

Rodrigo Siqueira-Batista¹, Andréia Patrícia Gomes¹, Eduardo Gomes de Mendonça², Rodrigo Roger Vitorino³, Sarah Fumian Milward de Azevedo¹, Rodrigo de Barros Freitas¹, Luiz Alberto Santana¹, Maria Goreti de Almeida Oliveira²

Malária por *Plasmodium falciparum*: estudos proteômicos

Plasmodium falciparum malaria: proteomic studies

1. Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa - UFV - Viçosa (MG), Brasil.
2. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa - UFV - Viçosa (MG), Brasil.
3. Curso de Graduação em Medicina, Centro Universitário Serra dos Órgãos - UNIFESO - Teresópolis (RJ), Brasil.

RESUMO

A despeito dos avanços no tratamento e das campanhas de prevenção e de controle da malária nos distintos continentes nos quais a moléstia grassa, a entidade mórbida permanece com significativa relevância no mundo contemporâneo. O *Plasmodium falciparum* é o grande responsável pela malária grave, caracterizada por distúrbios em diferentes órgãos e sistemas, com possibilidade de evolução ao óbito. Embora incipien-

tes, os estudos proteômicos na malária têm trazido boas perspectivas para melhor compreensão dos aspectos biológicos do *Plasmodium*, assim como dos mecanismos fisiopatológicos, diagnósticos, terapêuticos e profiláticos da enfermidade. Desse modo, o objetivo do presente artigo é apresentar uma breve revisão das aplicações da análise proteômica na malária por *P. falciparum*.

Descritores: Proteoma; Malária; *Plasmodium falciparum*

INTRODUÇÃO

Os avanços no tratamento, na profilaxia e no controle da malária nos diferentes continentes têm sido bastante expressivos, mas ainda insuficientes para alterar significativamente o atual panorama da doença - de fato, a entidade mórbida permanece como a parasitose de maior impacto no planeta, figurando como a quinta causa de morte por doença infecciosa no mundo.^(1,2)

Dentre as diferentes possibilidades de evolução clínica estão os quadros de malária grave, causada usualmente por *Plasmodium falciparum* e caracterizados por distúrbios em múltiplos órgãos e sistemas - tais como acidose metabólica, acometimento do sistema nervoso central, anemia grave, choque, coagulação intravascular disseminada, disfunção pulmonar, distúrbio hepático, hipoglicemia e insuficiência renal, quadro similar, do ponto de vista fisiopatológico, à sepsis de etiologia bacteriana⁽³⁾ - os quais impõem a necessidade de tratamento em unidade de terapia intensiva (UTI) para evitar a progressão ao óbito.⁽⁴⁾ Com efeito, a transferência do enfermo com suspeita de malária grave à UTI permite a detecção precoce e o manejo adequado das complicações implicadas na evolução para o óbito.⁽⁵⁻⁷⁾

Devido às peculiaridades atinentes ao suporte clínico dessas complicações, a integração entre médicos intensivistas e especialistas em medicina tropical/doenças infecciosas possibilita um desfecho mais favorável aos pacientes acometidos.⁽⁶⁾ Dessa forma, o médico intensivista deve se apropriar dos conceitos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e terapêuticos da malária, no contexto do denominado "intensivismo em infecção".⁽⁸⁾

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 10 de Abril de 2012
Aceito em 4 de Dezembro de 2012

Autor correspondente:

Rodrigo Siqueira-Batista
Departamento de Medicina e Enfermagem
Universidade Federal de Viçosa
Avenida P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário
CEP: 36571-000 - Viçosa (MG), Brasil
E-mail: rsbatista@ufv.br

Apesar das investigações dirigidas aos novos fármacos e ao desenvolvimento de medidas de suporte mais eficazes, da aplicação de escalas que subsidiam o diagnóstico e que sejam capazes de prever o prognóstico e da utilização de métodos que detectam precocemente as complicações da infecção, o risco de morte por malária grave permanece elevado, destacando-se que, em muitas casuísticas, a letalidade é superior a 50%.^(5-7,9) Desde essa perspectiva, a abordagem biológica da interação *P. falciparum* / *Homo sapiens sapiens* pode colaborar para o desenvolvimento de novos modelos de pesquisa científica, oferecendo salutar possibilidade de avanço na compreensão dessa condição infecciosa.^(10,11) Nesse contexto, a análise proteômica - metodologia que objetiva delinear as unidades funcionais de uma célula, proteínas e sua complexa rede de interações e vias de sinalização em uma determinada moléstia subjacente⁽¹²⁾ - tem trazido boas possibilidades para o entendimento dos aspectos fisiopatológicos, diagnósticos, terapêuticos e profiláticos das enfermidades infecciosas,⁽¹³⁾ dentre as quais a malária grave.^(14,15) De fato, o aprimoramento das investigações na área de proteômica é capaz de permitir a elucidação dos mecanismos moleculares implicados no desenvolvimento da moléstia, facultando (1) a identificação de alterações na expressão de proteínas relacionadas às vias de sinalização intercelular e intracelular, (2) o desenvolvimento de marcadores biológicos para o diagnóstico precoce e para a predição prognóstica e (3) a criação de novas terapias.^(16,17)

Dessa forma, o objetivo do presente artigo é apresentar uma breve revisão das atuais aplicações da análise proteômica na malária por *P. falciparum*.

MÉTODOS

Para a revisão da literatura, foram consultadas as fontes PubMed (*U. S. National Library of Medicine*), SciELO (*Scientific Electronic Library Online*), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e Cochrane. Os termos pesquisados foram definidos com base nos Descritores em Ciências da Saúde (Decs), a partir de duas estratégias de busca: (1) *malaria + proteome*; (2) *Plasmodium falciparum + proteome*. A busca resultou em 551 citações (Quadro 1), publicadas nos últimos 10 anos, em línguas espanhola, inglesa e portuguesa. Desse total de citações, foram selecionados 12 artigos originais.

Quadro 1 - Número de artigos obtidos na pesquisa bibliográfica

Estratégia de busca	Base consultada			
	Cochrane	Lilacs	PubMed	SciELO
Estratégia 1: malária + proteome	60	1	157	1
Estratégia 2: <i>Plasmodium falciparum</i> + proteome	197	1	133	1

O critério de elegibilidade utilizado foi a abordagem da aplicabilidade das técnicas proteômicas no estudo da malária por *P. falciparum*, enfocando os aspectos etiológicos, patogênicos, diagnósticos, terapêuticos e profiláticos. Uma síntese desses 12 trabalhos é apresentada no quadro 2. Além dos manuscritos descritos, foram consultados outros 23 textos – incluindo artigos de revisão obtidos a partir da aplicação da estratégia de busca e textos previamente conhecidos pelos autores, não necessariamente relacionados à investigação proteômica da malária falcipara, mas considerados úteis para a contextualização do problema.

ABORDAGEM PROTEÔMICA DA MALÁRIA GRAVE

Diversos estudos têm demonstrado o papel da abordagem proteômica na elucidação dos aspectos etiológicos, patogênicos, diagnósticos e terapêuticos da malária grave. As principais informações obtidas nos artigos consultados (Quadro 2) foram organizadas nas seguintes seções: (1) *Plasmodium falciparum*, (2) patogênese, (3) diagnóstico, (4) tratamento e (5) prevenção – desenvolvimento de vacinas.

Plasmodium falciparum

O ciclo de vida do *P. falciparum* é extraordinariamente complexo e inclui a expressão de proteínas especializadas quando o protista se encontra em diferentes hospedeiros - *H. sapiens sapiens* e mosquitos do gênero *Anopheles* -, para (i) a sobrevivência intracelular e/ou extracelular, (ii) a penetração nos díspares tipos de células e (iii) a evasão das respostas imunes dos hospedeiros. Estratégias de intervenção – incluindo vacinas e medicamentos –, serão mais eficazes se orientadas para fases específicas da vida do micro-organismo e/ou dirigidas para protídios próprios expressos nesses estágios.⁽¹⁷⁾ A decodificação do genoma do *P. falciparum*, em 2002, forneceu uma base para a realização de estudos proteômicos dirigidos ao patógeno. Nesse mesmo ano, Florens et al.⁽¹⁸⁾ publicaram os resultados de uma pesquisa utilizando análise proteômica sobre o ciclo de vida do agente etiológico. Para tal, utilizou-se tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT), a qual combina cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa. Foram estudados o proteoma de esporozoítos (forma infecciosa inserida no homem pelo mosquito), merozoítos (fase invasiva das hemácias), trofozoítos (forma de multiplicação nos eritrócitos) e gametócitos (estágio sexual) do *P. falciparum*. Das 2.415 proteínas identificadas, 46% de todos os produtos gênicos foram detectados em todos os quatro estágios do ciclo de vida do *Plasmodium*. Do total de proteínas identificadas, 49% eram exclusivamente de esporozoítos, mostrando ser esse estágio o mais

Quadro 2 - Síntese dos principais artigos consultados

Estudo	Técnica utilizada	Comentários
Florens et al. ⁽¹⁸⁾	Microarrays do DNA para estudar a expressão diferencial de genes nas fases sanguíneas do <i>P. falciparum</i>	Identificadas mais de 2.400 proteínas envolvidas em quatro estágios evolutivos do <i>P. falciparum</i>
Lasonder et al. ⁽¹⁹⁾	Espectrometria de massa de fases selecionadas do ciclo evolutivo de <i>P. falciparum</i>	Identificadas 1.289 proteínas - das quais 714 nos estágios assexuados - algumas com potencial para o desenvolvimento de estratégias de imunização
Gelhaus et al. ⁽²⁰⁾	Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa	Individualizadas várias proteínas em dois estágios evolutivos do protista, esquizonte e merozoíta. Os achados podem contribuir para a criação de fármacos mais eficazes
Khan et al. ⁽²¹⁾	Espectrometria de massa	Identificadas diferenças entre os gametócitos masculinos e femininos, o que traz possibilidades para o desenvolvimento de estratégias para o controle da transmissão da doença
Lal et al. ⁽²³⁾	Análise proteômica de micronemas de oocinetos, por meio de eletroforese unidimensional, cromatografia líquida e espectrometria de massa	Primeiro estudo de análise proteômica de organelas do protista, as quais podem ser utilizadas como foco para os estudos fisiopatológicos e o desenvolvimento de terapêutica
Torrentino-Madamet et al. ⁽²⁴⁾	Análises combinadas de transcriptoma e proteoma para estudar a adaptação metabólica do <i>P. falciparum</i> às diferentes pressões de oxigênio durante seu ciclo intraeritrocitário	A hiperóxia ativa os sistemas de defesa antioxidante em protozoários, de modo a preservar a integridade de suas estruturas celulares, informação útil para criar estratégias de terapia e de controle mais efetivas
Fontaine et al. ⁽²⁵⁾	2D-DIGE	Proteínas de eritrócitos infectados pelo <i>P. plasmodium</i> foram detectadas
Makanga et al. ⁽³¹⁾	Estirpes de <i>P. falciparum</i> K1 resistentes à cloroquina foram isoladas e cultivadas <i>in vitro</i> utilizando métodos convencionais	Arteméter e lumefantrina, a partir de análise proteômica, induziram efeitos opostos sobre as principais enzimas glicolíticas. Esses resultados demonstram o poder dessa abordagem no estudo dos mecanismos pleiomórficos na ação de fármacos
Le Roch et al. ⁽³²⁾	Análise do transcriptoma e do proteoma para analisar a resposta do <i>P. falciparum</i> a T4 durante o ciclo intraeritrocitário do protozoário	O estudo revelou redução significativa no nível de colina/etanolamina fosfotransferase no <i>P. falciparum</i> , enzima envolvida na etapa final da síntese de fosfatidilcolina. Os achados podem contribuir para o entendimento e a abordagem da crescente resistência do protozoário aos antimaláricos
Jensen et al. ⁽³³⁾	Avaliação <i>in silico</i> das interações proteína-proteína de <i>P. falciparum</i> e do hospedeiro humano	Identificadas 293 proteínas de <i>P. falciparum</i> , 6 das quais já são usadas como objetos de estudo para o tratamento da malária, que possuem potencial uso como alvo terapêutico, a julgar por sua capacidade inibitória dos compostos ativos analisados
Briolant et al. ⁽³⁴⁾	2D-DIGE e iTRAQ	Por meio da análise proteômica, foram identificadas algumas alterações do <i>P. falciparum</i> após o uso de desoxiciclina, as quais não haviam sido descritas anteriormente
Doolan et al. ⁽³⁵⁾	Microarrays de proteínas para elucidar o perfil de anticorpos após infecção e vacinação	Os resultados do estudo mostram que os perfis de anticorpos são diferentes quando expostos à infecção e à vacinação, abrindo a perspectiva para futuras investigações dirigidas ao esclarecimento das bases moleculares da imunidade na malária por <i>P. falciparum</i> com vistas ao desenvolvimento de vacinas

2D-DIGE - eletroforese de fluorescência diferencial em gel 2D; iTRAQ - etiquetas isobáricas para quantificação relativa e absoluta.

díspar de todos. Essa fase compartilha uma média de 25% de seus protídios com qualquer outra fase. De outro modo, trofozoítos, merozoítos e gametócitos apresentam entre 20 e 33% de proteínas exclusivas, compartilhando de 39 a 56% de seus peptídeos. Por conseguinte, apenas 152 proteínas (6%) foram comuns às quatro fases, as quais dizem respeito a funções celulares básicas (protídios ribossomais, fatores de transcrição, histonas e proteínas do citoesqueleto).⁽¹⁸⁾

Concomitantemente, Lasonder et al.⁽¹⁹⁾ também publicaram um estudo sobre os distintos estágios do ciclo biológico do *P. falciparum*, utilizando cromatografia líquida associada à espectrometria de massa. A análise revelou 1.289 proteínas, das quais 714 foram identificadas na fase assexuada do sangue, 931 em gametócitos e 645 em gametas. Em dois estudos prévios, foram evidenciadas informações sobre a biologia dos estágios sexuais do micro-organismo, os quais incluem peptídeos conservados, assim como proteínas de estágio-específico secretadas e associadas à membrana. A partir do subconjunto dessas proteínas, é possível compreender melhor o papel nas interações intercelulares e, assim, obter subsídios para o desenvolvimento de uma possível vacina para a malária.⁽¹⁹⁾

Em 2005, Gelhaus et al.⁽²⁰⁾ obtiveram os primeiros mapas proteicos em géis bidimensionais dos proteomas de merozoítos e de esquizontes de *P. falciparum*, destacando-se como estudo pioneiro na utilização da eletroforese bidimensional e da espectrometria de massa, técnicas importantes da análise proteômica moderna. A investigação estabeleceu uma nova estratégia para identificação de proteínas plasmodiais, aspecto significativo na busca de vacina e de novos fármacos. Sem embargo, houve importante contaminação com proteínas do hospedeiro, tornando necessário o desenvolvimento de protocolos de separação, de extração e de análises mais eficazes para se apreciar independentemente o proteoma do agente etiológico.

Como todo micro-organismo que possui várias fases de desenvolvimento - consoante ao anteriormente mencionado -, tornou-se necessário o estudo das formas evolutivas em separado - bem como de seus subproteomas -, diminuindo, assim, a quantidade de spots por gel e facilitando a identificação das referidas proteínas. Khan et al.⁽²¹⁾ desenvolveram um método eficiente para separação e purificação dos gametócitos masculinos e femininos, para estudo

de seus respectivos proteomas. O proteoma do gametócito masculino continha 36% - ou seja, 236 das 650 proteínas eram macho-específicas - e o proteoma do gametócito feminino 19% - ou seja, 101 das 541 eram proteínas fêmea-específicas. Tais formas compartilham apenas 69 proteínas, o que enfatiza as características divergentes das formas evolutivas. De todas as fases do ciclo de vida do *P. falciparum* analisadas, os gametócitos machos têm o proteoma mais distinto, contendo muitas proteínas envolvidas na motilidade flagelar e na replicação rápida do genoma. O desenvolvimento sexual para a transmissão do protista faz das proteínas de superfície das fases sexuais - tais como os gametas e zigotos - moléculas atraentes ao desenvolvimento de estratégias que impeçam a transmissão.⁽²¹⁾

Patogênese

A malária grave por *P. falciparum* pode ser caracterizada, do ponto de vista fisiopatológico, como um quadro de sepse,^(3,22) implicando elementos da resposta inflamatória sistêmica. Nesses termos, a caracterização de organelas invasivas de *P. falciparum* (por meio de eletroforese unidimensional, cromatografia líquida e espectrometria de massa) tem permitido a obtenção do proteoma de micronemas de oocineto,⁽²³⁾ com boas perspectivas para a elucidação da teia fisiopatológica da malária falcipara grave. No estudo de Lal et al.,⁽²³⁾ os constituintes proteicos mais abundantes foram quitinase, proteínas relacionadas com circunsporozoito e trombospodina, HSP70, dissulfeto isomerase e proteínas adesivas secretadas por oocinetos. A análise proteômica evidenciou 345 proteínas, dentre elas aminopeptidase M1 e dissulfeto isomerase, reconhecidos alvos para o desenvolvimento de fármacos.^(23,24)

Assim, a análise de subproteomas permite identificar com maior precisão proteínas de uma determinada organela na qual se tem interesse. Dessa forma, minimiza-se a complexidade dos mapas proteicos, facilitando o estudo das proteínas contidas no gel e permitindo, também, a análise das formas de vida mais infectivas e/ou mais lesivas ao *H. sapiens sapiens*. Ademais, desvendando o mapa proteico dessas formas, é possível buscar novas estratégias (*i*) de controle - desenvolvimento de vacinas que impeçam a infecção a partir da inibição da evolução do patógeno - e (*ii*) de tratamento - pela interferência em algum processo vital do protista -, destacando-se a necessária distinção entre as proteínas do protozoário e dos seres humanos.⁽²⁵⁾

Durante seu ciclo de vida, *P. falciparum* está exposto a diferentes condições ambientais, particularmente a variações na pressão de O₂ no hospedeiro vertebrado. Além disso, o micro-organismo é exposto a níveis de 21% de O₂ nas glândulas salivares do *Anopheles*.⁽²⁴⁾ Essa variação de pressão

de O₂ gera alterações metabólicas no protozoário, as quais são essenciais para a sobrevivência do mesmo, em condições de hipóxia e hiperóxia, minimizando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), aspecto importante para que o mesmo se mantenha infectante. A compreensão de tal fenômeno por análise proteômica revelou aumento dos níveis de proteínas de choque térmico e diminuição dos níveis de enzimas glicolíticas, destacando-se que alguns desses eventos refletem modificações pós-transcricionais durante a resposta à hiperóxia.⁽²⁴⁾ Tais resultados parecem indicar que, no caso da hiperóxia, há ativação dos sistemas de resposta antioxidante do *P. falciparum*, de modo a preservar a integridade de suas estruturas celulares. Além disso, as restrições ambientais parecem induzir a uma adaptação energética do metabolismo do protista.

Diagnóstico

A rápida ascensão e a aplicação de tecnologias proteômicas têm resultado em um incremento exponencial da descrição de proteínas, as quais têm sido apresentadas como potenciais biomarcadores de doenças específicas. No atual cenário, a ênfase no desenvolvimento de métodos, para direcionar e medir a quantidade absoluta de proteínas e peptídeos específicos, em amostras proteômicas complexas, tem crescido.⁽²⁶⁾ Com efeito, muito do esforço - no âmbito da análise proteômica - nas últimas décadas tem sido dirigido para o planejamento de experimentos e para o desenvolvimento de tecnologias capazes de caracterizar o máximo possível do proteoma. Uma vez que as ferramentas para a realização da completa análise do proteoma se tornaram disponíveis, grande parte do interesse voltou-se para a avaliação de fluidos biológicos e de tecidos, com o objetivo de encontrar novos biomarcadores de doenças, dentre elas a malária. A premissa geral foi bastante simples: identificar o maior número possível de protídios em um biofluido específico, adquirido de pacientes infectados, e compará-los àqueles adquiridos de indivíduos saudáveis. Para se obter a identificação de mais de 1.000 proteínas em uma amostra de soro ou plasma gasta-se, em média, dias por amostra.⁽²⁷⁾ Tal produção tem limitado número de amostras analisadas por estudo, raramente mais do que 10. Essa falta de poder estatístico é uma das razões pelas quais o progresso em validação tem sido tão pobre, de modo que há uma geral falta de confiança na maioria dos potenciais biomarcadores relatados na literatura e baixa credulidade em outros. Apesar do destacado avanço na tecnologia, estudos para a descrição de biomarcadores usando identificação proteômica permanecerão, provavelmente, com baixa vazão em comparação com experiências como *microarray* de mRNA ou o sequenciamento do genoma.⁽²⁶⁾

Um dos aspectos cruciais para o sucesso das investigações em sistemas biológicos é a perturbação do sistema de maneira controlada, com o intuito de se obterem medidas quantitativas para cada componente da perturbação. Desta feita, a análise da expressão de genes por microarranjos tem sido a estratégia mais usada em sistemas biológicos para armazenar uma coleção de dados. Arranjos de DNA e seus protocolos relacionados são capazes de fornecer abundância de transcritos dos genes, de uma maneira precisa e reproduzível, do sistema que está sendo estudado. Para a apreciação proteômica, torna-se necessária uma técnica que seja precisa, no que diz respeito à quantificação absoluta ou relativa para todas as proteínas relevantes.⁽²⁸⁾

Uma nova linha de trabalho em proteômica direcionada (*targeted proteomics*) vem emergindo para fornecer uma solução ao problema.⁽²⁹⁾ Essa abordagem fornece, a partir de uma perspectiva quantitativa e qualitativa, amplas informações. Programando o instrumento para coletar dados dos íons detectáveis - de maneira semelhante ao sequenciamento de *express sequence tag* (EST) no campo da genômica -, a proteômica direcionada começa com uma lista de elementos precisos que serão marcados, como no caso de experimentos de *microarrays* em transcriptômica. O espectrômetro de massa é ajustado para monitorar sinais únicos de alvos especificados antes dos ensaios. Isso não resulta apenas no aumento da sensibilidade, mas também assegura que os mesmos alvos possam ser medidos por várias corridas.⁽¹⁶⁾ Desse modo, por meio da proteômica direcionada, é possível obter a quantificação absoluta dos peptídeos-alvo e, assim, da proteína-alvo. O mais comumente praticado diz respeito à injeção de peptídeos de referência ou proteínas sintéticas em concentrações conhecidas junto da amostra a ser analisada. Tais peptídeos de referência são, usualmente, formas pesadas marcadas isotopicamente.⁽³⁰⁾ Essa pode ser a ferramenta proteômica utilizada futuramente para se diagnosticar condições mórbidas como malária falcípara, de forma rápida e precisa. Ademais, além de diagnosticar, o método pode ser útil para avaliar a progressão da moléstia, pela quantificação precisa de proteínas específicas, estabelecendo qual o estágio da doença, de acordo com o aumento ou a diminuição da substância analisada.

Tratamento

Os estudos proteômicos têm, igualmente, grandes potencialidades para a investigação dos mecanismos de ação dos medicamentos antimaláricos, assim como para a compreensão das vias bioquímicas pelas quais agem esses fármacos. Em 2005, Makanga et al.⁽³¹⁾ analisaram, separadamente, o efeito de dois antimaláricos (arteméter e lumefantrina) sobre o proteoma de *P. falciparum*. Ambos os medicamentos

induziram profundas alterações no proteoma do micro-organismo. Sem embargo, o padrão de alteração do proteoma foi específico para cada antimicrobiano empregado. Os dois medicamentos induziram efeitos opostos sobre as principais enzimas glicolíticas, enquanto exerceram influência semelhante na expressão de protídeos de resposta ao estresse. Tais resultados demonstram o alcance da abordagem proteômica no estudo dos mecanismos na ação farmacológica.⁽³¹⁾

Nos últimos anos, um grande aumento na ocorrência de resistência aos antimaláricos tem sido relatado. Análogos da colina, como o bis-tiazólio T4, representam uma nova classe de compostos com potente ação contra clones de *P. falciparum* sensíveis e resistentes a outros medicamentos. Embora o T4 e seus análogos interfiram no metabolismo lipídico do protista, o mecanismo exato de ação permanece desconhecido.⁽³²⁾ Análises proteômicas de *P. falciparum* foram realizadas para se caracterizar a resposta global a esse medicamento durante o ciclo intraeritrocítico do micro-organismo, as quais revelaram redução significativa no nível de colina/etanolamina fosfotransferase (PfCEPT), enzima envolvida na etapa final da síntese de fosfatidilcolina (PC). Esse efeito foi ainda apoiado por estudos metabólicos, os quais demonstraram grande alteração na síntese de PC, a partir de colina e etanolamina, pelo composto.⁽³²⁾ A enzima glicogênio sintase quinase (GSK), cuja capacidade de inibir o crescimento de *P. falciparum* selvagem (3D7) e dos estirpes multidroga-resistentes (2D2) foi alvo de análise proteômica, com a finalidade de identificar ligações fracas no proteoma de *P. falciparum*. Dos 4.645 compostos ativos do GSK, foram identificadas 293 proteínas do protista, seis das quais mostraram potencial para uso terapêutico.⁽³³⁾ Da mesma forma, Briolant et al.⁽³⁴⁾ investigaram o mecanismo de ação da desoxiciclina sobre a forma esquizonte de *P. falciparum* por meio de técnicas de proteômica. Foram utilizados ensaios complementares de eletroforese de fluorescência diferencial em gel 2D (2D-DIGE) e etiquetas isotópicas para quantificação relativa e absoluta (iTRAQ) para comparar a expressão proteica de amostras tratadas e não tratadas com desoxiciclina. Após o tratamento com desoxiciclina, 32 e 40 proteínas de *P. falciparum* tiveram seus níveis de expressão desregulados, constatados por 2D-DIGE e iTRAQ, respectivamente. Ainda que a desregulação dessas proteínas já tenha sido descritas por tratamentos com outros fármacos, inúmeras alterações no teor de protídeos parecem ser específicas para tratamento com desoxiciclina, efeitos que podem perturbar o metabolismo no apicoplasto.⁽³⁴⁾

Prevenção - desenvolvimento de vacinas

A técnica de *microarrays* de proteínas foi empregada por Doolan et al.⁽³⁵⁾ para elucidar o perfil de anticorpos

que se desenvolvem após infecção malárica (natural ou experimental) ou após a vacinação com organismos atenuados. Assim, antígenos imunorreativos, de interesse para o desenvolvimento de vacinas ou para outras aplicações, foram identificados. Um *microarray* da proteína utiliza uma matriz na qual diferentes moléculas de proteínas ou sequências específicas de DNA são afixadas, em separado, de maneira ordenada, formando, assim, uma matriz microscópica. A técnica oferece uma abordagem múltipla para mapear interações proteína-proteína, identificar os substratos de enzimas, elucidar a ativação de fatores de transcrição ou detectar os alvos de pequenas moléculas biologicamente ativas. Desse modo, vetores de expressão para 250 proteínas de *P. falciparum* foram gerados por PCR/clonagem e, ato contínuo, tais proteínas foram expressas individualmente com mais de 90% de eficiência em *Escherichia coli* e impressas diretamente, sem purificação, em lâminas de *microarray*. Os *microarrays* da proteína foram sondados com soro humano de um dos quatro grupos que diferiam no *status* imunológico ao protozoário. No total, (i) 72 antígenos de *P. falciparum* altamente reativos e (ii) características proteômicas associadas à imunorreatividade foram identificados. Um resultado particularmente importante diz respeito aos perfis de anticorpos, os quais foram distintos para cada grupo de doadores. Informações obtidas nessas análises podem facilitar a identificação de antígenos para o desenvolvimento de uma vacina, paralelamente à investigação das bases moleculares da imunidade ao *P. falciparum*,⁽³⁵⁾ bem como os mecanismos imunológicos desencadeados na resposta do hospedeiro.⁽³⁶⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A malária falcípara é um dos exemplos que justifica o olhar do médico intensivista sobre a infectologia. De fato, o conhecimento acerca da malária caminha para a exploração dos aspectos biológicos do vetor, do protista, do hospedeiro e da relação estabelecida entre os mesmos, tendo em vista o delineamento de estratégias profiláticas, diagnósticos e terapêuticas.

Embora ainda preliminares, os estudos proteômicos representam uma promissora ferramenta, a qual, futuramente, pode oferecer subsídios para o aprimoramento do cuidado aos enfermos vitimados pela malária falcípara ou sob risco de aquisição da doença.

ABSTRACT

Despite advances in treatment and campaigns for prevention and control of malaria on the various continents where it is still rampant, this disease remains significantly relevant to the contemporary world. *Plasmodium falciparum* is the organism that is mainly responsible for severe malaria, which is characterized by disturbances in different organs and systems, with possibly fatal outcomes. Although incipient, proteomic studies of malaria have yielded favorable prospects for elucidating the biological aspects of *Plasmodium* as well as the pathophysiological, diagnostic, prophylactic, and therapeutic mechanisms of the disease. Thus, the aim of the present article is to present a brief review of the applications of proteomic analysis in *P. falciparum* malaria.

Keywords: Proteome; Malaria; *Plasmodium falciparum*

REFERÊNCIAS

- World Health Organization. World Malaria Report 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
- Tauil PL. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(3):275-7.
- Siqueira-Batista R, Gomes AP, Calixto-Lima L, Vitorino RR, Peres MC, Mendonça EG, et al. Sepsis: atualidades e perspectivas. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(2):207-16.
- Gomes AP, Vitorino RR, Costa AP, Mendonça EG, Oliveira MG, Siqueira-Batista R. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(3):358-69.
- Dube SK, Panda PS, Dutta R, Singh AP, Singh DK. Outcome of severe falciparum malaria in an intensive care unit. *Crit Care Shock.* 2011;14(2):34-9.
- Schwake L, Streit JP, Edler L, Encke J, Stremmel W, Junghans T. Early treatment of imported falciparum malaria in the intermediate and intensive care unit setting: an 8-year single-center retrospective study. *Crit Care.* 2008;12(1):R22.
- Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Crit Care.* 2003;7(4):315-23. Review.
- Tapajós R. Da "infecção em intensivismo" ao "intensivismo em infecção": o olhar do intensivista na medicina tropical. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(3):252-4.
- De Koning-Ward TF, Janse CJ, Waters AP. The development of genetic tools for dissecting the biology of malaria parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:157-85. Review.
- Aderem A, Adkins JN, Ansong C, Galagan J, Kaiser S, Korth MJ, et al. A systems biology approach to infectious disease research: innovating the pathogen-host research paradigm. *MBio.* 2011;2(1):e00325-10.
- Yura K, Yamaguchi A, Go M. Coverage of whole proteome by structural genomics observed through protein homology modeling database. *J Struct Funct Genomics.* 2006;7(2):65-76.
- Boja ES, Rodriguez H. The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *Korean J Lab Med.* 2011;31(2):61-71.
- Siqueira-Batista R, Mendonça EG, Gomes AP, Vitorino RR, Miyadahira R, Alvarez-Perez MC, et al. Atualidades proteômicas na sepsis. *Rev Assoc Med Bras.* 2012;58(3):376-82.
- Yang L, Guo S, Li Y, Zhou S, Tao S. Protein microarrays for systems biology. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011;43(3):161-71. Review.
- Winzeler EA. Malaria research in the post-genomic era. *Nature.* 2008;455(7214):751-6.
- Hanash S. Disease proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):226-32. Review.
- Ramaprasad A, Pain A, Ravasi T. Defining the protein interaction network of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genomics.* 2012;99(2):69-75. Review.

18. Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. 2002;419(6906):520-6.
19. Lasonder E, Ishihama Y, Andersen JS, Vermunt AM, Pain A, Sauerwein RW, et al. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*. 2002;419(6906):537-42.
20. Gelhaus C, Fritsch J, Krause E, Leippe M. Fractionation and identification of proteins by 2-DE and MS: towards a proteomic analysis of *Plasmodium falciparum*. *Proteomics*. 2005;5(16):4213-22.
21. Khan SM, Franke-Fayard B, Mair GR, Lasonder E, Janse CJ, Mann M, et al. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell*. 2005;121(5):675-87.
22. Freitas BA, Leão RT, Gomes AP, Siqueira-Batista R. Terapia nutricional e sepse neonatal. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(4):492-8.
23. Lal K, Prieto JH, Bromley E, Sanderson SJ, Yates JR 3rd, Wastling JM, et al. Characterisation of *Plasmodium* invasive organelles; an ookinete microneme proteome. *Proteomics*. 2009;9(5):1142-51.
24. Torrentino-Madamet M, Alméras L, Desplans J, Le Priol Y, Belghazi M, Pophillat M, et al. Global response of *Plasmodium falciparum* to hyperoxia: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Malar J*. 2011;10:4.
25. Fontaine A, Bourdon S, Belghazi M, Pophillat M, Fourquet P, Granjeaud S, et al. *Plasmodium falciparum* infection-induced changes in erythrocyte membrane proteins. *Parasitol Res*. 2012;110(2):545-56.
26. Ye X, Blonder J, Veenstra TD. Targeted proteomics for validation of biomarkers in clinical samples. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2009;8(2):126-35.
27. Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD. Serum and plasma proteomics. *Chem Rev*. 2007;107(8):3601-20. Review.
28. Deutsch EW, Lam H, Aebersold R. PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Rep*. 2008;9(5):429-34.
29. Kuster B, Schirle M, Mallick P, Aebersold R. Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(7):577-83.
30. Pratt JM, Simpson DM, Doherty MK, Rivers J, Gaskell SJ, Beynon RJ. Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat Protoc*. 2006;1(2):1029-43.
31. Makanga M, Bray PG, Horrocks P, Ward SA. Towards a proteomic definition of CoArtem action in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proteomics*. 2005;5(7):1849-58.
32. Le Roch KG, Johnson JR, Ahiboh H, Chung DW, Prudhomme J, Plouffe D, et al. A systematic approach to understand the mechanism of action of the bithiazolium compound T4 on the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics*. 2008;9:513.
33. Jensen K, Plichta D, Panagiotou G, Kouskoumvekaki I. Mapping the genome of *Plasmodium falciparum* on the drug-like chemical space reveals novel anti-malarial targets and potential drug leads. *Mol Biosyst*. 2012;8(6):1678-85.
34. Briolant S, Almeras L, Belghazi M, Boucomont-Chapeaublanc E, Wurtz N, Fontaine A, et al. *Plasmodium falciparum* proteome changes in response to doxycycline treatment. *Malar J*. 2010;9:141.
35. Doolan DL, Mu Y, Unal B, Sundaresh S, Hirst S, Valdez C, et al. Profiling humoral immune responses to *P. falciparum* infection with protein microarrays. *Proteomics*. 2008;8(22):4680-94.
36. Siqueira-Batista R, Gomes AP, Azevedo SF, Vitorino RR, Mendonça EG, Sousa FO, et al. Linfócitos T CD4+CD25+ e a regulação do sistema imunológico: perspectivas para o entendimento fisiopatológico da sepse. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2012;24(3):294-301.