	10	57	112	T-complex protein 1 subunit delta
PF3D7_0904800	8	4	4	56	111	replication protein A1 small fragment
PF3D7_1217900	7	3	1	56	111	PPPDE peptidase domain-containing protein putative
PF3D7_0827900	40	30	30	55	110	protein disulfide isomerase
PF3D7_0626800	21	9	9	55	110	pyruvate kinase
PF3D7_0406100	12	5	5	55	110	V-type proton ATPase subunit B
PF3D7_0933600	6	3	1	55	110	mitochondrial-processing peptidase subunit beta putative
PF3D7_1115300	6	3	2	55	110	cysteine proteinase falcipain 2b
PF3D7_1115700	6	3	1	55	110	cysteine proteinase falcipain 2a
PF3D7_0209400	16	7	7	54	109	conserved protein unknown function
PF3D7_0520900	37	20	19	53	108	adenosylhomocysteinase

PF3D7_1242800	11	4	4	52	107	rab specific GDP dissociation inhibitor
PF3D7_0209800	14	6	6	52	107	ATP-dependent RNA helicase UAP56
PF3D7_1407900	16	6	6	51	106	plasmepsin I
PF3D7_1129100	22	10	10	51	106	parasitophorous vacuolar protein 1
PF3D7_1408100	15	6	6	51	106	plasmepsin III
PF3D7_1236100	12	5	5	51	106	clustered-asparagine-rich protein
PF3D7_0316300	9	4	4	51	106	inorganic pyrophosphatase inorganic pyrophosphatase putative
PF3D7_1223100	19	9	9	50	105	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit
PF3D7_0903700	19	7	7	50	105	alpha tubulin 1
PF3D7_0110700	9	3	3	50	105	chromatin assembly factor 1 protein WD40 domain putative
PF3D7_1008700	23	9	9	49	104	tubulin beta chain
PF3D7_1104400	15	7	7	49	104	thioredoxin putative
PF3D7_1124600	17	8	8	49	104	ethanolamine kinase
PF3D7_1130400	7	3	3	49	104	26S protease regulatory subunit 6A putative
PF3D7_1015900	38	16	16	48	103	enolase
PF3D7_0212300	18	7	7	48	103	peptide chain release factor subunit 1 putative
PF3D7_1357000	23	9	9	48	103	elongation factor 1-alpha
PF3D7_1357100	23	9	9	48	103	elongation factor 1-alpha
PF3D7_1426200	7	3	1	47	102	protein arginine N-methyltransferase 1
PF3D7_0608800	34	13	13	46	101	ornithine aminotransferase
PF3D7_1442300	26	11	11	46	101	tRNA import protein tRIP
PF3D7_0911900	11	3	3	46	101	falstatin
PF3D7_1336800	13	4	4	46	101	nuclear movement protein putative
PF3D7_0922500	82	52	52	45	100	phosphoglycerate kinase
PF3D7_0722400	35	15	15	45	100	Obg-like ATPase 1 putative
PF3D7_1468700	42	21	21	45	100	eukaryotic initiation factor 4A
PF3D7_0316300	10	4	4	45	100	inorganic pyrophosphatase inorganic pyrophosphatase putative

PF3D7_0922200	20	7	7	44	99	S-adenosylmethionine synthetase
PF3D7_0626700	24	10	10	43	98	conserved protein unknown function
PF3D7_1428300	30	13	13	42	97	proliferation-associated protein 2g4 putative
PF3D7_1029600	16	6	6	42	97	adenosine deaminase
PF3D7_1246200	20	6	5	41	96	actin I
PF3D7_0306200	11	4	4	41	96	activator of Hsp90 ATPase
PF3D7_1205600	20	8	7	39	94	tetratricopeptide repeat protein putative
PF3D7_1326100	10	3	3	39	94	WD repeat-containing protein putative
PF3D7_0923000	13	4	4	38	93	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3 putative
PF3D7_1462800	37	12	12	36	91	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PF3D7_0813300	10	3	3	36	91	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_0826700	31	12	12	35	90	receptor for activated c kinase
PF3D7_1130200	23	6	6	34	89	60S ribosomal protein P0
PF3D7_1127600	15	4	4	34	89	CRAL/TRIO domain-containing protein putative
PF3D7_1247400	12	4	4	34	89	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP35
PF3D7_0517300	9	3	1	34	89	serine/arginine-rich splicing factor 1
PF3D7_1424100	36	12	12	33	88	60S ribosomal protein L5 putative
PF3D7_0419600	36	10	10	33	88	ran-specific GTPase-activating protein 1 putative
PF3D7_1226300	15	4	4	33	88	haloacid dehalogenase-like hydrolase putative
PF3D7_0104500	11	3	3	33	88	conserved protein unknown function
PF3D7_0823200	14	3	3	32	87	RNA-binding protein putative
PF3D7_1343000	30	7	7	31	86	phosphoethanolamine N-methyltransferase
PF3D7_0919000	14	5	5	31	86	nucleosome assembly protein
PF3D7_0818200	32	6	6	30	85	14-3-3 protein
PF3D7_1226600	16	4	4	30	85	proliferating cell nuclear antigen 2

PF3D7_1361900	14	4	4	30	85	proliferating cell nuclear antigen 1
PF3D7_0602200	18	4	4	29	84	MYND-type zinc finger protein putative
PF3D7_1026800	12	3	3	29	84	40S ribosomal protein S2
PF3D7_1120100	33	9	9	28	83	phosphoglycerate mutase putative
PF3D7_0814200	26	5	5	27	82	DNA/RNA-binding protein Alba 1
PF3D7_1439900	19	4	4	27	82	triosephosphate isomerase
PF3D7_0808300	16	3	1	27	82	ubiquitin regulatory protein putative
PF3D7_1302100	28	6	6	26	81	gamete antigen 27/25
PF3D7_0513300	22	4	4	26	81	purine nucleoside phosphorylase
PF3D7_0802200	29	8	8	25	80	1-cys peroxiredoxin
PF3D7_1117700	54	10	10	24	79	GTP-binding nuclear protein RAN/TC4
PF3D7_1251300	25	5	5	24	79	thymidylate kinase
PF3D7_1441200	9	3	3	24	79	60S ribosomal protein L1 putative
PF3D7_1419300	15	3	3	24	79	glutathione S-transferase
PF3D7_0925900	16	4	4	24	79	conserved Plasmodium protein unknown function
PF3D7_1320600	14	3	2	24	79	ras-related protein Rab-11A
PF3D7_0807300	16	3	3	23	78	ras-related protein Rab-18
PF3D7_1302800	24	5	5	22	77	40S ribosomal protein S7 putative
PF3D7_0923900	14	3	3	22	77	RNA-binding protein putative
PF3D7_1115600	21	5	5	21	76	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PF3D7_0627500	61	12	12	20	75	protein DJ-1
PF3D7_0719600	13	4	1	20	75	60S ribosomal protein L11a putative
PF3D7_0422400	19	3	3	19	74	40S ribosomal protein S19
PF3D7_1426100	16	3	1	19	74	transcription factor BTF3 putative
PF3D7_0517000	59	9	8	18	73	60S ribosomal protein L12 putative
PF3D7_1204300	31	4	4	17	72	eukaryotic translation initiation factor 5A
PF3D7_1358800	24	4	4	17	72	40S ribosomal protein S15
PF3D7_0516200	26	3	3	16	71	40S ribosomal protein S11

<b>PF3D7_1242700</b>	20	3	3	16	71	40S ribosomal protein S17 putative
<b>PF3D7_0307100</b>	33	4	4	15	70	40S ribosomal protein S12 putative
<b>PF3D7_1128200</b>	41	6	6	15	70	multiprotein-bridging factor 1 putative
<b>PF3D7_1365900</b>	32	3	3	14	69	ubiquitin-60S ribosomal protein L40
<b>PF3D7_1229400</b>	66	8	8	12	67	macrophage migration inhibitory factor
<b>PF3D7_1404100</b>	30	4	4	12	67	cytochrome c putative
<b>PF3D7_1019400</b>	43	4	4	11	66	60S ribosomal protein L30e putative
<b>PF3D7_1202900</b>	39	4	4	11	66	high mobility group protein B1
<b>PF3D7_1006200</b>	29	3	3	11	66	DNA/RNA-binding protein Alba 3
<b>PF3D7_1421200</b>	30	3	3	11	66	40S ribosomal protein S25