

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CENTRO NACIONAL DE CÁLCULO CIENTÍFICO UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
(CECALCULA)

**Evaluación de los cambios metabólicos asociados con la resistencia a la artemisinina en
*Plasmodium falciparum***

www.bdigital.ula.ve

Trabajo Especial de Grado presentado por

Alejandro David Bonive Boscan

Como requisito para optar al título de

Licenciado en Biología

Tutor Externo: **Ascanio Rojas**

Tutor Académico: **Héctor Acosta**

Mérida, febrero de 2021

A mis padres...

por apoyarme en este gratificante camino...

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por apoyarme durante mi carrera. A mis tutores, los profesores Ascanio Rojas y Héctor Acosta, ya que sin su tiempo y esfuerzo este trabajo no habría sido posible. A mis jurados, los profesores Wilfredo Quiñones y Ana Cáceres, por sus comentarios, preguntas, correcciones y recomendaciones.

A Marirene Chacón por su apoyo incondicional y a mis amigos por su compañía. Al Centro Nacional de Cálculo Científico, donde gran parte de este trabajo fue planteado, desarrollado y discutido. A la Universidad de Los Andes y a la facultad de ciencias, donde crecí como científico y persona, gracias a profesores inolvidables.

www.bdigital.ula.ve

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	8
1.1	La malaria	8
1.1.1	La malaria en Venezuela.....	8
1.2	El parásito: <i>Plasmodium falciparum</i>	9
1.2.1	Ciclo de vida del parásito.....	9
1.2.2	Metabolismo de <i>P. falciparum</i>	11
1.2.3	Estrés oxidativo en <i>P. falciparum</i>	20
1.3	Control de la malaria.....	21
1.3.1	Control del vector.....	22
1.3.2	Drogas empleadas para combatir la malaria.....	22
1.3.3	Surgimiento de resistencia en <i>Plasmodium spp.</i>	23
1.4	Resistencia de <i>P. falciparum</i> a artemisinina	23
1.4.1	Marcadores genéticos de la resistencia a la artemisinina y la proteína pfkelch13.....	24
1.4.2	Latencia en cepas resistentes de <i>P. falciparum</i>	26
1.5	Estudios bioinformáticos en parásitos.....	26
1.5.1	Tecnologías ómicas en estudio de <i>Plasmodium</i>	27
1.5.2	Importancia y ventajas de los estudios <i>in silico</i> en <i>Plasmodium falciparum</i>	28
1.5.3	La resistencia a artemisinina en <i>P. falciparum</i> mediante técnicas bioinformáticas	28
2	HIPÓTESIS.....	30
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo General.....	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	JUSTIFICACIÓN Y APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS	31
5	METODOLOGÍA	32
5.1	Análisis de la función de proteínas desconocidas	32
5.2	Construcción de un Modelo metabólico para las cepas resistentes de <i>P. falciparum</i> a la artemisinina	33
5.3	Modelado de un posible transportador de citrato/ α -cetoglutarato mitocondrial de <i>P. falciparum</i>	34
6	RESULTADOS.....	38
6.1	Análisis de la función de proteínas desconocidas	38
6.1.1	Proteínas correlacionadas positivamente.....	38
6.1.2	Proteínas correlacionadas negativamente.....	44
6.2	Construcción de un modelo metabólico para las cepas resistentes de <i>P. falciparum</i> a la artemisinina	52
6.3	Modelado de un posible transportador de citrato/ α -cetoglutarato mitocondrial de <i>P. falciparum</i>	56
7	DISCUSIÓN	64
7.1	Análisis de la función de proteínas desconocidas	64
7.2	Construcción de un modelo metabólico para las cepas resistentes de <i>P. falciparum</i> a la artemisinina	68
7.2.1	Glicólisis, ciclo de Krebs y estrés oxidativo	68
7.2.2	Cadena de transporte de electrones y síntesis de pirimidinas.....	77

7.2.3	El Ca^{+2} y otras rutas de señalización	80
7.2.4	Metabolismo de lípidos en la resistencia	88
7.2.5	Varias formas de generar resistencia a la artemisinina por el parásito	92
7.3	Modelado de un posible transportador de citrato/ α -cetoglutarato mitocondrial de <i>P. falciparum</i>	95
8	CONCLUSIONES	101
9	PERSPECTIVAS	101
10	REFERENCIAS	102
11	ANEXOS	113

FIGURAS

Figura 1	Casos confirmados de Malaria en el periodo 2011-2015 en Brasil, Colombia, Perú y Venezuela. Extraído Recht et al. (2017).	9
Figura 2	Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i> , se separan las partes del ciclo ocurridas en el vector (izquierda) y en el humano (derecha) extraído y modificado de Lee et al. (2014).	10
Figura 3	Obtención de diferentes nutrientes por el parásito <i>P. falciparum</i> dentro del eritrocito A) pantotenato (Vitamina B 5) e Isoleucina mediante nuevas rutas de permeabilidad (NRP) que pueden ser inhibidas por Furosemida, la isoleucina también puede ser obtenida mediante los transportadores endógenos del eritrocito (L) que pueden ser inhibidos por BCH el ácido aminobis[2,2,1]heptano-2-carboxílico .B) Regulación de los niveles de Na^{+} y K^{+} mediante las NRP, nótese que la bomba $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ (P) actúa en sentido contrario para ambos iones. C) Importación de Hexosas, aminoácidos neutros, nucleósidos y bases nitrogenadas en la membrana del parásito, se ha podido identificar el transportador de hexosas (PfHT, H) nucleósidos y bases nitrogenadas (PfENT1, N) pero no de aminoácidos neutros (?). D) transporte de diferentes iones entre el citosol del eritrocito y el parásito. E) importe de Fosfato (en forma $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$) en cotransporte con dos átomos de Na^{+} mediante la proteína PfPiT. Extraído y modificado de (Kirk y Lehane, 2014).	12
Figura 4	Cambios en la mitocondria en diferentes grupos del suprareino Alveolata (Jacot et al., 2016).	15
Figura 5	Esquema resumido de la ruta de recuperación de purinas, extraído de (Krungskrai y Krungskrai, 2016), se resalta en rojo la ruta principal de obtención de purinas, el parásito obtiene la hipoxantina del huésped y también del metabolismo de poliaminas.	17
Figura 6	Esquema de la ruta para la síntesis de pirimidinas <i>de novo</i> en <i>P. falciparum</i> , tomado de (Krungskrai y Krungskrai, 2016).	18
Figura 7	Esquema del metabolismo central de carbono en <i>P. falciparum</i> , en rojo se resaltan las rutas principales que siguen las moléculas de glucosa y glutamina tomadas por el parásito, extraído de (Jacot et al., 2016).	19
Figura 8	Procesos metabólicos identificados para las proteínas desconocidas correlacionadas positivamente de <i>P. falciparum</i> que podrían estar asociados con la resistencia a la artemisinina, los números en la figura representan el número de proteínas en cada categoría.	38
Figura 9	Procesos metabólicos identificados para las proteínas desconocidas correlacionadas negativamente de <i>P. falciparum</i> que podrían estar asociados con la resistencia a la artemisinina, los números en la figura representan el número de proteínas en cada categoría.	45
Figura 10	Modelo metabólico propuesto para cepas resistentes de <i>P. falciparum</i> a la artemisinina. Se muestra el flujo central del carbono principalmente en tres rutas: glicolisis, ciclo de Krebs y estrés oxidativo. Se muestran también otros procesos metabólicos complementarios que se diferencian en cepas resistentes: aumento de síntesis de pirimidinas, disminución de la cadena transportadora de electrones, importación de Hemoglobina, producción de cAMP y transporte de Ca^{+2} hacia el RE.	55
Figura 11	Modelo del transportador de PfCOCP obtenido de Phyre2, A) modelo en 3D rojo (N-terminal), azul (C-terminal) B) 6 segmentos transmembranales obtenidos en la proteína por Phyre2.	56
Figura 12	Diagramas de Ramachandran para el modelo de la proteína PfCOCP obtenida del servidor Phyre 2 (puntos en color naranja), primer refinamiento en el servidor GalaxyWEB (color amarillo) y segundo refinamiento (color azul). Los diagramas fueron obtenidos con el servidor SwissDock.	57
Figura 13	Modelo refinado del transportador de citrato/alfacetoglutarato (PF3D7_1223800) de <i>P. falciparum</i> , la proteína refinada se encuentra coloreada y se superpone en gris el modelo original obtenido en Phyre2(izquierda) y de	

SwissModel (derecha). A) conformación C y B) conformación M. Visualización producida con UCSF Chimera 1.13.1.	58
Figura 14 Acoplamiento molecular en el transportador PfCOCP realizados con SwissDock. A) y C) α -cetoglutarato y citrato con la proteína en la conformación C, respectivamente. B) y D) α -cetoglutarato y citrato con la proteína en la conformación M. Se usaron acoplamiento que pertenecían al cluster de menor energía predicho por el servidor, también se resaltan los residuos de aminoácidos que forman puentes de hidrógeno con el sustrato según la opción FindHBond de UCSF Chimera 1.13.1.	59
Figura 15 Acoplamiento molecular de citrato (rojo) y alfaetoglutarato (azul) con el transportador mitocondrial de citrato PfCOCP en conformación C (A , C , E) y M (B , D , F) vistas desde diferentes ángulos; vista lateral (A y B), desde el citosol (C y D), desde la Matriz mitocondrial (E y F). Representaciones realizadas con UCSF Chimera 1.13.1	60
Figura 16 Alineamiento de las secuencias de PfCOCP con YHM2 realizado en T-coffee. Los asteriscos (*) representan residuos conservados, dos puntos (:)residuos con propiedades similares y punto (.) residuos con propiedades distintas. En base a qué tan conservados son los residuos, presencia de vacíos, y otros aspectos el servidor colorea en rosado las zonas que representan un buen alineamiento, en amarillo un alineamiento regular y en verde un mal alineamiento. Se resaltan en azul y en rojo las hélices- α en la proteína de <i>P. falciparum</i> y <i>S. cerevisiae</i> , respectivamente, en base al modelado obtenido para cada proteína. Los 6 segmentos transmembranales H1,2, 3, 4, 5, 6, segmentos H12, H34, H56 y sitios de unión al sustrato I, II, III se encuentran rotulados en ambas proteínas. El sitio III identificado para PfCOCP solo interactúa con el sustrato en la conformación M. Los motivos GxxxG y π xxxx π se indican con círculos violetas y amarillos, respectivamente, los motivos [PS]x[DE]xx RK] se resaltan con triángulos verdes, las abrazaderas Q y Y con cuadrados verdes y azules respectivamente.	61
Figura 17 Cambios en las rutas metabólicas; glucólisis, ciclo de Krebs y estrés oxidativo propuesto para cepas resistentes, las flechas de color rojo brillante indican el principal flujo metabólico en estas rutas, las flechas opacas muestran reacciones con menor flujo. Se muestran los nombres abreviados de las enzimas correlacionadas positivamente con la resistencia a la artemisinina en <i>P. falciparum</i> y los círculos azules representan aquellas proteínas correlacionadas negativamente, basados en los datos de Mok et al. (2015).	68
Figura 18 Genes correlacionados positiva (rojo) y negativamente (azul) con la resistencia implicados en la Glicólisis (GL), ciclo de Krebs (TCA) y estrés Oxidativo (EO) en cepas de <i>P. falciparum</i> resistentes a la artemisinina. Datos tomados de (Mok et al., 2015).	70
Figura 19 Flujo de metabolitos en el ciclo de Krebs en Plasmodium falciparum durante el ciclo intraeritrocítico . A) Flujo normal en cepas salvajes B) Flujo en cepas mutantes sin la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa. Extraído de Ke et al. (2015)	71
Figura 20 Cambios cadena transportadora de electrones y síntesis de pirimidinas para cepas resistentes , se muestran los nombres abreviados de las enzimas correlacionadas positivamente con la resistencia a la artemisinina en <i>P. falciparum</i> según los datos de (Mok et al., 2015)	78
Figura 21 Cambios en el metabolismo de lípidos propuesto para cepas resistentes de <i>P. falciparum</i> a la artemisinina. Se muestran los nombres abreviados de las enzimas correlacionadas positiva y negativamente con la resistencia a la artemisinina según los datos de Mok et al. (2015)	89
Figura 22 A Transportador de ADP/ATP (PDB: 4C9H) de <i>S. cerevisiae</i> en la conformación C. B Transportador de ATP/ADP (PDB:6GCI) de <i>Thermothelomyces thermophila</i> en la conformación M. Se señala el sitio de unión con el sustrato en flechas verdes y las puertas citoplasmáticas y de la matriz en flechas moradas, la superficie accesible para el agua se resalta en azul pálido. Extraído de Ruprecht y Kunji (2019a).	...

TABLAS

Tabla 1 Trabajos sobre las cepas resistentes a la artemisinina de <i>P. falciparum</i> empleados para la construcción del modelo metabólico	34
Tabla 2 Nuevos nombres propuestos para algunas proteínas con función desconocida correlacionadas positivamente con cepas de <i>P. falciparum</i> resistentes a la artemisinina.	43
Tabla 3 Nuevos nombres propuestos para algunas proteínas con función desconocida correlacionadas positivamente con cepas de <i>P. falciparum</i> resistentes a la artemisinina.	51
Tabla 4 Valores de diferencia en la energía libre de Gibbs (ΔG) para los acoplamiento molecular mostrados en la Figura 14 para la conformación C y M, con los sustratos α -Cetoglutarato y citrato.	113
Tabla 5 Valores de Fullfitness (ΔG) para los acoplamiento molecular mostrados en la Figura 14 para la conformación C y M, con los sustratos α -Cetoglutarato y citrato.	113

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La malaria

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*), pertenecientes a filo Apicomplexa del reino protista, que es transmitida a los seres humanos mediante la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*. Produce cuadros febriles, escalofríos y otros síntomas, llegando a complicarse y producir la muerte. Se estima que en 2016 hubo 216 millones de casos de malaria y unas 445.000 muertes atribuidas a ella (WHO, 2018). Su distribución abarca el trópico (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016; World Health Organization (WHO), 2018), siendo esta región la que posee mayor incidencia de la enfermedad, no obstante las áreas templadas también son propensas, sobre todo durante el verano cuando la temperatura permite la multiplicación del vector, un mosquito del género *Anopheles*. Además, muchos viajeros pueden movilizarse desde zonas tropicales de alta incidencia en malaria hacia zonas templadas y llevar el parásito, esto es especialmente cierto para infecciones por *P. vivax*, que presenta un periodo de latencia (White, 2011).

1.1.1 La malaria en Venezuela

En Venezuela los casos de malaria han ido en aumento acelerado desde 2011 (**Figura 1**), para el año 2017 se estimaban en más de 450 mil reportados por la OMS y más de 1 millón en 2018 (Bruzual *et al.*, 2018; OMS y OPS, 2018). De estos casos *Plasmodium vivax* es el causante de la mayoría de los reportes con más del 80%, sin embargo, en años recientes el número de casos reportados para *P. falciparum* ha ido en aumento (2% entre 2016 y 2017), inclusive en zonas donde antes no había sido reportado (Bruzual *et al.*, 2018). Si bien los casos se registran en 17 de los 24 estados del país, el municipio Domingo Sifontes, en el estado Bolívar, concentró la mayor cantidad de casos a nivel nacional con el 43% del total de casos notificados. Con un comportamiento epidémico relacionado con el auge de la explotación minera y la movilización de personas procedentes de otros estados y países, que se establecen en condiciones propicias para la transmisión de la malaria (Bruzual *et al.*, 2018). En años recientes se habla incluso de casos de inmigrantes venezolanos que llevan el parásito a otros países latinoamericanos (Jaramillo-Ochoa *et al.*, 2019).

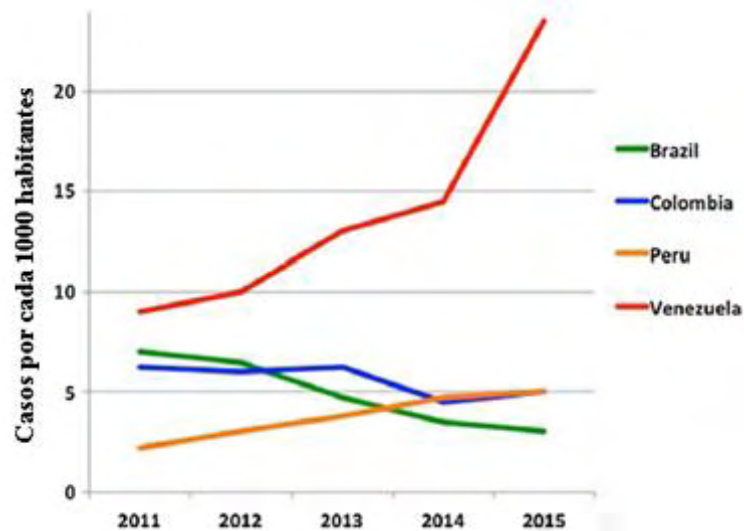


Figura 1 Casos confirmados de Malaria en el periodo 2011-2015 en Brasil, Colombia, Perú y Venezuela. Extraído Recht et al. (2017).

1.2 El parásito: *Plasmodium falciparum*

Los organismos pertenecientes al phylum Apicomplexa son los únicos que poseen apicoplasto, un organelo proveniente de un plastidio degenerado que cumple funciones indispensables a la hora de que estos parásitos infecten distintos tipos de células (Lim y McFadden, 2010). En este phylum, todos son parásitos, siendo aquellos que más afectan al hombre *Toxoplasma sp.* y *Plasmodium sps.* Existen 5 especies del género *Plasmodium* que pueden causar malaria; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malaria*, *P. ovale* y eventualmente *P. knowlesi*, siendo *P. falciparum* el parásito causante de la malaria más severa, con más casos y muertes registradas a nivel mundial (WHO, 2018b). *Plasmodium falciparum* posee 14 cromosomas, que contienen alrededor de unos 5300 genes, donde se ha reportado que los genes de variación antigénica se encuentran en las regiones subteloméricas de los cromosomas (Gardner et al., 2002). Una particularidad clara de *P. falciparum* con respecto a otras especies del género es su bajo contenido de guanina y citosina (GC), 27,11 %, en su genoma (Musto et al., 1997).

1.2.1 Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida de *Plasmodium* tiene numerosas etapas donde el parásito sufre diferentes transformaciones. A continuación, se ahondará brevemente en las etapas del ciclo (**Figura 2**). Inicialmente un mosquito infectado pica a la persona e inyecta esporozoítos de *Plasmodium*, los esporozoítos viajan por el torrente sanguíneo y comienzan a infectar células del hígado. Una vez dentro de estas células se forman esquizontes y al estar maduros se rompen liberando merozoítos nuevamente

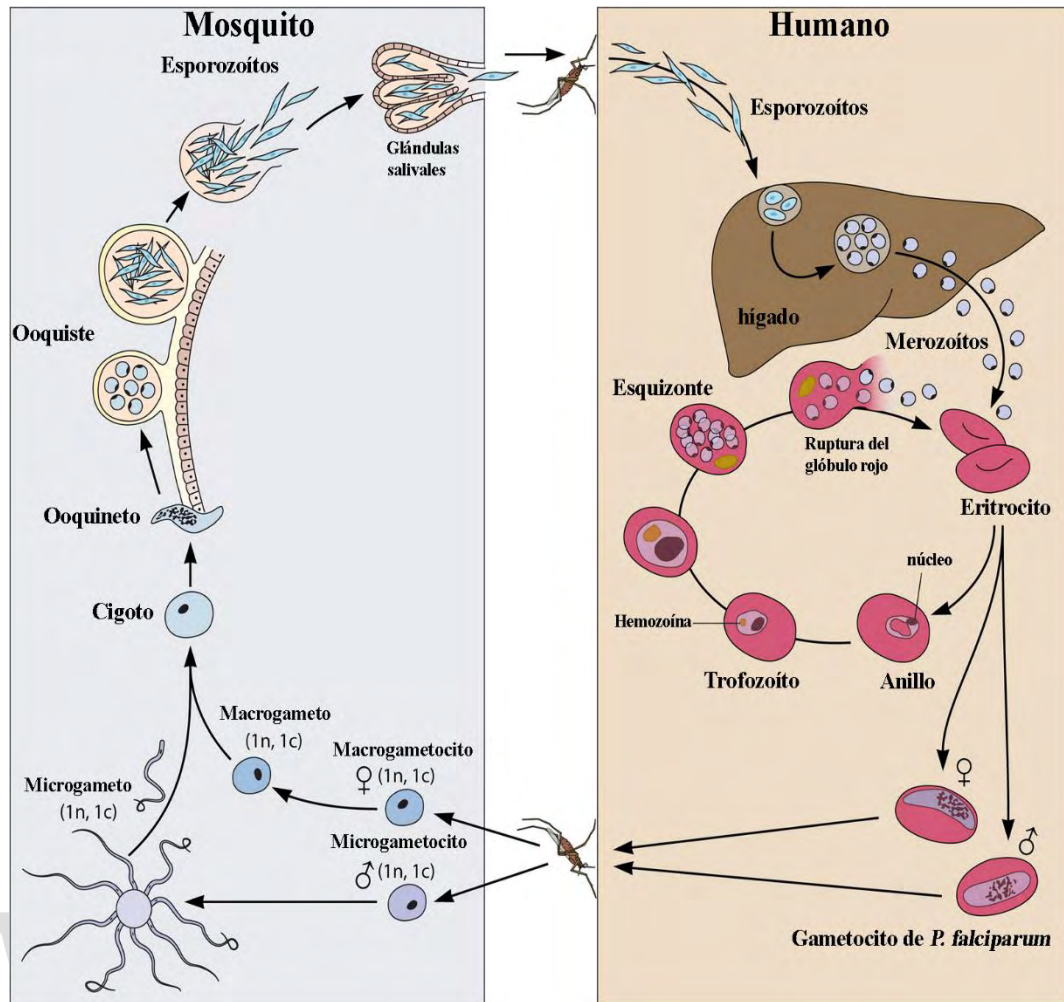


Figura 2 Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*, se separan las partes del ciclo ocurridas en el vector (izquierda) y en el humano (derecha) extraído y modificado de Lee et al. (2014).

al torrente sanguíneo, creándose un ciclo que se denomina ciclo exo-eritrocítico, que va desde la introducción de los esporozoítos hasta la liberación de los merozoítos. *P. vivax* y *P. ovale* tienen la particularidad de infectar las células hepáticas y alternativamente mantenerse en ellas de forma latente, esta forma del parásito se denomina hipnozoíto. En sangre, los merozoítos infectan glóbulos rojos, una vez dentro se forman anillos y luego trofozoítos, que maduran multiplicándose asexualmente, para formar esquizontes. Cuando se produce la ruptura del glóbulo rojo, los esquizontes liberan su contenido de merozoítos (aproximadamente 30) nuevamente al torrente sanguíneo, que a su vez pueden infectar otros glóbulos rojos, este ciclo del parásito en sangre se denomina ciclo intraeritrocítico (en inglés *intraeritrocy development cycle*). Algunos trofozoítos pueden producir gametos (gametocitos) y liberarlos en sangre con la ruptura del eritrocito, en este punto otro mosquito puede tomar sangre con gametocitos y continúa el ciclo en el vector. Dentro del estómago del mosquito los gametos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) se fusionan formando cigotos, móviles y alargados, los ooquinetos, que pueden invadir las paredes del intestino medio donde forman ooquistes. Cuando los

ooquistes maduran, se rompen y liberan esporozoítos que se trasladan hasta las glándulas salivales del mosquito, quedando este en capacidad de infectar nuevos humanos, de esta forma el ciclo se cumple y puede repetirse, esta parte del ciclo de vida dentro del mosquito se puede denominar ciclo esporogónico (**Figura 2**, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019).

1.2.2 Metabolismo de *P. falciparum*

Como hemos visto *Plasmodium falciparum* tiene un ciclo de vida complejo que involucra distintos microambientes donde se desarrolla y multiplica en nichos intracelulares y extracelulares dentro del huésped humano y el vector mosquito, esto evidentemente implica cambios metabólicos (Aly *et al.*, 2009). A pesar de esta variedad de entornos, el flujo de sustancias con el huésped facilita la obtención de metabolitos indispensables para el parásito y gracias a que ha evolucionado en este medio, se ha reducido su maquinaria metabólica (Kafsack y Llinas, 2010), evidencia de ello son la pérdida de rutas como la síntesis de purinas (Krungskrai y Krungskrai, 2016) y la β -oxidación de ácidos grasos (Olszewski y Llinas, 2011), de hecho el parásito no puede sintetizar aminoácidos esenciales y algunos no esenciales (Payne y Loomis, 2006).

En este trabajo se presentará principalmente el metabolismo de *P. falciparum* durante el ciclo intraeritrocítico que como ya se mencionó comprende las formas de anillo, trofozoíto y esquizonte.

El eritrocito es una célula anucleada que carece de organelos y no tiene la capacidad de sintetizar proteínas ni lípidos *de novo*, esto también implica la pérdida de rutas para la importación de varios metabolitos (Baumeister *et al.*, 2010). Cuando el eritrocito es infectado surge un nuevo sistema de membranas y compartimientos, siendo el más notorio la vacuola parasítica que rodea al parásito pero se diferencia de su citosol o del eritrocito, teniendo incluso algunas proteínas propias que son exportadas por el parásito (Jacot *et al.*, 2016). La permeabilidad del eritrocito cambia debido a las modificaciones que induce el parásito y se forman las llamadas nuevas rutas de permeabilidad (NRPs), de esta manera el parásito puede obtener diferentes nutrientes desde el plasma sanguíneo que son muchas veces

impermeables a la membrana del eritrocito humano cuando no están infectados (**Figura 3**) (Baumeister *et al.*, 2010).

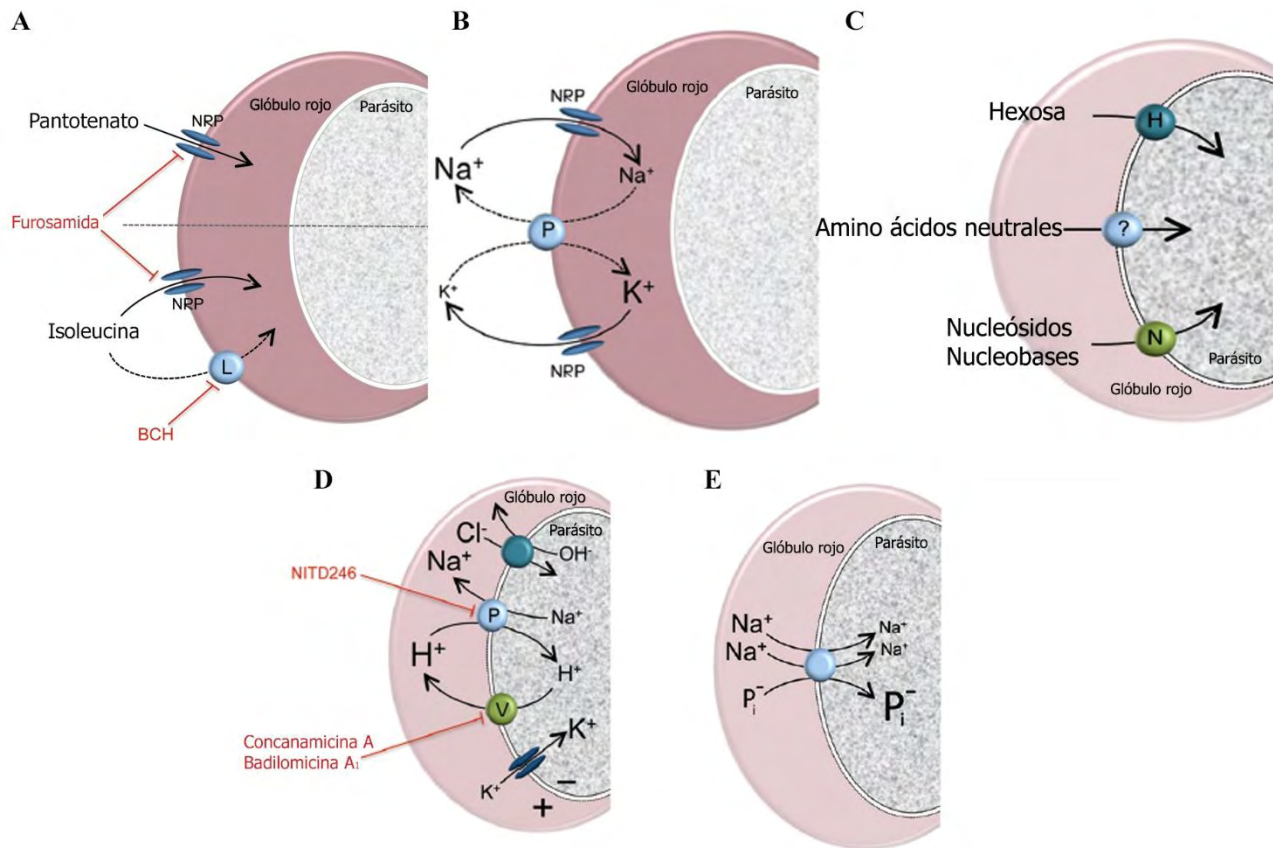


Figura 3 Obtención de diferentes nutrientes por el parásito *P. falciparum* dentro del eritrocito A) pantotenato (Vitamina B 5) e Isoleucina mediante nuevas rutas de permeabilidad (NRP) que pueden ser inhibidas por Furosemida, la isoleucina también puede ser obtenida mediante los transportadores endógenos del eritrocito (L) que pueden ser inhibidos por BCH el ácido aminobis[2,2,1]heptano-2-carboxílico. B) Regulación de los niveles de Na^+ y K^+ mediante las NRP, nótese que la bomba Na^+/K^+ (P) actúa en sentido contrario para ambos iones. C) Importación de Hexosas, aminoácidos neutros, nucleósidos y bases nitrogenadas en la membrana del parásito, se ha podido identificar el transportador de hexosas (PfHT, H) nucleósidos y bases nitrogenadas (PfENT1, N) pero no de aminoácidos neutros (?). D) transporte de diferentes iones entre el citosol del eritrocito y el parásito. E) importe de Fosfato (en forma H_2PO_4^-) en cotransporte con dos átomos de Na^+ mediante la proteína PfPiT. Extraído y modificado de (Kirk y Lehane, 2014)

El parásito puede obtener la mayoría de los aminoácidos mediante la digestión de hemoglobina o importándolos del medio, ya sea a través de las NRPs o bien por el sistema de importe de aminoácidos del eritrocito (**Figura 3 A**), haciendo uso de estos sistemas para obtener cualquiera de los 20 aminoácidos, de éstos, la metionina e isoleucina deben ser estrictamente importadas (Martin *et al.*, 2005; Martin y Kirk, 2007; Cobbold *et al.*, 2011) debido a que esta última está ausente en la hemoglobina humana. El cuadro de modificaciones en la permeabilidad que induce el parásito es aún más complicado si se toma en cuenta que las proteínas propias del eritrocito podrían también tener cambios en la permeabilidad inducidos por el parásito, este podría ser el caso del transporte de L-glutamato y D-aspartato, que aumenta en eritrocitos infectados mediante transportadores que normalmente se encuentran inactivos (Winterberg *et al.*, 2012). Por su parte el intercambio iónico también se ve afectado, *P. falciparum* induce una

reducción drástica en las concentraciones de K^+ del citosol del eritrocito y un aumento en el Na^+ , generando un citosol similar al plasma sanguíneo en lo que respecta a concentración de Na^+ y K^+ (**Figura 3 B**) (Kirk y Lehane, 2014). Otros cofactores importantes como el ácido pantoténico (vitamina B5) precursor necesario de la coenzima A (Saliba *et al.*, 1998) también son importados por el parásito.

Otra característica del eritrocito es que carece de mitocondrias y depende totalmente de la fermentación de glucosa y tiene un consumo normal del orden de $5\mu\text{mol glucosa}/24\text{ h}/10^9$ glóbulos rojos (Jensen *et al.*, 1983). Cuando los glóbulos rojos son infectados por merozoítos de *P. falciparum* el consumo de glucosa aumenta hasta 100 veces, rondando los $122\mu\text{mol glucosa}/24\text{ h}/10^9$ glóbulos rojos, siendo los trofozoítos y esquizontes los mayores consumidores de glucosa (Roth, 1990; Shivapurkar *et al.*, 2018) ya que hay un aumento masivo de biomasa en estos estadios. El eritrocito provee de un ambiente rico en glucosa que el parásito adquiere haciendo uso de los transportadores pfHT1 (PF3D7_0204700, **Figura 3 C**), que tienen mayor afinidad por la glucosa que los transportadores GLUT expresados en el eritrocito (Woodrow *et al.*, 1999), se ha probado que el transportador PfHT1 de *P. falciparum* y su homólogo en *P. berghei* son indispensables para el ciclo intraeritrocítico (Slavic *et al.*, 2010) y al parecer es el único transportador que permite que el parásito tome toda la glucosa que requiere del huésped sin problema.

La glucosa entra al eritrocito y es fosforilada mediante la hexoquinasa del glóbulo rojo lo que la hace impermeable a la membrana del parásito, para que pueda entrar a éste es necesario que sea desfosforilada por la enzima GAP50 (proteína asociada al glideosoma 50, PF3D7_0918000) una fosfatasa ácida que también desfosforila otros metabolitos requeridos por el parásito (Muller *et al.*, 2010), de hecho se ha propuesto que esta desfosforilación inespecífica induce a una pérdida de energía en el citosol del eritrocito, y el parásito la podría solventar proveyendo de ATP y otras moléculas metabólicamente activas al eritrocito (Olszewski y Llinas, 2011).

Sobre la obtención de energía en este ambiente se sabe que el parásito no realiza fosforilación oxidativa a saber: *i*) Hay un aumento drástico (de 5 a 100 veces) en la acumulación de ácido láctico en eritrocitos infectados (Zolg *et al.*, 1984), *ii*) cuando se emplea glucosa marcada radioactivamente una cantidad reducida se transforma en CO_2 (Scheibel y Pflaum, 1970) y *iii*) la mitocondria en el estado de trofozoíto es pequeña y poco crestada (Rudzinska, 1969). Para cultivar los parásitos *in vitro* requieren de glucosa o sacarosa y se cree que *P. falciparum* no puede emplear otras fuentes de carbono como aminoácidos o grasas (Olszewski y Llinas, 2011).

Lo mencionado indica que el parásito obtiene la mayoría de su ATP de la fermentación de glucosa en el ciclo intraeritrocítico y sumado a lo anterior debemos indicar que. *P. falciparum* posee todas las enzimas de la glucólisis y muestran un aumento en su expresión dentro del glóbulo rojo (Srivastava *et al.*, 2016). El parásito no posee fructosa bifosfatasa identificada en su genoma, y probablemente no realiza gluconeogénesis, ya que esta enzima es esencial para el proceso, también es evidencia de ello el que no puede usar otras moléculas como fuente de energía que no sean glucosa o fructosa (Olszewski y Llinas, 2011). Es interesante que; a pesar de no hacer gluconeogénesis dos enzimas normalmente asociadas con esta ruta: la Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, PF3D7_1426700) y la Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, PF3D7_1342800) se encuentran presentes en el parásito y además son metabólicamente importantes (Storm *et al.*, 2014) .

El parásito realiza la vía de las pentosas fosfato (VPF), una ruta que le permite obtener NADPH para las reacciones de síntesis y defensa contra el estrés oxidativo, y ribosa para la síntesis de ácidos nucleicos (Olszewski y Llinas, 2011). Cuando el eritrocito es infectado por el parásito se observa un aumento progresivo en la VPF que alcanza su nivel más alto en el estadio de trofozoíto y luego decrece en el esquizonte, este aumento es de al menos 78 veces respecto a eritrocitos no infectados, al cual el parásito contribuye en un 82%. Es necesario indicar que la VPF del eritrocito también tiene 24 veces más actividad y posiblemente se deba al estrés oxidativo causado por el parásito (Atamna *et al.*, 1994). En pacientes con deficiencia en la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), la primera enzima de la VPF, se ha encontrado que los parásitos experimentan mayor estrés oxidativo en el eritrocito y se ha sugerido que esto confiere mayor tolerancia de las personas a la enfermedad, curiosamente el continente africano presenta el mayor número de personas con esta deficiencia metabólica y es también el continente con mayor incidencia de malaria (Cappellini y Fiorelli, 2008).

P. falciparum tiene diferencias importantes en el ciclo de Krebs, también denominado ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo del ácido cítrico, y en otras proteínas metabólicamente activas ubicadas en la mitocondria respecto al huésped, varios de estos cambios son compartidos con otros organismos del filo Apicomplexa e incluso con los dinoflagelados, un grupo hermano que junto a los ciliados forman parte del suprareino Alveolata (**Figura 4**, (Jacot *et al.*, 2016)). De estas diferencias son relevantes en *P. falciparum*:

- a) Presencia de malato quinona reductasa (MQO, PF3D7_0616800 en remplazo de la malato deshidrogenasa (MDH),
- b) Fumarato hidratasa (FH) del tipo I (y no del tipo II, PF3D7_0927300)

- c) Presencia de una α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (PF3D7_0504600), (BCKDH del inglés *Branched-Chain Ketoacid Dehydrogenase*) en sustitución de la piruvato deshidrogenasa (PDH) mitocondrial, hecho sustentado en la medición de actividad PDH por la BCKDH y en que esta enzima se encuentra huérfana en la ruta de la degradación de α -cetoácidos de cadena ramificada (Jacot *et al.*, 2016).
- d) El complejo I de la cadena transportadora de electrones se encuentra sustituido por una sola proteína, la NADH ubiquinona oxidorreductasa del tipo II (PF3D7_0915000) que no bombea protones hacia la matriz
- e) Una isocitrato deshidrogenasa (IDH, PF3D7_0820700) dependiente de NADPH y no de NAD^+ .

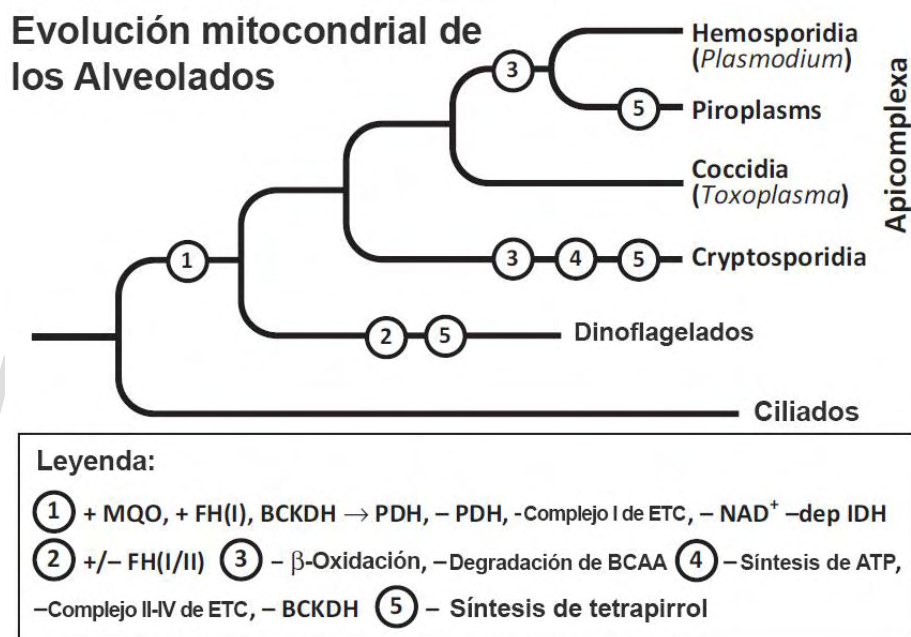


Figura 4 Cambios en la mitocondria en diferentes grupos del suprareino Alveolata (Jacot *et al.*, 2016)

Durante el ciclo intraeritrocítico el parásito no depende del ciclo de Krebs para generar el ATP que necesita, hecho que se sustenta de diferentes formas ya mencionadas, además, varias de las enzimas del ciclo de Krebs son dispensables durante el ciclo sanguíneo (Ke *et al.*, 2015; Jacot *et al.*, 2016). Pese a esto algunas de las enzimas como la MQO son necesarias para el desarrollo del parásito, posiblemente implicadas en la síntesis de pirimidinas y otros procesos (Jacot *et al.*, 2016).

A diferencia de otros organismos la entrada principal de carbonos al ciclo Krebs de *P. falciparum* proviene de la glutamina que es transformada en glutamato y luego α -cetoglutarato que se traslada en antiporte con malato a la mitocondria y el malato es excretado por el parásito (Olszewski y Llinas, 2011; Jacot *et al.*, 2016) más adelante se retomará la importancia del ciclo Krebs para el parásito.

Respecto al metabolismo de lípidos, los eritrocitos infectados difieren en la composición lipídica de sus membranas respecto a los no infectados (Vial y Mamoun, 2005). Siendo proporciones de los fosfolípidos; fosfatidilcolina (PC, 45-55%), fosfatidiletanolamina (PE, 20-35%), fosfatidilserina (PS, 4-8%), fosfatidilinositol (PI, ~5%) y esfingomielina (3-20%) (Wein *et al.*, 2018) En el caso de la membrana del parásito se encuentra principalmente compuesta de PC y PE, representando entre 40-50% y 35-45%, respectivamente, porcentajes inusualmente altos para organismos eucariotas, adicionalmente, *P. falciparum* no puede producir colesterol, siendo su membrana pobre en esta molécula (Vial y Mamoun, 2005).

Es interesante resaltar que *Plasmodium falciparum* requiere de un suministro de ácidos grasos para su desarrollo durante el ciclo intraeritrocítico (Olszewski y Llinas, 2011) y a pesar de que el importe de estos componentes ha sido difícil de esclarecer, al parecer el parásito toma del suero sanguíneo los ácidos grasos pero no fosfolípidos o lípidos neutros, ayudado también por la hidrólisis de algunos lípidos (Vial y Mamoun, 2005).

Los ácidos grasos para poder ser incorporados a la membrana deben transformarse en tioesteres de acil-CoA, mediante la acil-CoA sintetasa (ACS), y para ello *Plasmodium* posee al menos 11 genes que codifican para posibles acil-CoA sintetasas que se encuentran en diferentes cromosomas y todos son expresados durante el ciclo intraeritrocítico (Vial y Mamoun, 2005). Algunas de estas ACSs podrían estar implicadas en el importe de ácidos grasos ya que son exportadas por el parásito hacia el eritrocito e incluso pueden interactuar con su citoesqueleto (Vial y Mamoun, 2005).

El metabolismo de ácidos grasos en *Plasmodium* spp. ha sido un tema polémico, los datos indican la ausencia de enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo en 1998 un análisis del genoma del apicoplasto constató la presencia de todas las proteínas necesarias para la síntesis de ácidos grasos del tipo bacterial (FASII del inglés *type II fatty-acid biosynthesis*) (Waller *et al.*, 1998). Trabajos anteriores empleando el marcaje radiactivo mostraron la capacidad del parásito para fijar carbono procedente de la glucosa sólo en el esqueleto de glicerol y no en las cadenas acilo de los lípidos, evidenciándose posteriormente que el parásito tiene la capacidad de alargar cadenas de 14 carbonos a 16, y de 16 a 18, además de producir desaturaciones principalmente en la posición ω -9 (Olszewski y Llinas, 2011). Por ello, se ha propuesto que el parásito toma ácidos grasos del eritrocito y del plasma, produciendo en ellos ciertas modificaciones como elongaciones o desaturaciones, y solo emplea un esqueleto de glicerol para ensamblar los lípidos que necesita (Olszewski y Llinas, 2011).

Ácidos Nucleicos

ATP, dATP

GTP, dGTP

AMP

AMPS

IMP

XGMP

GMP

Adenina

Inosina

Xantosina

Xantina

Guanosina

Guanina

Adenosina

Hipoxantina

Metiltioinosina

Metiltioadenosina

Metabolismo de Poliaminas

nucleósidos hENT1 y el transportador de bases nitrogenadas hFNT1, dos transportadores pertenecientes al eritrocito, también se pueden importar nucleósidos y bases nitrogenadas, a través de las NRPs, pero al parecer esta ruta es dispensable para el parásito (Quashie *et al.*, 2010).

17

síntesis de purinas *de novo* que se ha identificado para esta ruta. Esta enzima a su vez también puede actuar en la ruta de recuperación de purinas para transformar adenosina monofosfato (AMP) en IMP (**Figura 5**, (Krungskrai y Krungskrai, 2016). Como se puede apreciar, el parásito depende de los precursores presentes en sangre para producir purinas, siendo la hipoxantina la fuente principal (Krungskrai y Krungskrai, 2016).

A diferencia de las purinas, las pirimidinas existen en el eritrocito solo en pequeñas concentraciones de forma que el parásito ha retenido la capacidad para sintetizarlas *de novo* (Cassera *et al.*, 2011). Se ha encontrado que *P. falciparum* incorpora pocas moléculas de orotato, uracil, uridina, timina o timidina marcadas radiactivamente en su ADN y, a pesar de que la mayoría de las enzimas para la recuperación de pirimidinas han sido identificadas, sus actividades son bajas, de forma que el parásito obtiene pirimidinas casi exclusivamente sintetizándolas a partir de bicarbonato (HCO_3^-), glutamina (Gln) y ATP para producir Uridina 5'-monofosfato (UMP) (Krungskrai y Krungskrai, 2016), los 6 pasos enzimáticos necesarios para la síntesis de pirimidinas se muestran en la **Figura 6** y todos son realizados por el parásito.

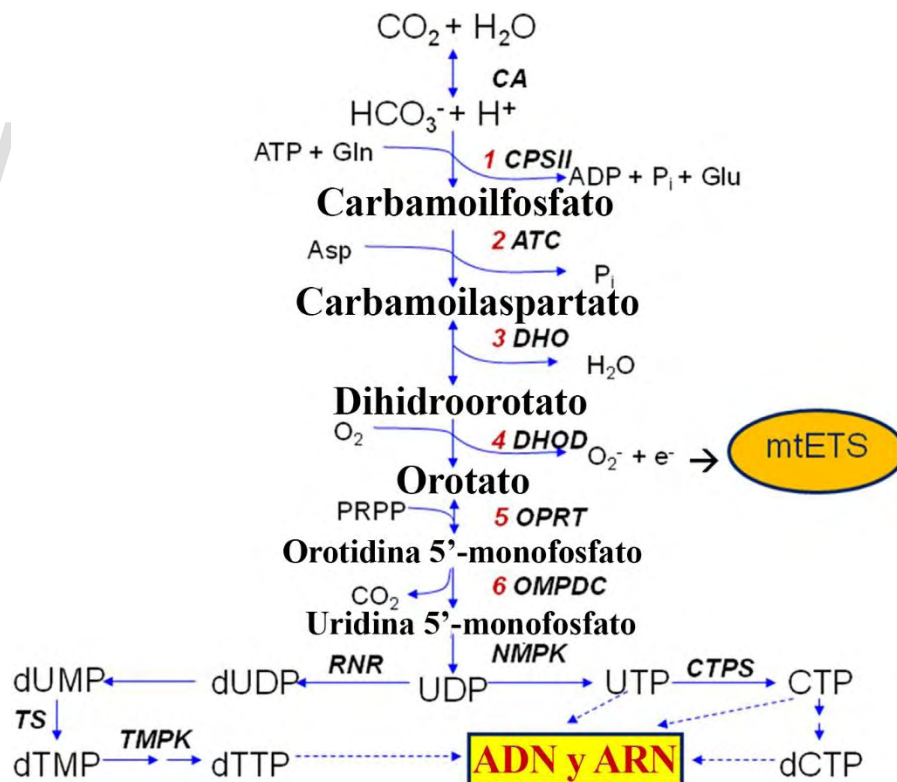


Figura 6 Esquema de la ruta para la síntesis de pirimidinas *de novo* en *P. falciparum*, tomado de (Krungskrai y Krungskrai, 2016)

La dihidroorotato deshidrogenasa (DHOD) permite la transformación de dihidroorotato en orotato mediante la reducción de ubiquinol y se encuentra en la membrana interna mitocondrial. Se ha propuesto que esta enzima requiere para su funcionamiento de varias de las enzimas implicadas en la cadena de

mitocondrial al oxidar malato en oxalacetato. Debemos destacar que *P. falciparum* posee una MDH citosólica pero no mitocondrial, una característica que no es compartida con otros integrantes del phylum Apicomplexa, por ejemplo, *T. gondii* si tiene MDH mitocondrial (Jacot *et al.*, 2016). Estas enzimas junto con la FH son indispensables para el parásito durante el ciclo intraeritrocítico, lo cual podría deberse a su participación en diferentes rutas metabólicas, como la FH en la recuperación de purinas (Jacot *et al.*, 2016).

1.2.3 Estrés oxidativo en *P. falciparum*

El parásito debe lidiar con un estrés oxidativo importante durante el ciclo intraeritrocítico. Los anillos, trofozoítos y esquizontes digieren hemoglobina para obtener aminoácidos para su desarrollo y también para poder ocupar un mayor espacio dentro del glóbulo rojo a medida que el parásito crece y se divide, debido a que la hemoglobina es la proteína más abundante del eritrocito (Olszewski y Llinas, 2011).

La digestión masiva de hemoglobina trae como consecuencia la necesidad de un sistema para deshacerse de los grupos hemo que contribuyen a la formación de especies reactivas de oxígeno (en inglés *reactive oxygen species*, ROS) como son: el ion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). *Plasmodium* acumula los grupos hemo en cristales de hemozoína, sin embargo, debido a la alta concentración de hemoglobina, parte de esta irremediablemente produce especies reactivas de oxígeno las que pueden producir daños celulares en distintos niveles al reaccionar con lípidos, aminoácidos, carbohidratos y ADN (Yu, 1994).

Es por ello que *Plasmodium* debe producir moléculas capaces de combatir este estrés oxidativo, para ello usa dos proteínas: la tioredoxina (Trx) y el glutatión (GSH). La Tiorredoxina es una pequeña proteína que puede donar electrones mediante la formación de un puente disulfuro entre residuos de cisteína de su estructura, la tioredoxina oxidada (Trx_{ox}) es reducida mediante la enzima tioredoxina reductasa (TrxR) en una reacción dependiente de NADPH. El glutatión es un tripéptido formado de glutamato, cisteína y glicina, que permite donar electrones a través del grupo tiol (SH) de la cisteína, por la unión de dos moléculas de glutatión unidos mediante un puente disulfuro, formando el glutatión oxidado (GSSG). El GSSG puede ser reducido formando nuevamente GSH mediante la enzima glutatión reductasa (GR) que, de forma similar a TrxR, emplea NADPH.

El glutatión es activamente sintetizado por el parásito mediante dos enzimas, la Gamma-glutamylcisteína sintetasa que produce γ -L-glutamyl-L-cisteína y la glutatión sintetasa que produce el

GSH agregando glicina a la γ -L-glutamyl-L-cisteína en una reacción que emplea la energía de la hidrólisis de ATP.

Existen otros procesos donde el Glutatión se ve involucrado como la S-glutationilaci n de proteínas (proteína-SSG) y también en la desintoxicación de compuestos mediante las glioxilasas (Becker *et al.*, 2003).

En *Plasmodium* la forma GSH (tiol) es la más abundante (2mM), mientras que la forma oxidada (GSSG) se encuentra en concentraciones de 10 M o menos, siendo concentraciones mayores a 100 M perjudiciales para el parásito. Otras formas donde est  presente el glutatión son las proteínas S-glutationiladas que se encuentran en una concentración de 10 M a 1mM, el S-glutatión-nitroso (GSNO), la forma GSO⁻ (el an n del ácido sulf nico GSOH), la forma Ar-SG donde Ar es un compuesto aromático y la coenzima A glutationilada (CoA-S-S-G), estas formas existen en concentraciones mucho menores y oscilantes (Becker *et al.*, 2003).

Gran parte del glutatión oxidado producido por el parásito debe ser excretado al eritrocito, y se ha encontrado un aumento de hasta 60 veces en la excreción de GSSG en eritrocitos infectados con *Plasmodium* respecto a eritrocitos no infectados (Becker *et al.*, 2003).

Es conveniente resaltar que aunque la tioredoxina también juega un papel en la regulación del estrés oxidativo, se ha encontrado que la contribución al potencial redox del parásito producida por el GSH es de -480mM.MV, al menos un orden de magnitud mayor que otros sistemas redox del parásito, lo que sugiere que el glutatión es el principal encargado de mantener reducido el entorno donde se desarrolla y cualquier cambio en lo que al estrés oxidativo respecta probablemente sea manejado por el parásito a través del reciclaje del glutatión mediante la GR o mediante la síntesis *de novo* de GSH (Becker *et al.*, 2003).

1.3 Control de la malaria

Debido a que la malaria produce miles de muertes y contagios a nivel mundial desde el siglo pasado se han implementado diferentes métodos para su control, que en esencia podemos separar en dos clases; orientados hacia el control del vector y orientados hacia el control del parásito, los dos enfoques implican un conjunto de metodologías particulares.

1.3.1 Control del vector

Los enfoques orientados hacia el control del vector buscan una disminución en el tamaño poblacional de los mosquitos del género *Anopheles* lo que implica una disminución en la propagación de la enfermedad, bloqueando la tasa de transmisión, este fin se alcanza mediante la implementación de tres métodos propuestos por la OMS a nivel mundial; mosquiteros tratados con insecticidas, rociado residual interdomiciliario y control de larvas (WHO, 2013, 2015), incluso se ha propuesto el empleo de mosquiteros rociados con drogas que atacan al *Plasmodium* y no al mosquito, un enfoque que contempla el control del parásito por medio de metodologías para el control del vector (Paton *et al.*, 2019).

En América existen varios vectores para la enfermedad, tanto para *P. falciparum* como para *P. vivax*, siendo estos; *Anopheles freeborni*, *An. pseudopunctipennis*, *An. quadrimaculatus*, *An. albimanus*, *An. albitarsis*, *An. aquasalis*, *An. darlingi*, *An. marajoara* y *An. nuneztovari* (Sinka *et al.*, 2012), en Venezuela y los países con más casos de malaria del continente, *An. darlingi* es el más relevante, esta es una especie antropofílica que puede picar tanto en el peridomicilio como en intradomicilio (Recht *et al.*, 2017), es por ello que es indispensable el control del vector en zonas urbanas y rurales para disminuir los contagios.

1.3.2 Drogas empleadas para combatir la malaria

Diferentes drogas antimaláricas han sido empleadas de manera masiva desde el siglo XX. Hasta los años 30 la quinina era la principal droga contra malaria, esta se extraía de un árbol de América del Sur del género *Cinchona*, aunque la resistencia a esta droga surgía esporádicamente, con el devenir de la segunda guerra mundial se apresuró la búsqueda de otros medicamentos contra la malaria (Malaria Site, 2015). En el año 1934 se descubre la cloroquina (CQ), que solo pudo usarse luego del final de la segunda guerra mundial, salvando a millones de personas por al menos 20 años, antes de que se apareciera la resistencia a la droga (Krafts *et al.*, 2012). Durante el siglo XX diversos investigadores buscaron sustitutos para la cloroquina, permitiendo el surgimiento de la Primaquina en 1950, actualmente en uso principalmente contra los gametos y los hipnozoíto de *Plasmodium vivax*. Otras drogas son la sulfadoxina/pirimetamina desarrollada en 1967 o la mefloquina en 1985, sin embargo, la resistencia a estas surgió a pocos años de su implementación debido a su uso masivo (Malaria Site, 2015; Antony y Parija, 2016). Por otra parte, el conocimiento de las propiedades de la *Artemisia annua* contra la malaria se remontan a casi 2000 años, según lo expuesto en el libro de Ge Hong (Burns, 2008), pero no fue hasta el año 1967 cuando científicos chinos comenzaron a tratar de aislar el compuesto antimalárico, reportándose en 1979 el resultado de los estudios en humanos (Malaria Site, 2015), es por ello que se le

otorgó el premio nobel de Medicina a Tu Youyou en 2015 por su contribución al aislamiento de la droga (Nobel Prize, 2015). En la actualidad tratamientos basados en artemisinina son los recomendados como primera arma contra la malaria producida por *P. falciparum* según la OMS (WHO, 2018b).

1.3.3 Surgimiento de resistencia en *Plasmodium spp.*

La aparición de resistencia en *Plasmodium* a los fármacos antimaláricos se ve reflejada en una supervivencia o multiplicación del parásito, a pesar de la administración y absorción de la droga dada en dosis iguales o mayores a las recomendadas, tomando en cuenta la tolerancia del sujeto (WHO, 2010). Esta resistencia puede ser producida por una o múltiples mutaciones, que podrían estar asociadas a grandes niveles de parasitemia, ambientes con uso indiscriminado de los fármacos antimaláricos o también uso de los fármacos en dosis demasiado bajas. Las resistencias a diversos fármacos se han generado en diferentes momentos fuera de África, es el caso de la resistencia a cloroquina que surgió en dos focos independientes, uno en América del Sur y otro en el Sudeste asiático en los años 70. Todas las resistencias a drogas antimaláricas esparcidas por Asia se han generado en la frontera de Tailandia y Camboya más específicamente en la provincia de Pailin, se cree que factores como poco acceso a medicinas, uso de medicamentos falsos o de mala calidad, dosis reducidas, uso de monoterapias y un intenso tráfico de personas han contribuido a formar cepas resistentes a casi todas las drogas antimaláricas, incluso a la artemisinina, la más usada actualmente (Paloque *et al.*, 2016). Se ha observado que la resistencia tiende a surgir con mayor frecuencia en cepas de *P. falciparum* que en *P. vivax*, como ejemplo de ello, se puede mencionar que a este último todavía se lo controla empleando cloroquina (Phong *et al.*, 2019), mientras que para tratar *P. falciparum* no se usa cloroquina desde hace décadas debido a su resistencia a esta droga a nivel global.

Los tratamientos recomendados actualmente por la OMS para tratar malaria por *P. falciparum* son los basados en artemisinina, sin embargo, se ha encontrado la resistencia a la artemisinina en cepas de este parásito en el sudeste asiático (Haldar *et al.*, 2018; Phong *et al.*, 2019).

1.4 Resistencia de *P. falciparum* a artemisinina

En el año 2008 se reportó resistencia a la artemisinina en Camboya (Noedl *et al.*, 2008), en base a una persistencia del parásito en sangre luego de 7 días de tratamiento o una reemergencia del parásito en los 28 días después de comenzar el tratamiento. Esta resistencia puede rastrearse hasta años antes de 2008 en la zona, entre 2002 y 2005 se encontró un aumento en los tiempos de eliminación del parásito en el borde entre Camboya y Tailandia, en septiembre de 2005 la OMS alertó del potencial surgimiento

de resistencia a la artemisinina en la subregión del Gran Mekong (GMS) en el sudeste asiático (WHO, 2010), nombre que toma por el Río Mekong que cruza el territorio de 6 países: China, Birmania, Tailandia, Laos, Camboya y Vietnam (Wikipedia, 2020b, 2020a). En vista al panorama, en 2006 la OMS propone eliminar el uso de monoterapia de artemisinina, o drogas derivadas para tratar la malaria por *P. falciparum*, haciéndose esto efectivo en 2007, luego en 2009, se confirma la resistencia en la zona y se crea un plan para contenerla (WHO, 2010, 2011). Desde entonces se han publicado distintos reportes donde se actualiza la situación respecto a la resistencia contra la artemisinina en cepas de *P. falciparum*; uno en enero de 2014 (WHO, 2014), otro en agosto de 2018 (WHO, 2018a).

En el último reporte de la OMS (WHO, 2018b), se menciona que hasta 2018 no había evidencia de resistencia completa a la artemisinina por parte del parásito y que la resistencia parcial surgida en la subregión del Gran Mekong no ha podido ser asociada con un aumento en la morbilidad o mortalidad, se resalta que todavía los ACTs son el principal tratamiento efectivo contra la malaria. Esto muestra que la situación podría ser mucho más grave si aparecen cepas con una resistencia más pronunciada a los ACTs razón para que todos los países de la GMS sean monitoreados frecuentemente respecto a la eficacia de los tratamientos y al parecer, al menos en esta región, han sido evaluados durante la última década. El reporte habla poco respecto al continente americano, principalmente por falta de estudios, y los pocos que hay no mostraban la presencia de cepas resistentes, no obstante Vreden *et al.* (2013) encuentran una reducción en el periodo de eliminación del parásito en Suriname al comparar un grupo pequeño de pacientes en 2005-2006 con un grupo de 2011, Mathieu *et al.* (2020) muestran que en la Amazonia se ha encontrado la mutación C580Y en el gen *pfkfch* 13, asociada con resistencia *in vitro* en *P. falciparum*. Sin embargo, esta mutación esta poco esparcida en la región, más estudios son requeridos para saber la verdadera situación actual respecto a la resistencia en América del sur.

1.4.1 Marcadores genéticos de la resistencia a la artemisinina y la proteína pfkfch13

Una de las primeras aproximaciones al mecanismo de acción de la artemisinina, y a un posible mecanismo para generar resistencia, fue la ATPasa dependiente de Ca^{+2} del retículo sarcoplasmático (SERCA), que tiene un ortólogo en *Plasmodium falciparum* (PfATP6). Esta proteína interactúa con la artemisinina en el parásito (Shandilya *et al.*, 2013) y se ha propuesto que un cambio en un aminoácido (L263E) en el tercer segmento transmembranal modula la susceptibilidad a la artemisinina en *Plasmodium falciparum* (Uhlemann *et al.*, 2005). Este mecanismo de resistencia ha sido polémico (Sanjeev Krishna *et al.*, 2010), pues pocos años después de la publicación de dicho estudio se encontró que *Plasmodium berghei*, una especie que infecta roedores, puede generar resistencia heredable a la

artemisinina sin mostrar mutaciones en el gen *atp6* (Afonso *et al.*, 2006), lo que pone en duda que mutaciones en esta ATPasa puedan estar involucradas en la resistencia a la droga. En la actualidad se han encontrado al menos 124 proteínas con las que la artemisinina puede interactuar (Ismail *et al.*, 2016), estas proteínas se encuentran implicadas en diferentes rutas metabólicas lo que sugiere un mecanismo de acción mucho más complejo (Wang *et al.*, 2017).

Otra asociación de la resistencia de *P. falciparum* a la artemisinina ha sido encontrada con una o varias mutaciones en el gen *pfkelch* en el cromosoma 13 reportada inicialmente por Ariey *et al.* (2014), luego se ha corroborado por otros investigadores (Mok *et al.*, 2015; Haldar *et al.*, 2018). Aunque el mecanismo de acción de esta resistencia aún es desconocido se propone que las cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina activan rutas de plegamiento de proteínas, probablemente para reparar los daños causados por la artemisinina, que produce proteólisis inespecífica dentro del parásito (Mok *et al.*, 2015; Haldar *et al.*, 2018).

Evidencias mucho más recientes sugieren que la proteína PfKelch 13 podría mediar la ingesta de hemoglobina por el parásito por medio de vesículas que lucen como citostomas, estructuras por donde ocurre fagocitosis en distintos protozoarios, al parecer las mutaciones en la proteína PfKelch 13 producen un importe deficiente de hemoglobina y esto genera una disminución en la activación de la droga y por lo tanto menor daño a las estructuras del parásito (Yang *et al.*, 2019; Birnbaum *et al.*, 2020; Gnadig *et al.*, 2020). Estos estudios además sugieren la presencia de varias proteínas que interactúan con PfKelch 13 para producir la ingesta de hemoglobina, y que seguramente serán el foco de investigación respecto a esta resistencia en los próximos años.

Además otros mecanismos para explicar la resistencia han sido propuestos, es el caso de Mbengue *et al.* (2015) quienes proponen que la resistencia se produce por un aumento en las concentraciones de fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P), debido a que la proteína PfKelch 13 mutada no puede interactuar de manera eficiente con la fosfatidilinositol 3 fosfato quinasa (PI3PK), y producir la ubiquitinación de esta última causando su degradación. De esta manera las cepas resistentes tendrían una mayor cantidad de PI3PK y con ello PI3P. Otros investigadores han obtenido *in vitro* cepas Dd2 de *P. falciparum* con una tolerancia a la artemisinina 25 veces mayor respecto a cepas sensibles, así como un aumento en el número de copias del gen *pfmdr1* y un aumento en la expresión de enzimas implicadas en la defensa contra el estrés oxidativo (Cui *et al.*, 2012).

1.4.2 Latencia en cepas resistentes de *P. falciparum*

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la resistencia a la artemisinina es un retraso en el ciclo celular de *P. falciparum* el cual permite que el parásito evada los efectos de la droga y que pueda continuar con su ciclo celular una vez hayan disminuido las concentraciones de dihidroartemisinina (DHA) en sangre, que es metabolizada rápidamente en el ser humano. Este mecanismo fue propuesto en primer lugar en un modelo teórico por Hoshen *et al.* (2000), quienes plantearon que la dormancia podría explicar las discrepancias en los niveles de parasitemia en sangre tomando en cuenta el periodo de efectividad del artesenuato (droga similar a la artemisinina) en el cuerpo. Este periodo de dormancia en la que los parásitos pueden retrasar su ciclo ha presentado una duración de 3 a 8 horas (Kyle y Webster, 1996), 24 horas (Hoshen *et al.*, 2000), más de 20 días (Teuscher *et al.*, 2010) y 28 días (Codd *et al.*, 2011). Es necesario resaltar que la dormancia permite al parásito evadir los efectos de la droga, pero no implica resistencia propiamente dicha (Cheng *et al.*, 2012).

Evidencia más reciente propone que la latencia es producida por la fosforilación de la subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción de eucariotas (eIF2 α , PF3D7_0728000) por medio de la quinasa de eIF2 α 4 (PK4, PF3D7_0628200), a la fecha este es el mecanismo mejor descrito que puede explicar la latencia en *Plasmodium* producida por la artemisinina.

1.5 Estudios bioinformáticos en parásitos

Los estudios bioinformáticos representan una posibilidad sin precedentes para realizar simulaciones en biología, que permiten plantear y probar las hipótesis *in silico*, incluso antes de realizar estudios experimentales (Di Ventura *et al.*, 2006). El enfoque que surge en el siglo XXI se contrapone al del siglo XX, ponderando la integración sobre la simplificación, esto ha sido posible gracias a las herramientas tecnológicas que han surgido en el presente siglo. Denominamos como *in silico* a cualquier estudio que se desarrolle haciendo uso de herramientas informáticas y abordan áreas muy diversas en la biología, desde el modelado de drogas novedosas (Dasgupta *et al.*, 2009; Fatumo *et al.*, 2009) hasta el modelado de la distribución e incidencia de enfermedades e incluso predecir epidemias (Darkoh *et al.*, 2017; Hussien *et al.*, 2017). Los parásitos humanos han sido ampliamente estudiados mediante técnicas *in silico* (Tong y Ng, 2011), permitiendo no solo conocer su genotipo sino entender cómo se expresa su fenotipo y su comportamiento poblacional y evolutivo.

1.5.1 Tecnologías ómicas en estudio de *Plasmodium*

En el presente siglo se ha visto un acelerado crecimiento en la cantidad de datos biológicos obtenidos mediante diferentes técnicas experimentales cada vez más robustas, flexibles y económicas, las tecnologías ómicas permiten la obtención y clasificación de dichos datos a fin de comprender los organismos como un sistema (Schneider y Orchard, 2011). La palabra ómico (del inglés *Omics*) es un sufijo que significa la medición total del complemento de un nivel de moléculas biológicas e información, con esto en mente podemos mencionar a las principales ómicas, que son cuatro; Genómica, que es el estudio cuantitativo de las secuencias codificantes, elementos reguladores y secuencias no codificantes, Transcriptómica, que hace uso de medidas del mRNA y expresión génica, Proteómica, que analiza la abundancia de proteínas y Metabolómica, que evalúa metabolitos y redes metabólicas (Schneider y Orchard, 2011), no obstante el sufijo se ha usado para muchos otros como el “Quinoma” (*kinome*) que representa el total de las quinasas de un organismo (Johnson y Hunter, 2005) o “Epigenoma” que estudia todos los patrones epigenéticos.

Estudiar a los organismos con una visión más amplia, analizando numerosos datos, intentando comprender un sistema de muchos componentes es una visión novedosa a nivel molecular, en parte permitida con el surgimiento de las nuevas tecnologías, pero también por un cambio en la concepción de las investigaciones, un estudio Genómico contempla toda las secuencias en el ADN del organismo mientras que un estudio genético se plantea preguntas dentro de unos pocos genes o variantes (Hasin *et al.*, 2017). La comprensión de diferentes enfermedades se ha visto beneficiada enormemente por los enfoques ómicos, especialmente cuando los orígenes de la patología involucran diferentes genes, modificaciones postraduccionales, patrones epigenéticos o incluso a microorganismos (Hasin *et al.*, 2017).

Con lo dicho no es de extrañar que estas tecnologías ómicas hayan sido aplicadas en parásitos, y en *Plasmodium* existen más de 20 años de estudios que lo corroboran. Como inicio podemos mencionar el Genoma de *Plasmodium* publicado por Gardner *et al.* (2002) solo un año después de la publicación de la primera versión del genoma humano (Moraes y Goes, 2016), luego se publica la proteómica (Florens *et al.*, 2002) y transcriptómica (Roch *et al.*, 2004), en los años siguientes se registró un aumento en los trabajos de *Plasmodium* que emplean un enfoque ómico, tendencia que sigue hasta nuestros días. Tanta información puede resultar difícil de condensar, y han surgido distintas bases de datos para que sea fácilmente accesible para cualquier investigador, en el caso del género *Plasmodium* PlasmoDB es la base de datos más completa y provee información de genómica, transcriptómica, proteómica y un conjunto de

herramientas para hacer comparaciones o análisis (Aurrecochea *et al.*, 2009). Cada proteína o gen reportado en PlasmoDB presenta enlaces a otras bases de datos para complementar toda la información dada, para este trabajo las siguientes serán de gran utilidad; función metabólica y ubicación en los mapas metabólicos realizados para *Plasmodium* suministrados por MPMP -*Malaria Parasite Metabolic Pathways*-, artículos científicos donde se menciona a la proteína o el gen en cuestión disponibles en PubMed del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)(NCBI, 1988), Secuencia en aminoácidos y estructura de la proteína (si la tiene).

1.5.2 Importancia y ventajas de los estudios *in silico* en *Plasmodium falciparum*

Conviene indagar más en la importancia de estudios *in silico* en parásitos, abordando a *Plasmodium* en este enfoque. En el caso de los estudios experimentales de genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, producen datos que son procesados inevitablemente *in silico*, por lo que el procesamiento de datos para responder a preguntas puntuales y pertinentes requiere el uso de la informática. Todo esto ha sido ampliamente utilizado para *Plasmodium*, principalmente en *P. falciparum*, quien es el parásito más estudiado de este género, contando en la actualidad con la transcriptómica del parásito en diferentes estadios de su ciclo de vida. Por ejemplo, en la base de datos PlasmoDB se cuenta con al menos 13 publicaciones que han hecho uso de la tecnología RNA-seq para diferentes cepas y diferentes microambientes, además, se cuenta con varios ensamblados genómicos para varias “cepas” (Gardner *et al.*, 2002) .

Las herramientas bioinformáticas también permiten la identificación de posibles blancos para nuevas drogas (Dasgupta *et al.*, 2009; Fatumo *et al.*, 2009), que pueden ser modeladas antes de sintetizarlas en laboratorio (Ranjit Kumar, 2007), otra aplicación relevante es la realización de modelos y simulaciones epidemiológicas de la enfermedad (Darkoh *et al.*, 2017), estos son solo algunos de los aspectos abordados en *P. falciparum* empleando dichas herramientas.

1.5.3 La resistencia a artemisinina en *P. falciparum* mediante técnicas bioinformáticas

Los estudios bioinformáticos son un enfoque adecuado para abordar la resistencia a ART en *P. falciparum* y pueden servir para dilucidar las características metabólicas y funcionales de la resistencia, gracias a la enorme cantidad de datos y técnicas bioinformáticas disponibles. PlasmoDB tiene a disposición la caracterización de las cepas resistentes y su expresión génica (Mok *et al.*, 2015), que permite hacer comparaciones entre los perfiles de expresión de distintas cepas de *P. falciparum* (Zanghi *et al.*, 2018). Siddiqui *et al.* (2017) realizan un enfoque multiómico de cepas resistentes, evaluando

proteómica, metabolómica y peptidómica. Además la bioinformática en la resistencia a la artemisinina ha sido usada en muchos otros trabajos (S. Krishna *et al.*, 2004; Saralamba *et al.*, 2010; Cheeseman *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2012; Carey *et al.*, 2017), donde se han modelado proteínas, planteado ciclos de desarrollo del parásito e incluso modelos metabólicos de análisis de flujo.

El presente trabajo plantea la construcción de un modelo metabólico teórico en cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina usando para ello toda la evidencia ya obtenida mediante estudios bioinformáticos, tomando en cuenta el hecho de que todavía no se entiende del todo el mecanismo que sucumbe en dichas cepas (Wang *et al.*, 2017). Se pretende comenzar con los datos de expresión génica obtenidos por (Mok *et al.*, 2015).

www.bdigital.ula.ve

2 HIPÓTESIS

Basados en las evidencias de datos provenientes de transcriptómica, metabolómica, genómica, proteómica, y otros estudios moleculares, sobre cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina, se propondría un modelo metabólico que permita dilucidar uno o varios mecanismos empleados por el parásito para tolerar los efectos de la artemisinina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Construir un modelo metabólico teórico basado en la evidencia obtenida mediante diferentes técnicas sobre cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina

3.2 Objetivos específicos

1. Realizar una revisión bibliográfica extensa sobre la resistencia a la artemisinina, regulación y expresión génica en *P. falciparum*.
2. Construir una base de datos con los genes expresados por *P. falciparum* en la resistencia a la artemisinina
3. Inferir la función de las proteínas de *P. falciparum* con función desconocida expresadas en cepas resistentes mediante herramientas bioinformáticas, asociándolas con la resistencia a artemisinina.
4. Evaluar el posible rol metabólico de las proteínas asociadas con la resistencia haciendo uso de bases de datos especializadas en metabolismo.
5. Presentar un modelo actualizado para el mecanismo de resistencia a la artemisinina en *P. falciparum*.

4 JUSTIFICACIÓN Y APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS

En Venezuela la problemática con la malaria se ha venido agravando en los últimos años, con un incremento sin precedentes, llegando a un estimado de más de 1 millón para final de 2018 (Bruzual *et al.*, 2018). Inclusive, se ha visto un alarmante aumento en casos reportados para *P. falciparum* en zonas históricamente libres de este parásito, con reportes anuales de más del 2% entre 2016 y 2017 (OMS y OPS, 2018). En el país, factores como la minería ilegal, la puesta en marcha del Arco Minero, tráfico de hidrocarburos y drogas (Recht *et al.*, 2017; Bruzual *et al.*, 2018), sumado a una drástica reducción en el presupuesto para combatir y vigilar esta enfermedad (OMS, 2016) han contribuido con esta grave situación. La crisis actual se ha mencionado en varios reportes de la Organización Mundial de la Salud para la región (OMS, 2016; WHO, 2018b) y también en otras fuentes (Bruzual *et al.*, 2018). Además a nivel mundial la malaria representa un problema grave para la salud en los trópicos que todavía no se ha podido erradicar y los tratamientos basados en artemisinina son la primera arma contra la malaria producida por *P. falciparum* (WHO, 2018b). Es alarmante que en el sudeste asiático se estén reportando cepas con mayor tolerancia a la artemisinina y es prioritario entender el mecanismo, o los mecanismos, que subyacen bajo esta resistencia. En vista a que no se ha esclarecido del todo los cambios metabólicos que le permiten al parásito tolerar la artemisinina, se pretende proponer un modelo metabólico teórico en base a la evidencia obtenida mediante distintas tecnologías para explicar la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum*.

5 METODOLOGÍA

5.1 Análisis de la función de proteínas desconocidas

P. falciparum posee un alto número de proteínas generalmente denominadas como “proteínas conservadas de *Plasmodium* con función desconocida”. Partiendo de lo numerosas que son y a que tienen cambios en su expresión en diferentes transcriptómicas realizadas en cepas resistentes a la artemisinina como las descritas por Mok *et al.* (2015) o Cui *et al.* (2012), se propone la búsqueda de la posible función de un grupo de estas proteínas, aquellas que tengan cambios en la expresión en cepas resistentes.

Basándose en los genes cuya expresión se ve correlacionada con las cepas resistentes de *P. falciparum*, 487 genes sobreexpresados y 511 genes subexpresados, reportados por Mok *et al.* (2015), se procedió a buscar cada proteína y descargarla en PlasmoDB a fin de verificar su función (Aurrecoechea *et al.*, 2009).

De las 998 proteínas reportadas por los investigadores mencionados se encontraron 285 proteínas con función desconocidas, 126 correlacionadas positivamente y 159 negativamente, la metodología para analizarlas es la siguiente:

- a) Se investigó la secuencia de aminoácidos de cada proteína en Hmmer, que permite buscar secuencias homólogas mediante alineamiento usando modelos probabilísticos basados en perfiles ocultos de Markov (HMMs) (Eddy, 2011). Para este análisis se emplearon los valores de la búsqueda por omisión *E-values* Sequence: 0.01; Hit: 0.03. Significance bit scores Sequence: 25.0; Hit: 22.0. La búsqueda se realizó en tres bases de datos disponibles en Hmmer: Reference proteomes, UniProtKB y SwissProt, de ellas SwissProt es la menos extensa pero la más curada y UniProtKB es la más extensa y menos curada. Los resultados de cada enzima se guardaron en formato .txt mediante la opción “Descargar” (*Download*) suministrada por el portal.
- b) Las secuencias fueron analizadas con la herramienta MotifScan del portal MyHits (Pagni *et al.*, 2007) que forma parte del ExPASy, provisto por el instituto Suizo de Bioinformática (SIB), este portal permite encontrar motivos descritos en otras bases de datos (Pfam, Prosite, HAMAP) en la secuencia de interés, los resultados fueron guardados para cada proteína, el portal muestra con el símbolo “!” aquellos motivos con un alto grado de certeza y con “?” aquellos motivos con poco certeza que fueron omitidos.
- c) Haciendo uso del portal de NCBI se realizó un PSI-Blastp (*Position-Specific Iterated BLAST*), que es más sensible a la detección de secuencias biológicamente relevantes que el BLAST (*Basic*

Local Alignment Search Tool), este último permite hacer alineamientos de la secuencia de interés con muchas otras a fin de encontrar similitudes entre estas (Altschul *et al.*, 1997), los resultados fueron guardados en formato texto plano (.txt) mediante la opción “Descargar” (*Download*) de la página de resultados del PSIBlast, se realizaron dos búsquedas para cada secuencia, una sin excluir ningún grupo taxonómico y otra excluyendo al grupo *Plasmodium* (Id: 5820), debido a que en muchos casos las secuencias mostraban parecido con otras secuencias desconocidas de *Plasmodium* de otras especies, siendo posibles homólogos de la proteína de interés.

- d) Con Interpro también se analizó cada secuencia de aminoácidos, este portal emplea a la vez otros como Pfam y PANTHER para clasificar las proteínas en familias, superfamilias y predecir la presencia de dominios y otros sitios importantes (Mitchell *et al.*, 2019) , los resultados encontrados con Interpro fueron guardados en PNG y SVG, este último permite revisar el resultado de manera más detallada, de ser necesario.
- e) Una vez encontrados indicios de una posible función en cada proteína, se suplementó el resultado con información de trabajos científicos muchas veces con la bibliografía reportada en las entradas de Interpro o también realizando una búsqueda manual en NCBI o Google scholar.
- f) En base a la información recabada se propuso la posible función de cada proteína y qué papel podría estar presentando en la resistencia a la artemisinina.

5.2 **Construcción de un Modelo metabólico para las cepas resistentes de *P. falciparum* a la artemisinina**

Mediante el empleo de datos de transcriptómica, proteómica, metabolómica, genómica y otras evidencias se propuso un posible modelo metabólico para las cepas resistentes a la artemisinina, esta información se ve resumida en la **Tabla 1**, se tomaron en cuenta, principalmente, los datos de transcriptómica obtenidos por Mok *et al.* (2015) debido a que contempla gran parte de la variabilidad en la expresión genica obtenida de 13 zonas endémicas para la malaria ubicadas principalmente en el sudeste asiático, con muestras de 1043 pacientes. También se incluyeron otros trabajos con evidencia obtenidas de cepas resistentes *in vitro*. Se esquematizaron las enzimas implicadas en diferentes rutas metabólicas y se construyó un modelo que concordara con la evidencia obtenida mediante diferentes técnicas.

Para la obtención de las rutas metabólicas se usó principalmente el servidor *Malaria Parasite Metabolic Pathways* (MPMP, Ginsburg *et al.* (2020)), en esta página se encuentran esquemas de las

principales rutas del parásito con genes identificados por su ID de plasmDB, número EC (*Enzyme Commission numbers*) e incluso si la enzima puede ser inhibida por alguna droga específica.

Tabla 1 Trabajos sobre las cepas resistentes a la artemisinina de *P. falciparum* empleados para la construcción del modelo metabólico

Descripción	Referencia
Análisis de 1043 aislados sanguíneos originados de 13 regiones endémicas de malaria del sudeste asiático y África	(Mok <i>et al.</i> , 2015)
Selección <i>in vitro</i> de cepas Dd2 para producir cepas resistentes a la artemisinina	(Cui <i>et al.</i> , 2012)
Análisis de cepas resistentes a la artemisinina mediante cromatografía líquida y espectrometría de masa	(Siddiqui <i>et al.</i> , 2017)
En cepas resistentes con la mutación C580Y se evaluó el metabolismo del fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P) y la posible relación entre la proteína PfKelch 13 con la enzima Fosfatidilinositol-3-fosfato quinasa (PFPI3K)	(Mbengue <i>et al.</i> , 2015)
Análisis de los cambios metabólicos en cepas sensibles de <i>P. falciparum</i> al aplicar artemisinina y otras drogas antimaláricas	(Cobbold <i>et al.</i> , 2016)
• Posible asociación entre la resistencia a la artemisinina y la mutación en la proteína PfKelch13 y su relación con digestión de hemoglobina (Hb). • Estudio de la ruta endocítica mediada con Pfkclh13 y su asociación con la resistencia a la artemisinina • Estudio de la ubicación celular y asociación proteica de la proteína PfKelch13 y su asociación con la resistencia. • Asociación entre la degradación de Hb y la sensibilidad de anillos de <i>P. falciparum</i> a la artemisinina.	(Yang <i>et al.</i> , 2019) (Birnbbaum <i>et al.</i> , 2020) (Gnadig <i>et al.</i> , 2020) (Xie <i>et al.</i> , 2016)
Mapa global de la ubicación de los polimorfismos en la proteína PfKelch13	(Ménard <i>et al.</i> , 2016)
Evaluación de la mutación C580Y y otras cepas sin mutaciones en para la resistencia a la artemisinina	(Mukherjee <i>et al.</i> , 2017)
Determinación de las proteínas que interactúan con la artemisinina	(Ismail <i>et al.</i> , 2016)
Modelo matemático de las cepas resistentes, con un periodo de latencia	(Saralamba <i>et al.</i> , 2010)
Estudio de las proteínas que se expresan en diferentes rutas metabólicas en cepas con dormancia	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
Evaluación del potencial de membrana en una pequeña muestra de parásitos en dormancia	(Peatey <i>et al.</i> , 2015)

5.3 Modelado de un posible transportador de citrato/ α -cetoglutarato mitocondrial de *P. falciparum*

Del modelo metabólico obtenido se planteó que la proteína PF3D7_1223800, homólogo de la proteína YHM2 de levaduras que es un transportador mitocondrial de citrato/ α -cetoglutarato que contribuye a la tolerancia al estrés oxidativo en estos hongos, podría estar relacionado con las rutas

involucradas en combatir el estrés oxidativo en las cepas resistentes a la artemisinina de *P. falciparum* (sección 7.2.1), por ello se decidió realizar un análisis mediante otras técnicas bioinformáticas en esta proteína que será denominada PfCOCP (del inglés *citrate/oxoglutarate Carrier protein*).

Para PfCOCP se realizó un modelado y acoplamiento molecular (*dockings*). Para ello se tomaron en cuenta las estructuras del transportador en la conformación C, abierto al citosol, y la conformación M, abierto hacia la mitocondria. La metodología empleada fue la siguiente:

- a) Se obtuvo la secuencia en aminoácidos de la proteína PfCOCP en PlasmoDB y del NCBI otras secuencias de transportadores mitocondriales que pudieran ser de interés para compararla mediante alineamientos con la proteína de *P. falciparum*, estas otras secuencias incluyeron otras especies del género y a YHM2, el transportador de citrato/ α -cetoglutarato de *S. cerevisiae*.
- b) Mediante el servidor Phyre 2 se obtuvo un modelado de PfCOCP, este algoritmo permite construir un modelo 3D al buscar homologías con otras secuencias usando modelos de cadenas ocultas de Markov, y de la misma manera, permite realizar simulaciones del plegamiento de zonas de la proteína que no tienen homología detectable (Kelley *et al.*, 2015), la proteína modelada obtenida se encuentra en la conformación que permite la unión al sustrato en el citosol (conformación C o estado C).
- c) El modelo obtenido fue refinado dos veces con GalaxyRefine, este programa realiza varias perturbaciones y relajaciones en la proteína, posteriormente muestra los 5 mejores resultados del refinamiento en cuanto a valores de GDT-HA, RMSD, MolProbity y Rama favored (Heo *et al.*, 2013), este último se refiere a que tan adecuada es la conformación de la proteína respecto a los ángulos de rotación de los carbonos de cada aminoácido propuesto en el diagrama de Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963), se tomó especial atención a este valor debido a que la mayoría de las estructuras secundarias vistas en las proteínas concuerdan con las predicciones y limitaciones teóricas del diagrama (Voet y Voet, 2006).
- d) Un segundo modelado de PfCOCP usando el servidor SwissModel (Waterhouse *et al.*, 2018) fue realizado empleando como molde el transportador de ADP/ATP de *Thermothelomyces thermophilus* (PDB id: 6GCI) con la finalidad de obtener la proteína en la conformación que permite la unión del sustrato en la matriz (conformación M o estado M), este modelo también se refinó con GalaxyRefine.
- e) Además de los valores mencionados para evaluar la calidad de los resultados, se usó el portal SwissModel para obtener los gráficos de Ramachandran del modelo original y cada paso de

refinamiento, a fin de verificar gráficamente las mejoras en la proteína obtenida, se utilizó para ello la opción de *Structure Assessment* de la pestaña *Tools* disponible en esta herramienta.

- f) Una vez obtenido el modelo refinado se procedió a realizar *dockings* (acoplamientos moleculares) con posibles sustratos de la proteína usando el servidor SwissDock (Grosdidier *et al.*, 2011), este servidor permite usar los modelos ya obtenidos, en formato PDB, y acoplarlos con diferentes sustratos disponibles en la base de datos ZINC (Irwin y Shoichet, 2005). Para este docking se usaron los sustratos por separado; Citrato (ZINC895081) y α -cetoglutarato (ZINC1532519). Se seleccionaron los mejores acoplamientos dependiendo de los parámetros *FullFitness* y ΔG , buscando en ambos valores negativos (Grosdidier *et al.*, 2007).
- g) Usando el software UCSF Chimera 1.13.1 (Pettersen *et al.*, 2004) se visualizaron los acoplamientos obtenidos de SwissDock con la opción *ViewDock*, se buscó el acoplamiento más adecuado en cuanto a los parámetros ya mencionados y se visualizaron los residuos de aminoácidos posiblemente implicados en la interacción con el sustrato, para ello se simulaban los puentes de hidrogeno en Chimera usando la opción *FindHBond*. La unión del sustrato con la proteína se comparó con la información reportada en la literatura para transportadores mitocondriales.
- h) Se realizaron alineamientos de las secuencias a fin de evaluar sitios conservados entre los diferentes transportadores mitocondriales, para los alineamientos se usó el modo Expresso del servidor T-Coffee, que es recomendado para trabajar con secuencias donde existan estructuras conocidas (Di Tommaso *et al.*, 2011), siendo el caso de esta clase de transportadores que cuentan con varias estructuras determinadas por cristalografía. Otras dos herramientas también fueron usadas para alineamientos; MUSCLE (Edgar, 2004) y MAFFT (Kato y Standley, 2013)
- i) Se evaluaron los lugares conservados de los alineamientos en base a la literatura ya conocida de los transportadores mitocondriales.
- j) Las secuencias alineadas de *Plasmodium* spp. fueron usadas para calcular el valor de π (diversidad nucleotídica) que es el número promedio de diferencias entre nucleótidos por sitio entre dos secuencias de ADN seleccionadas aleatoriamente (Nei y Li, 1979), con el fin de evaluar cómo ha cambiado la proteína en diferentes especies del género. A las mismas secuencias se les realizó la prueba D de Tajima, que evalúa si hay regiones en la secuencia con bajo neutralidad (Tajima, 1989).
- k) Se realizó un árbol filogenético con MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), empleando las secuencias de *Plasmodium* spp. para la proteína PfCOCP, se usó primero la opción *Find Best DNA/Protein Models* que encuentra el modelo más adecuado, usándose luego en un árbol de máxima

verosimilitud probando la filogenia con el método de *Bootsrap* en 1000 repeticiones. El árbol obtenido fue comparado con la filogenia de *Plasmodium spp.* reportada en la literatura.

www.bdigital.ula.ve

6 RESULTADOS

6.1 Análisis de la función de proteínas desconocidas

En el análisis de la función proteica se pudo establecer la posible función de 31 de 126 proteínas correlacionadas positivamente (**Tabla 2**), mientras que para 159 proteínas correlacionadas negativamente se pudo establecer la posible función de 35 (**Tabla 3**). Varias de estas proteínas se pudieron asociar con procesos metabólicos específicos, como se resume en la **Figura 8 y Figura 9** para las proteínas correlacionadas positiva y negativamente, respectivamente.

6.1.1 Proteínas correlacionadas positivamente

De estas proteínas se identificaron al menos 6 proteínas que probablemente se encuentren implicadas en el procesamiento del material genético (transcripción, traducción, entre otras, **Figura 8**). Inicialmente la proteína PF3D7_1442800 fue asociada con un factor de elongación EF1B, por la herramienta Interpro, este factor cumple el papel de reciclar el factor de elongación EF1A que es indispensable para el acoplamiento del ARNt con el ribosoma, EF1A se enlaza al GDP una vez que ocurre su hidrólisis y es en este momento que EF1B es necesario para restaurar EF1A (Andersen *et al.*, 2003).

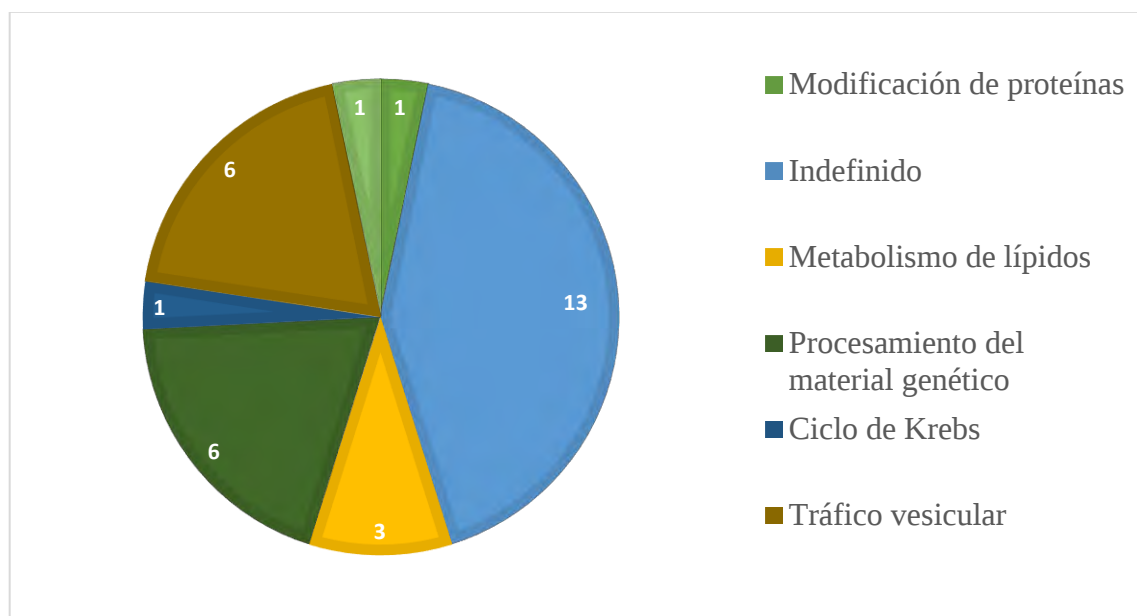


Figura 8 Procesos metabólicos identificados para las proteínas desconocidas correlacionadas positivamente de *P. falciparum* que podrían estar asociados con la resistencia a la artemisinina, los números en la figura representan el número de proteínas en cada categoría.

Por su parte PF3D7_1204500 pertenece a la familia de la subunidad SNAP43 del complejo SNAPc (Complejo activador de proteínas de ARN pequeños, en inglés *Small Nuclear RNA Activating Protein Complex*), un factor de transcripción responsable del reclutamiento de la ARN polimerasa II y III para sintetizar los ARNsn (Wong *et al.*, 1998). PF3D7_1466800 también pertenece a la familia y además tiene un dominio del tipo Noc1p que es necesaria para el ensamblaje de los ribosomas (Milkereit *et al.*, 2001).

La proteína PF3D7_0725300 presentó dominio WDR74 que en mamíferos es necesaria para el reclutamiento de la proteína NVL2 para las partículas ribosomales pre-60S (Hiraishi *et al.*, 2015). También, al igual que la proteína PF3D7_1004100, tiene una región homóloga para la superfamilia de las quinoproteínas similares a alcohol deshidrogenasas, así que podría tratarse de una alcohol deshidrogenasa.

En cuanto a la proteína PF3D7_1369500, podría estar implicada en la maduración de ARNm, debido a que pertenece a la familia de la subunidad mayor (CBP80 en eucariotas pluricelulares) del complejo CBC (Complejo de unión de la Cap-5') que se asocia con la Cap del pre ARNm y media la asociación con otros componentes de la maquinaria para el procesamiento y exportación del ARNm maduro (Mazza *et al.*, 2001), también tiene una región homóloga a la superfamilia con dominios similares a MIF4G y plegamientos del tipo armadillo(arm), ambos también implicados en el procesamiento de ARN.

Por su parte PF3D7_1026200 tiene un dominio THUMP que se ha determinado puede estar implicado en el reconocimiento de motivos de ARN (Tanaka *et al.*, 2009).

Estas 6 proteínas podrían estar implicadas en un aumento en la transcripción de proteínas en cepas resistentes y tiene sentido ya que el parásito debe reparar el daño producido por la artemisinina, así como producir algunas proteínas necesarias para mantener funcionando rutas metabólicas específicas, como lo es el aumento en varias enzimas de la glucólisis en los datos de transcriptómica en cepas resistentes reportado por Mok *et al.* (2015), estos autores también encuentran muchas otras proteínas implicadas en la traducción y transcripción correlacionadas positivamente con la resistencia a la artemisinina.

Otro proceso donde pueden asociarse varias de las proteínas estudiadas es en el tráfico vesicular. De esta forma la proteína PF3D7_1340500 contiene un dominio ARK y un dominio DIX. El primero ha sido implicado en la segregación de los centrómeros división celular (Leverson *et al.*, 2002), mientras que el segundo se ha visto implicado en la modificación del citoesqueleto de actina y tráfico vesicular,

adicional a esto, se ha observado que algunas mutaciones en este dominio estarían relacionadas con algunos tipos de cáncer (Capelluto *et al.*, 2002).

En el caso de PF3D7_0524300, tiene una región de interacción con adaptinas, las cuales son subunidades del complejo de Adaptinas (AP) involucradas en la formación de vesículas y selección de cargas para la incorporación a esas vesículas (Boehm y Bonifacino, 2001). La similitud se encontró específicamente con una proteína denominada p34 que puede interactuar con las proteínas α -adaptina y γ -adaptina, y se cree podría tener un rol de chaperona en el proceso de formación de la vesícula (Page *et al.*, 1999).

Por su parte PF3D7_1142200 tiene una región homóloga a la superfamilia de la proteína Ist1 las cuales se ha propuesto que tienen la función de regular la proteína Vps4 que catalizan el des ensamblaje del complejo ESCRT-III (Xiao *et al.*, 2009). Estos complejos ESCRT permiten el remodelamiento de la membrana y se encuentran implicadas en la formación e los cuerpos multivesiculares que permiten el envío de vesículas al exterior celular (Xiao *et al.*, 2009).

También PF3D7_1469100 pertenece a la familia de la subunidad 1 del complejo receptor SNAP del aparato de Golgi, complejo necesario para el tráfico vesicular en este organelo (Xu *et al.*, 2000).

Por último, PF3D7_1107200 pertenece a la familia de las proteínas de fusión vacuolar CCZ1 estudiada en *Saccharomyces cerevisiae* y es una proteína de membrana que reside principalmente en los endosomas tardíos, además se encuentra relacionado con otras proteínas involucradas en la fusión de endosomas con vacuolas y en la fusión homotípica de vacuolas (Hoffman-Sommer *et al.*, 2005). En vista a lo descrito se pudiera sugerir que el parásito sobreexpresa estas proteínas para mediar el tráfico vesicular en cepas resistentes, esto concuerda con que las cepas resistentes deben importar algunos metabolitos del huésped como es el caso de varios aminoácidos (Bunditvorapoom *et al.*, 2018)

Hay al menos tres proteínas encontradas en cepas resistentes que podrían estar relacionadas con la interacción con lípidos. Así, PF3D7_1447700 puede ser una aciltransferasa de ácido lisofosfatídico (LPAATs)/aciltransferasa de acilglicerolfosfato (AGPATs), las cuales son un grupo homólogo de enzimas que catalizan la formación de ácido fosfatídico a partir de ácido lisofosfatídico y un ácido graso con un grupo acil-CoA *de novo* (Bradley y Duncan, 2018). Agregado a ello, los resultados hallados en Hmmer indicaron que PF3D7_1253100 y PF3D7_0601700 podrían ser proteínas de unión con acil-CoA, isoforma s1, (ACBP1).

Hay otras proteínas que podrían tener funciones variadas en vista que poseen dominios que se han asociado con procesos diversos. La primera es PF3D7_1462900 que tiene un dominio ATPasa AAA, estos son dominios que se han relacionado con diversas funciones como la asociación de proteínas en complejos proteicos o la agrupación de ADN con proteínas, además se han encontrado varias de ellas cumplen función de chaperonas (Neuwald *et al.*, 1999).

Por otro lado PF3D7_1205900 contiene un dominio alfa/beta hidrolasa, las cuales se componen de una estructura de láminas Beta conectadas con Alpha hélices con sustratos variables (Ollis *et al.*, 1992), la proteína también contiene un dominio DUF726 presente en más de 5000 proteínas de eucariotas con función desconocida. Para PF3D7_1004100 Interpro indica que pertenece a la superfamilia similares a las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas y también que tiene un dominio similar a repeticiones WD40/YVTN. Esta repeticiones WD40 y YVTN consisten en unos 40 aminoácidos (AA) que pueden ser de secuencia variable pero estructuralmente son similares a una hélice (*propeller*) compuesta de 7 aspas (8 en algunos casos) cada una conformada por 4 láminas- β antiparalelas (InterPro, 2020d). Por otro lado las quinoproteínas alcohol deshidrogenasas se encuentran en bacterias; algunas de éstas metabolizan metanol/etanol o tienen grupos hemo, otras están implicadas en el metabolismo otras sustancias, inclusive, hay una glucosa deshidrogenasa quinoproteína (Anthony, 2001). La proteína PF3D7_0307800 tiene un dominio PDZ, estos son dominios globulares de entre 80 a 100 aminoácidos que se han encontrado en diversos grupos de animales (Ponting *et al.*, 1997), levaduras, plantas y bacterias (Ponting, 1997). Los dominios PDZ median la interacción proteína-proteína y se ha evidenciado que están implicados en esta clase de interacción para formar complejos proteicos (Ponting *et al.*, 1997). Por último, PF3D7_0107900 tiene un dominio OB (dominio de unión con oligonucleótidos y oligosacáridos) que pueden interactuar con oligonucleótidos, ya sea ADN o ARN doble cadena o no, y también con oligosacáridos (Agrawal y Kishan, 2003). En el análisis se encontró una similitud del 60% en la secuencia con la subunidad 20S del proteasoma beta 3 de *Plasmodium vinckei petteri* y además una similitud con la proteína ribosómica 30S S1 de *Clostridium intestinale*, es probable que estas similitudes se deban únicamente al dominio OB.

Algunas de las proteínas encontradas cumplen funciones específicas en organismos muy distintos a *P. falciparum* y es difícil teorizar qué función podrían desempeñar en el parásito. En este orden de ideas, PF3D7_1417600 tiene un tamaño de más de 4000 AA y pertenece a la familia de las proteínas similares a los receptores Toll (*Toll-like receptor*, TLR) que se encuentran en varias células del sistema inmune como macrófagos o células dendríticas, y reaccionan hacia antígenos en microorganismos bien conservados como las proteínas de la pared celular de ciertas bacterias (Kaisho y Akira, 2006). También

tiene un dominio de más o menos 70 AA que interactúa con ADN denominado HSA (Dominio asociado con helicasa/SANT) (Doerks *et al.*, 2002).

Otra de éstas es la proteína PF3D7_0213700 que pertenece a la familia de proteínas con dominio DUF842, los cuales no tienen función conocida (del inglés *Domain unknown function*), sin embargo, Interpro menciona que estos motivos pueden presentar dedos de cinc (*Zinc finger*), lo que es interesante ya que Hmmer encuentra similitud con la proteína *YOU2-like small euk.* con dedos de cinc C2C2 de *Babesia*, otro Apicomplejo. Por último, Interpro la relaciona con la proteína FAM136A que en vertebrados puede estar implicada en el desarrollo y funcionamiento del oído interno (Requena *et al.*, 2015).

La proteína PF3D7_1208700 pertenece a la familia TOAG-1 (gen asociado con la tolerancia) mitocondrial y promueve la apoptosis por la sobreexpresión en células T de roedores (Keeren *et al.*, 2009) y también tiene un dominio DUF4460 que podría tener un papel en la regulación de la activación de células T o apoptosis.

La proteína PF3D7_1239300 tiene una región conservada dedo de cinc PHD, este motivo se ha encontrado que media interacciones proteína-proteína para la formación de complejos proteicos, también podría estar implicado en la ubiquitinación de proteínas (Matthews y Sunde, 2002). Tiene aproximadamente 50 AA y podría estar involucrado en la regulación de la transcripción (Pascual *et al.*, 2000).

Por otro lado, PF3D7_0404300 tiene un dominio de unión con la proteína Ran que podría estar implicada en la terminación del transporte desde el núcleo (Vetter *et al.*, 1999).

La proteína PF3D7_1320300 no muestra resultados concluyentes en Interpro, sin embargo, Hmmer muestra mucha similitud con una proteína con un dominio C2H2 de *Plasmodium ovale* y con una proteína de la familia de endonucleasas/exonucleasas/fosfatasa de *Besnoitia besnoiti*. Los dominios C2H2, poseen dedos de cinc implicados en la regulación de la transcripción e interactúan generalmente con ADN o ARN (Iuchi, 2001).

Por su lado PF3D7_1135000 pertenece a la familia de la proteína Lec35 también llamada defecto de utilización 1 de manosa-P-dolicol (MPD) y es indispensable para dos pasos de la glucosilación de proteínas: C-mannosilación dependiente de MPD y la glicosilación de LLO (oligosacárido ligado a lípidos) dependientes de glucosa-P-dolicol (Anand *et al.*, 2001). La sobreexpresión de esta proteína podría indicar un aumento en la glicosilación de proteínas.

La proteína PF3D7_1022200 es un transportador de la superfamilia MFS (superfamilia de mayores facilitadores); transportadores de un solo péptido capaces de realizar transporte secundario solo de pequeños solutos en respuesta a un gradiente quimiosmótico (Pao *et al.*, 1998). Específicamente esta proteína pertenece a la familia de transportadores de Folato-Biopterina (FBT)(Eudes *et al.*, 2010). El folato (Vitamina B9) es un cofactor importante para muchas funciones metabólicas y las células requieren transportadores para tener acceso a él dentro de los diferentes compartimientos subcelulares, el transportador también podría transportar Biopterina (otro cofactor) o S-Adenosyl methionine siendo otro cosustrato.

PF3D7_1467700 pertenece a la familia de la subunidad VIb de la citocromo C oxidasa o también llamado complejo IV, el último paso de la cadena de electrones para la formación de H₂O luego de transferir los electrones al Oxígeno. Hay otros genes en el listado que son posibles subunidades del complejo IV, sin embargo, todos están subexpresados.

Como se ve en la **Figura 8**, 13 de estas proteínas no se pudieron asociar con una función específica, la razón principal es que las características encontradas por los diferentes servidores pueden asociarse con procesos metabólicos muy variados, estas han sido descritas por separado en los párrafos anteriores.

Tabla 2 Nuevos nombres propuestos para algunas proteínas con función desconocida correlacionadas positivamente con cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina

ID	Nombre	Nuevo Nombre
PF3D7_1462900	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	ATPasa AAA, putativa
PF3D7_1442800	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Factor de enlongación de la traducción EFTs/EF1B, putativa
PF3D7_1205900	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	α/β hidrolasa, putativa
PF3D7_1340500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio para interacción con ARK y con dominio DIX, putativa
PF3D7_0811400	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio DUF2009, putativa
PF3D7_1204500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	proteína SNAP43, putativa
PF3D7_1466800	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína Noc1p, putativa
PF3D7_1467700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Subunidad Vib de la citocromo C oxidasa, putativa
PF3D7_1422700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio DUF179, putativa
PF3D7_1004100	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína similar a quiniproteína alcohol deshidrogenasa o con repeticiones similares a YVTN/Quiniproteína amino deshidrogenasa, putativa

PF3D7_1456900	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio DUF167, putativa
PF3D7_0404300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio de unión a RAN, putativa
PF3D7_0725300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína WDR74 o similar a quiniproteína alcohol deshidrogenasa, putativa
PF3D7_1239300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio dedo de cinc y PHD, putativa
PF3D7_0307800	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio PDZ, putativa
PF3D7_0107900	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio OB, putativa
PF3D7_0524300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	proteína p34 de enlace con alfa y gamma adaptina, putativa
PF3D7_1142200	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína asociada con el tráfico vesicular similar a IST1, putativa
PF3D7_1320300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio C2H2, putativa
PF3D7_1135000	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Lec35, defecto de utilización 1 de manosa-P-dolicoil, putativa
PF3D7_1022200	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Transportador de folato-biopterina, putativo
PF3D7_1447700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Aciltransferasa de ácido lisofosfatídico, putativa
PF3D7_1253100	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	ACBP1, proteína de unión con acil-CoA, putativa
PF3D7_0601700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	ACBP1, proteína de unión con acil-CoA, putativa
PF3D7_0213700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominios C2C2 dedo de cinc, DUF84 similar a YOU2-like small euk, putativa
PF3D7_1469100	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Subunidad 1 del complejo receptor 1 del aparato de Golgi, putativa
PF3D7_1417600	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Receptor similar a Toll, putativa
PF3D7_1369500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Subunidad 1 del complejo de unión de Cap del ARNm, putativa
PF3D7_1026200	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio THUMP, putativa
PF3D7_1208700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína similar a TOAG-1, putativa
PF3D7_1107200	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína similar a Ccz1p, putativa

6.1.2 Proteínas correlacionadas negativamente

En la **Tabla 3** se presentan las proteínas correlacionadas negativamente en cepas resistentes cuya función pudo ser identificada, de estas; 13 no pudieron asociarse con una función específica en vista de que las características encontradas en los servidores se pueden asociar con funciones muy variadas (**Figura 9**)

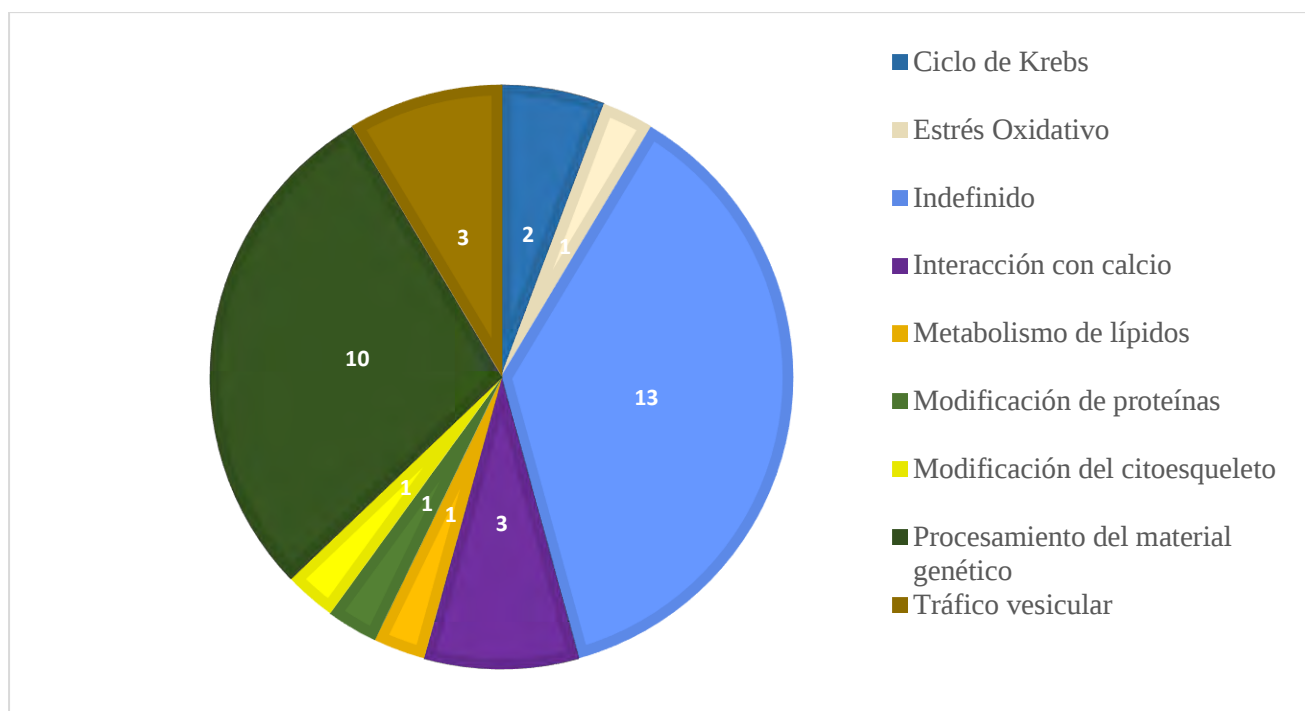


Figura 9 Procesos metabólicos identificados para las proteínas desconocidas correlacionadas negativamente de *P. falciparum* que podrían estar asociados con la resistencia a la artemisinina, los números en la figura representan el número de proteínas en cada categoría.

Varias de las proteínas correlacionadas negativamente se encuentran implicadas de alguna manera en el procesamiento del material genético (**Figura 9**). La primera de estas es PF3D7_1225300 que pertenece a la familia de las proteínas procesadoras ARNr Fcf1 y Utp23. La proteína Fcf1 en levaduras tiene una función indispensable para la producción del ARN ribosomal 18S (Rempola *et al.*, 2006), ésta podría ser necesaria para la traducción de proteínas, al igual que Utp2, quien también se ve implicada en dicho proceso.

Por su lado PF3D7_1357600 pertenece a la familia de las proteínas L44 componentes de la subunidad ribosomal 54S. Los ribosomas mitocondriales permiten la síntesis de algunas proteínas usadas en dicho organelo incluyendo varias de la cadena de transporte de electrones. En el caso de la subunidad 54S ribosomal, ésta se encuentra compuesta por 39 proteínas distintas, una de ellas es L44 (Amunts *et al.*, 2014). Por otro lado, Interpro también indica que pertenece a la superfamilia de proteínas similares a la tioredoxina, normalmente implicada en la respuesta al estrés oxidativo.

La proteína PF3D7_1302500 pertenece a la familia de las hidrolasas de nucleósidos trifosfato que contienen P-loop, y además tiene un dominio similar a la helicasa DNA2/NAM7, denominado AAA.

DNA2 es una helicasa implicada en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki en seres humanos (Gloor *et al.*, 2012).

PF3D7_0531400 tiene un dominio *G-patch*, éstos constan de aproximadamente 48 aminoácidos y se encuentran como una sola copia en proteínas que se asocian con ARN, siendo un dominio bastante común en eucariotas pero ausente en bacterias y arqueas, éste normalmente se encuentra en conjunto con otros dominios que se enlazan a ARN (InterPro, 2020b), pareciendo ser el único en la proteína.

Por otro lado, PF3D7_0403400 tiene un dominio dedo de cinc C2H2 y también un dominio similar al factor de transcripción TFIIC de interacción con bloques B. En levaduras, este factor de transcripción TFIIC es un complejo proteico de varias unidades que interactúa con dos promotores de elemento de control de clase III (denominado así ya que interactúan con la ARN polimerasa III), estos elementos se denominan los bloques A y B, en el caso de las levaduras esta proteína es indispensable (Lefebvre *et al.*, 1992).

PF3D7_0905800 posee un dominio factor de transcripción (TF) IIS N-terminal y también pertenece a la familia de dominios TFIIS/LEDGF. TFIIS es un factor de elongación compuesto de 3 dominios que estimulan al complejo ARN polimerasa II para retomar la transcripción (Booth *et al.*, 2000).

PF3D7_0819000 pertenece a la familia CPSF (factor de especificidad de clivaje y poliadenilación), subunidad 2. Esta subunidad 2 del CPSF es una región de unos 100kDa posiblemente implicada en la regulación de la poliadenilación citoplasmática de los ARNm (Dickson *et al.*, 1999). CPSF-73 es una subunidad del complejo CPSF estudiada en humanos y su sitio activo se encuentra entre los dos dominios; metalo- β -lactamasa y β -CASP que le permiten tener actividad endonucleasa (Mandel *et al.*, 2006). PF3D7_0819000 también presenta estos dos dominios que son importantes para la actividad catalítica.

La proteína PF3D7_0305300 pertenece a la familia de las Histona acetiltransferasa GCN5 y posee una región homóloga a la superfamilia de los transportadores MFS. La proteína GNC5 ha sido estudiada en levaduras y trabaja en conjunto con dos complejos de histonas acetil transferasas para poder acetilar histonas en los nucleosomas (Grant *et al.*, 1997). Por otro lado la superfamilia MFS ya ha sido descrita en el presente trabajo para la proteína sobreexpresada PF3D7_1022200 (Pao *et al.*, 1998).

La proteína PF3D7_1204200 pertenece superfamilia *P-loop* NTasa, involucradas en varios procesos fisiológicos, como la transcripción, traducción, replicación y reparación del ADN, tráfico

intracelular, transporte en membrana y la activación de varios metabolitos, para ello emplean la hidrólisis de ATP o GTP (Gangwar *et al.*, 2009).

Por su lado PF3D7_0819600 pertenece a la familia de las Ubiquitinas. Estas son proteínas globulares de menos de 100 AA que están bien conservadas en los eucariotas y permiten la ubiquitinación a través del enlace peptídico del residuo de glicina C-terminal de la ubiquitina y grupos de residuos de glicina de la proteína blanco (Jentsch *et al.*, 1991).

Por otro lado, algunas de las proteínas podrían estar implicadas en el tráfico vesicular. Comenzando con PF3D7_14398600 que pertenece a la familia de la proteína 4 del tráfico Golgi-ER (Get4) y también tiene un dominio DUF410. En levaduras Get4 es parte del complejo GET que inserta proteínas ancladas con cola (*tail-anchored*) en la membrana del retículo endoplasmático. En humanos Get4 es parte del complejo BAG6/BAT3, que mantiene proteínas no plegadas y con parches hidrofóbicos en un estado soluble, además facilitan el adecuado traslado al retículo endoplasmático (RE) o también, promueven su envío al proteasoma donde son degradadas (InterPro, 2020c). El complejo BAG6/BAT3 está involucrado en el envío de proteínas modificadas postraduccionalmente (con cola GPI agregada) y proteínas transmembranales del tipo II hacia la membrana del RE, función al parecer similar a la vista en levaduras (InterPro, 2020c). Ésta funciona en la distribución de proteínas del aparato del Golgi al RE y al parecer es el único homólogo al gen Get4 de humanos presente en *P. falciparum*, hecho corroborado al realizar un blastp con la secuencia de Get4 humana (Uniprot ID: Q7L5D6) contra todo genoma de *P. falciparum* dentro de PlasmoDB. Es interesante que esta proteína esta subexpresada pues el plegamiento de proteínas y tráfico vesicular son funciones normalmente sobreexpresadas en cepas resistentes. Otro hecho interesante sobre esta proteína es la presencia de un dominio DUF410, ahora bien, la región del dominio DUF41 se superpone en gran parte con la región homóloga a la proteína Get4, planteando así que el dominio DUF41 pudiese estar implicado en las funciones asociadas a la proteína Get4.

La proteína PF3D7_1018300 pertenece a la familia de las Rab GTPasas activadoras de proteínas (GAPs) y a la familia con dominio TBC1 23; también es homóloga a la superfamilia de las peptidasas aspárticas. TBC1 23 es catalíticamente inactiva y participa como adaptador de las golginas para el tráfico desde el endosoma al aparato de Golgi (Shin *et al.*, 2017).

PF3D7_0604500 tiene un dominio GYF, dominios que reconocen regiones ricas en prolina que pueden estar implicadas en la interacción proteína-proteína (Kofler y Freund, 2006).

La proteína PF3D7_1470800 no tiene una función clara, sin embargo, en Hmmer y Psiblast muestran una similitud en una región grande con la proteína marcador de resistencia a la cloroquina de *P. yoelii*.

Dos de las proteínas subexpresadas podrían encontrarse implicadas en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La primera es PF3D7_0728400 que es homóloga a la familia de la proteína Sdh5 que en mamíferos interactúa con la subunidad catalítica del complejo succinato deshidrogenasa (SDH), Sdh5 es requerida para la respiración dependiente de la SDH e incorporación de la flavina adenina dinucleótido como cofactor (Hao *et al.*, 2009). Que esta proteína esté subexpresada concuerda con otras proteínas subexpresadas de la cadena transportadora de electrones en cepas resistentes, el sistema SDH reduce ubiquinona al igual que la proteína DHODH implicada en la producción de pirimidina, así que si Sdh5 está subexpresada podría indicar un aumento en la cantidad de ubiquinona disponible. La segunda proteína es PF3D7_114740 que putativamente es la subunidad 2 del complejo citocromo C oxidasa, este resultado es interesante en vista de que la subunidad Vib del mismo complejo se encontraba sobreexpresada (PF3D7_1467700).

PF3D7_1223500 pertenece a la familia de los receptores similares a Toll, y tiene más de 4000 AA, de manera muy similar a la proteína PF3D7_1417600, que esta sobreexpresada. Estos receptores se encuentran en varias células del sistema inmune como macrófagos o células dendríticas, y reaccionan hacia antígenos en microorganismos bien conservados como las proteínas de la pared celular de ciertas bacterias (Kaisho y Akira, 2006).

La proteína PF3D7_1114500 pertenece a la superfamilia de las acil-CoA deshidrogenasa/oxidasa. Las acil-CoA deshidrogenasas son una familia de proteínas que contienen flavina adenina dinucleótido (FAD) y permiten agregar una desaturación en la cadena acilo asociada con un grupo CoA (Battaile *et al.*, 2002). Si se busca en PlasmoDB esta secuencia, al parecer es la única acil-CoA deshidrogenasa de *P. falciparum*.

PF3D7_1303800 es una proteína de más de 9000 aminoácidos y tiene una región homóloga a la superfamilia de las quinasas, y otra a las repeticiones del tipo Armadillo. Como quinasa; las rutas donde podría estar actuando pueden ser variadas, y también es el caso de las repeticiones del tipo armadillo (arm) que pueden ser encontrados en proteínas con funciones muy distintas (Groves y Barford, 1999).

Hay varias proteínas que tienen dominios comunes como lo son WD40 y mano-EF. PF3D7_0606600 tiene un dominio WD40, éstos son abundantes en el genoma de eucariotas en general,

y en eucariotas inferiores están involucrados en crecimiento, ciclo celular, desarrollo, y virulencia (Jain y Pandey, 2018). También actúan de forma regulatoria como andamio para interacciones proteína-proteína o ADN-proteína (Jain y Pandey, 2018). Además, Interpro (mediante Panther) indica que hay una región que concuerda con el potenciador de la proteína 4 encargada de eliminación de la Cap-5' del ARNm.

La proteína PF3D7_0513200 tiene un dominio factor C terminal de especificidad de clivaje y poliadenilación (CPSF), subunidad A. CPSF es requerida para el *splicing* (parte del proceso de maduración) de pre-ARNms con un solo intrón (Y. Li, Chen, *et al.*, 2001). También presenta homología a la superfamilia de WD40/YVTN, ya explicados. PF3D7_0619800 también es homóloga a la superfamilia de las proteínas que contienen un motivo WD40.

Para PF3D7_1209700 MotifScan encuentra un dominio mano-EF de unión a calcio, sin embargo, no se ve en los otros servidores.

PF3D7_0728500 presenta un dominio similar al igual que PF3D7_1221300. Los dominios mano-EF son una estructura compuesta por dos hélices- α y una región que las conecta, se caracterizan por una secuencia de 12 residuos entre las hélices que permite la interacción con calcio en una simetría pentagonal bipyramidal (Maki *et al.*, 2002), de forma resumida es un dominio de interacción con Ca^{+2} .

La proteína PF3D7_0108600 se encuentra en la superfamilia de las chaperonas con los dominios J (*J domain*) que tienen un tamaño aproximado de 70 AA (Keley, 1998). Estos dominios cumplen un papel regulatorio como co-chaperonas reclutando otras chaperonas del tipo Hsp70 y acelerando los pasos que implican hidrólisis de ATP en el ciclo de las chaperonas. Las proteínas con dominios J pueden estar implicadas en procesos biológicos complejos como la regulación de quinasas y exocitosis (Keley, 1998).

Por su lado PF3D7_1147300 es homóloga a la superfamilia de las metiltransferasas dependientes de S-adenosil-L-metionina (SAM MTasa). Las metiltransferasas dependientes de adenosilmetionina se encuentran implicadas en la biosíntesis, transducción de señales, reparación de proteínas, regulación de la cromatina y silenciamiento de genes (Schubert *et al.*, 2003).

La proteína PF3D7_1319200 presentó homología con la superfamilia de las proteínas TPR, abreviación de *Tetratrico peptide repeat* este motivo consiste en 3 a 16 repeticiones de 34 residuos de aminoácidos (D'Andrea y Regan, 2003). Es un motivo estructural que se encuentra en proteínas muy variadas y media la interacción proteína-proteína y el ensamblaje de complejos multiproteicos, se han identificado estos motivos en organismos muy diversos, desde bacterias hasta humanos y se han

implicado en diferentes procesos biológicos como la regulación del ciclo celular, control de la transcripción, transporte de proteínas en mitocondrias y peroxisomas, plegamiento de proteínas y otros (D'Andrea y Regan, 2003). También Interpro y MotifScan resaltan repeticiones de 7 residuos, sin embargo, no se encuentra la entrada de Pfam, Interpro menciona que esa repetición se encuentra en algunas especies de *Plasmodium* y *Theileria*, hay que aclarar que no es la misma región TPR.

PF3D7_1009300 tiene un dominio sintetasa/ligasa dependiente de AMP. En este grupo existen diferentes proteínas que requieren de la asociación con AMP para sintetizar otras moléculas, son ejemplos de esta familia la luciferasa, CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga, Acetil-CoA sintetasa y otras (InterPro, 2020a).

La proteína PF3D7_0803600 presenta un dominio GRAM y uno PH. El primero puede estar implicado en la señalización intracelular mediante la interacción con proteínas o lípidos en procesos asociados a la membrana, no obstante estas predicciones no se han probado *in vitro* (Doerks *et al.*, 2000). Por otro lado, los dominios de homología a Pleckstrina (PH) son pequeños y modulares muchas veces su función es actuar dirigiendo las proteínas hacia la cara citosólica de las membranas celular al poderse asociar con fosfoinositoles (Cozier *et al.*, 2004). Interpro también encuentra que esta proteína pertenece a la familia de las proteínas ancladas a la membrana de unión a lípidos similares a Ysp2/Lam4 que poseen generalmente un dominio GRAM.

PF3D7_1002500 es homóloga a la súper familia de las proteínas con dominio sulfhidrilo ERV/ALR. Algunas de estas proteínas catalizan la oxidación de grupos sulfhidrilos a puentes disulfuros mediante la reducción de oxígeno a peróxido de hidrogeno (Hoover *et al.*, 1999).

Por otro lado, PF3D7_1013700 es homóloga a la familia de las tioredoxinas, que como ya se mencionó, están implicadas en la respuesta al estrés oxidativo del parásito.

La proteína PF3D7_1421100 es homóloga a la súper familia de las proteínas multi hélices similares a la Hemo Oxigenasa. La hemo oxigenasa produce la disociación del hierro en el grupo hemo para producir Biliverdina en un proceso donde el hemo actúa como cofactor y sustrato (Lad *et al.*, 2004), habría que estudiar más a fondo si esta enzima cuenta con todos los residuos necesarios para funcionar como una hemo oxigenasa.

PF3D7_1412200 tiene motivos MORN (Múltiples Nexos de Ocupación y reconocimiento en la Membrana) que pueden estar implicados en la modificación del citoesqueleto y asociación con la membrana en apicomplejos (Gubbels *et al.*, 2006).

La proteína PF3D7_1226400 pertenece a la familia MON1-CCZ1 y tiene un dominio de la proteína reguladora del complejo MON1-CCZ1, la región C terminal (de ~160 AC). Esta proteína al parecer es una subunidad del complejo CCZ1-MONz RAB7 de factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) y se encuentra implicada en la regulación de la autofagia y macroautofagia (Vaite et al., 2018).

Tabla 3 Nuevos nombres propuestos para algunas proteínas con función desconocida correlacionadas positivamente con cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina

ID	Nombre	Nuevo Nombre
PF3D7_1204200	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	P-loop Ntasa, putativa
PF3D7_0819600	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína parecida a Ubiquitina, putativa
PF3D7_1438600	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína 4 de tráfico del Aparato de Golgi al ER, putativa
PF3D7_0604500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio GYF, putativa
PF3D7_0728400	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Sdh5, putativa
PF3D7_1223500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Receptor similar a Toll, putativo
PF3D7_1470800	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Marcador de resistencia a la cloroquina, putativo
PF3D7_0403400	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Subunidad de interacción con bloque B del complejo TFIIC, putativa
PF3D7_1114500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Acil-CoA deshidrogenasa
PF3D7_1303800	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con repetición ARMADILLO, quinasa, putativa
PF3D7_0606600	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio WD40, putativa
PF3D7_0108600	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio J, putativa
PF3D7_1147300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina, putativa
PF3D7_1147400	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Subunidad II del complejo Citocromo C oxidasa, putativa
PF3D7_1319200	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína TPR, putativa
PF3D7_0531400	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio G- patch, putativa
PF3D7_1209700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con mano-EF para unión a calcio, putativa
PF3D7_1221300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con mano-EF para unión a calcio, putativa
PF3D7_1009300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Sintetasa/ligasa dependiente de AMP, putativa
PF3D7_1225300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína Fcf1/Utp23, putativa
PF3D7_0513200	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	C-terminal del factor específico de clivado y poliadenilación (CPSF), subunidad A, putativa
PF3D7_0803600	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio GRAM y PH, putativa

PF3D7_1002500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio sulfhidrilo ERV/ALR, putativa
PF3D7_1013700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Tiorredoxina, putativa
PF3D7_0728500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con mano-EF para unión a calcio, putativa
PF3D7_0305300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Histona acetiltransferasa GCN5, transportador MSF, putativo
PF3D7_1421100	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína similar a Hemo-oxigenasa, multi hélice, putativa
PF3D7_1412200	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con repeticiones MORN, putativa
PF3D7_1357600	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína L44 de la partícula ribosomal 54S mitocondrial, putativa
PF3D7_1302500	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Helicasa similar a DNA2/NAM7 con dominio AAA, putativa
PF3D7_1226400	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Regulador del complejo MON1-CCZ1, putativo
PF3D7_1237700	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con dominio DUF4149, putativa
PF3D7_0819000	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Subunidad 2 del factor de especificidad de clivado y poliadenilación, putativa
PF3D7_1018300	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína 23 con dominio TBC1, putativo
PF3D7_0619800	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Proteína con repeticiones WD40, putativa
PF3D7_0905800	Proteína conservada de <i>Plasmodium</i> con función desconocida	Factor de transcripción TFIIS, N-termina, putativo

6.2 Construcción de un modelo metabólico para las cepas resistentes de *P. falciparum* a la artemisinina

En base a varias de las evidencias obtenidas en diferentes trabajos para cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina; se pudo construir el modelo metabólico presentado en la **Figura 10**. En el presente apartado se exponen las características más importantes de este modelo.

En las cepas resistentes podría haber un aumento del consumo de glucosa ya que las enzimas de la glucólisis; hexoquinasa, fosfoglucoasa isomerasa, fosfofructoquinasa tienen un aumento en su expresión, esto, sumado a una reducción en la transcetolasa de la VPF sugiere un aumento del flujo glucolítico y una reducción en el flujo de la VPF. Por otro lado, una parte del flujo glucolítico se redirige hacia el ciclo de Krebs; que está truncado en estas cepas, la otra parte se transformaría en lactato. Estos planteamientos surgen de cambios en la expresión de enzimas de la glucólisis y el ciclo de Krebs en los datos de análisis de transcriptómica de parásitos resistentes a la artemisinina (Mok *et al.*, 2015).

En este modelo la glucólisis producirá fosfoenol piruvato (PEP), una parte de éste será transformado en oxalacetato mediante la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) o por la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), y luego en malato por la malato deshidrogenasa (MDH), este malato se traslada a la mitocondria a través del transportador de malato/ α -cetoglutarato PfDTC (PF3D7_0823900), que también puede transportar oxalacetato/ α -cetoglutarato. Otra parte del PEP sera transformada en piruvato el cual entra a la mitocondria para ser transformado en acetil-CoA, reacción llevada a cabo por la BCKDH. Un aumento en la expresión de la citrato sintasa sugiere un incremento en el citrato, y una reducción en la expresión de las enzimas α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA ligasa y succinato deshidrogenasa. Estos cambios en la expresión de enzimas del ciclo de Krebs generan una acumulación de citrato y α -cetoglutarato en la mitocondria, y la diferencia de concentración de estos metabolitos respecto al citosol, permite que sean trasladados fuera de la mitocondria a través de un transportador de citrato/ α -cetoglutarato (PF3D7_1223800), que se encuentra sobreexpresado en cepas resistentes.

El citrato transportado hacia el citosol puede transformarse en α -cetoglutarato mediante la reacción catalizada por una isocitrato deshidrogenasa citosólica dependiente de NADPH, este metabolito es necesario para tolerar el estrés oxidativo ya que se usa en el reciclaje de glutatión oxidado (GSSG) y tioredoxina.

Por su parte el α -cetoglutarato del citosol, obtenido del transporte desde la mitocondria o de la transformación de citrato, será convertido en glutamato mediante una glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (GDH3, Pf3D7_0802000) o de una aspartatoaminotransferasa, esta última enzima es descrita como esencial en el parásito (Wrenger *et al.*, 2012). El glutamato producido, junto con otros dos aminoácidos, cisteína y glicina, se usará para la producción de glutatión (GSH). Este GSH servirá para que el parásito tolere el estrés oxidativo que produce la artemisinina, de forma que el GSSG generado será exportado hacia el eritrocito donde puede ser reducido por los sistemas de tolerancia al estrés oxidativo del globulo rojo, sin embargo, una menor proporción del GSSG puede ser reducido por el parásito por la glutatión reductasa (GR), subexpresada en cepas resistentes.

El modelo planteado también implica cambios en otras rutas y procesos metabólicos del parásito; la cadena transportadora de electrones mitocondrial, regulación del ciclo de vida, obtención de hemoglobina (Hb) desde el eritrocito y metabolismo de lípidos (**Figura 10**).

En la membrana de la matriz mitocondrial hay una reducción en la expresión de todos los complejos proteicos implicados en la cadena de transporte de electrones (I, II, III y IV) y también de la ATP sintasa. Por ello hay una reducción general en el transporte de electrones, bombeo de protones, producción de

ATP y potencial de membrana mitocondrial. Lo anterior indica que el mantenimiento energético del parásito se sustentaría en la fosforilación a nivel de sustrato, lo cual implicaría un incremento en la tasa de consumo de glucosa.

En cuanto al metabolismo de segundos mensajeros intracelulares, probablemente haya una reducción en la concentración de AMPc citosólico y alteraciones en la concentración de Ca^{+2} , estas dos moléculas juegan un papel importante en la progresión del ciclo de vida del parásito y sus cambios pueden producir letargo en el ciclo. Además, hay alteraciones en la expresión de numerosas quinasas que podrían asociarse con la progresión hacia otros estadios, como los son la quinasa 5 dependiente de calcio (PfCDPK5) necesaria para el surgimiento de los merozoítos desde el esquizonte y la quinasa dependiente de ciclina 1 (PfCLK1) que podría estar asociada con la regulación génica.

Otro proceso alterado en estas cepas resistentes es la formación y traslado de vesículas que transportan Hb desde la membrana del parásito hasta la vacuola digestiva. Estos procesos presentarían una reducción, ya sea debida a la formación de vesículas de menor tamaño o un menor número, esto como resultado de la disminución en la expresión de varias proteínas necesarias para la formación de las vesículas: Coronina y Rab5a, también por las mutaciones en PfKelch 13. La reducción en la digestión de Hb implicaría que menos artemisinina se activaría y como se recordará, su interacción con grupos hemo (proveniente de la degradación de hemoglobina) es necesaria para que la droga actúe sobre el parásito, por lo tanto, estos cambios pueden estar asociados con una menor concentración de artemisinina activa en *P. falciparum*.

Por último, probablemente haya una reducción en la producción de lípidos en el parásito debida a cambios en la expresión de diferentes enzimas, donde la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), los lípidos más abundantes en las membranas de *P. falciparum*, se producirían a una menor velocidad, basados en la reducción en la expresión de las enzimas estearoil-CoA desaturasa, colina/etanolamina fosfotransferasa y acil-CoA sintasas. Por otro lado, otras enzimas sugieren un aumento en la producción de cardiolipina; la glicerol-3-fosfato 1-O-aciltransferasa y la fosfatidilglicerofosfato sintasa, siendo la cardiolipina un lípido de la membrana mitocondrial que podría asociarse con un mayor transporte de metabolitos a través de la membrana, ya que permite estabilizar diferentes proteínas transmembranales.

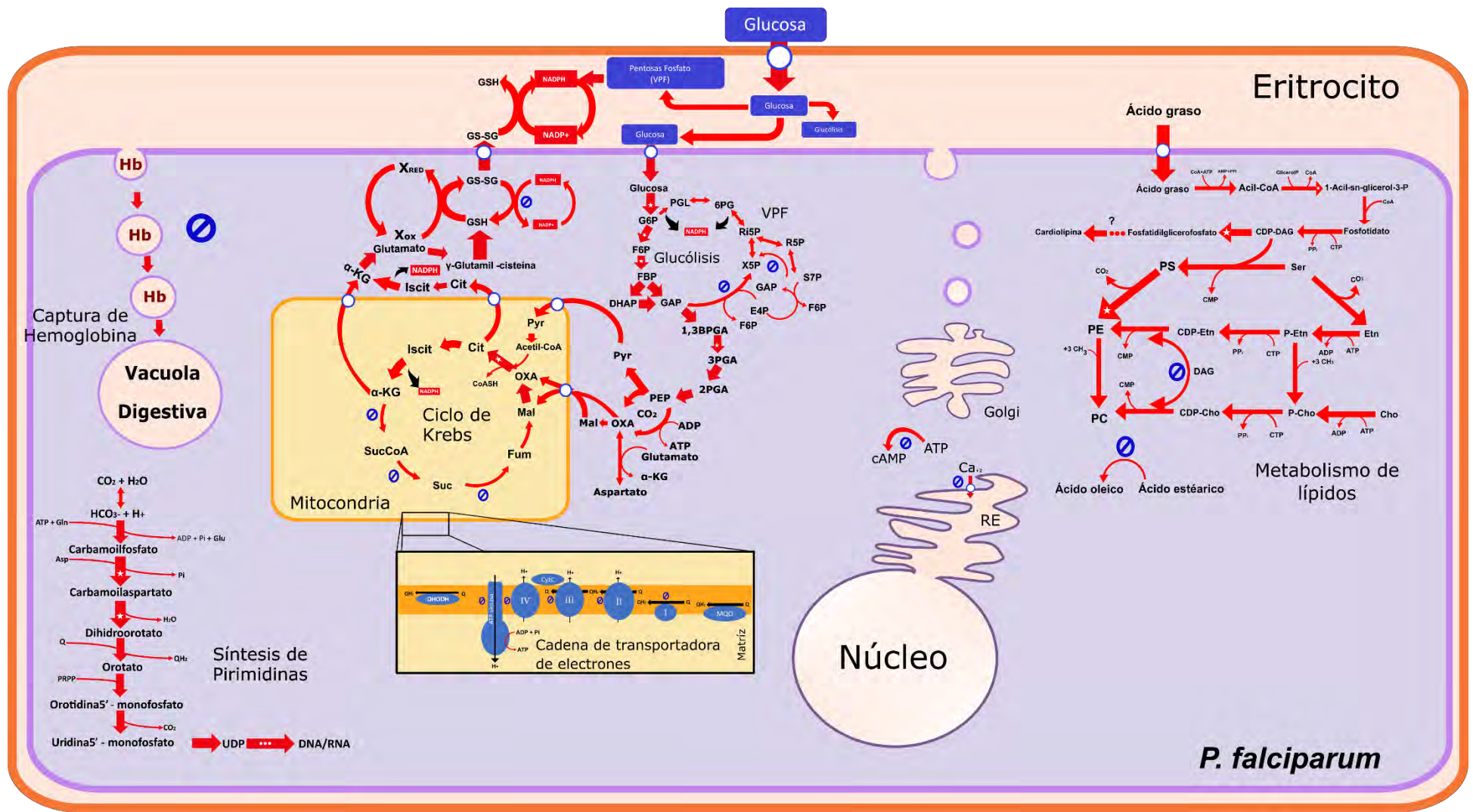


Figura 10 Modelo metabólico propuesto para cepas resistentes de *P. falciparum* a la artemisinina. Se muestra el flujo central del carbono principalmente en tres rutas: glicólisis, ciclo de Krebs y estrés oxidativo. Se muestran también otros procesos metabólicos complementarios que se diferencian en cepas resistentes: aumento de síntesis de pirimidinas, disminución de la cadena transportadora de electrones, importación de Hemoglobina, producción de cAMP y transporte de Ca^{+2} hacia el RE.

6.3 Modelado de un posible transportador de citrato/ α -cetoglutarato mitocondrial de *P. falciparum*

En la **Figura 11A** se muestra el modelo obtenido por Phyre2 para el transportador de citrato/ α -cetoglutarato (PF3D7_1223800) que posee 308 residuos. Phyre2 muestra que se modelaron 86% de los residuos de la proteína con >90% de confianza usando principalmente 3 transportadores mitocondriales como plantillas; el transportador de ATP/ADP isoforma 3 (Protein Data Bank ID: 4C9Q) de *S. cerevisiae*, el transportador de ATP/ADP (1OKC) de *Bos Taurus* y de ATP/ADP (2LCK) de *Mus musculus*. La proteína cuenta con 6 segmentos transmembranales (**Figura 11B**).

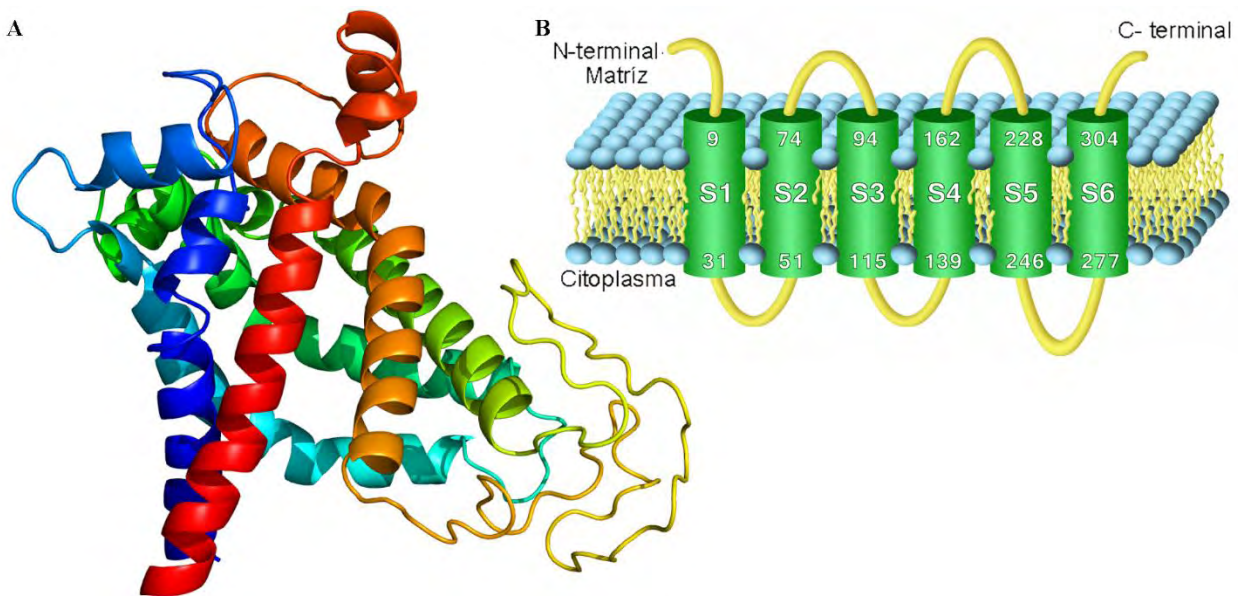


Figura 11 Modelo del transportador de PfCOCP obtenido de Phyre2, **A)** modelo en 3D rojo (N-terminal), azul (C-terminal) **B)** 6 segmentos transmembranales obtenidos en la proteína por Phyre2.

El modelo inicial arrojado por Phyre2 presentaba varios ángulos de enlace poco favorables según el diagrama de Ramachandran obtenido en SwissModel (solo el 78,1% de los ángulos se encontraban en zonas favorables) (**Figura 12**), luego de dos pasos de refinamiento usando el portal GalaxyWEB se observó una mejora notable en el modelo, con el primer refinamiento se aumentó a 92,48% de ángulos en la región favorable y el segundo refinamiento se logró elevar a 94,12% los ángulos en la región favorable (**Figura 12**), no se realizaron más refinamientos debido a que al realizar un tercero, no se obtuvo mejora en el modelo. Al realizar refinamientos en GalaxyWEB el portal muestra los cinco mejores modelos, en el primer paso de refinamiento se tomó el quinto modelo arrojado por GalaxyWeb y en el segundo paso se tomó el cuarto modelo arrojado por el servidor.

En la **Figura 13 A** se presenta el modelado de PfCOCP en estado C luego de dos pasos de refinamiento con GalaxyWeb y se superpone el modelo original obtenido con Phyre2 (sin refinar), para

ello se usó la opción *MatchMaker* de UCSF Chimera, se observan cambios en la estructura compuesta de 6 segmentos transmembranales.

Los transportadores mitocondriales tienen dos conformaciones o estados alternantes, C si el sustrato entra desde el citosol y M si el sustrato entra desde la matriz (Ruprecht y Kunji, 2019a). El modelo obtenido de Phyre2 es el transportador en su conformación C, debido a que todos los moldes que encontró el servidor son transportadores mitocondriales en esta conformación. Por otro lado, Phyre2 no permite usar un molde dado por el usuario, de forma que se usó SwissDock para obtener la conformación M, al suministrarle como molde una proteína en esta conformación (PDB id: 6GCI, Ruprecht *et al.* (2019)). El modelo en estado M presentó inicialmente un 92,5% de ángulos favorables entre residuos según el diagrama de Ramachandran y luego del refinamiento un 95,7% (**Anexo 2**), y no mejoró con otro refinamiento. De igual manera al superponer la estructura refinada con la inicial se pueden observar cambios en la estructura (**Figura 13B**).

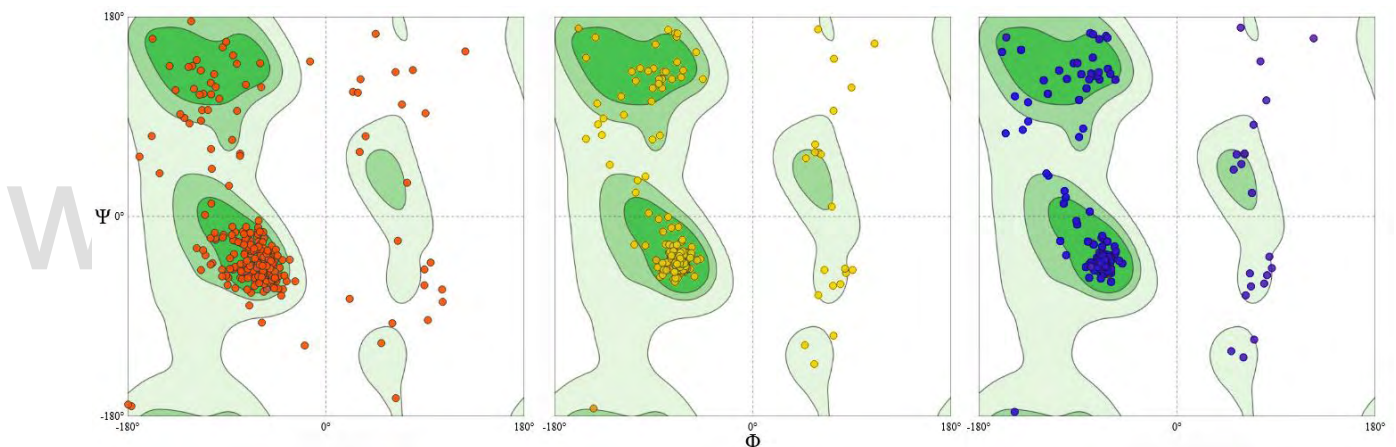


Figura 12 Diagramas de Ramachandran para el modelo de la proteína PfCOCP obtenida del servidor Phyre 2 (puntos en color naranja), primer refinamiento en el servidor GalaxyWEB (color amarillo) y segundo refinamiento (color azul). Los diagramas fueron obtenidos con el servidor SwissDock.

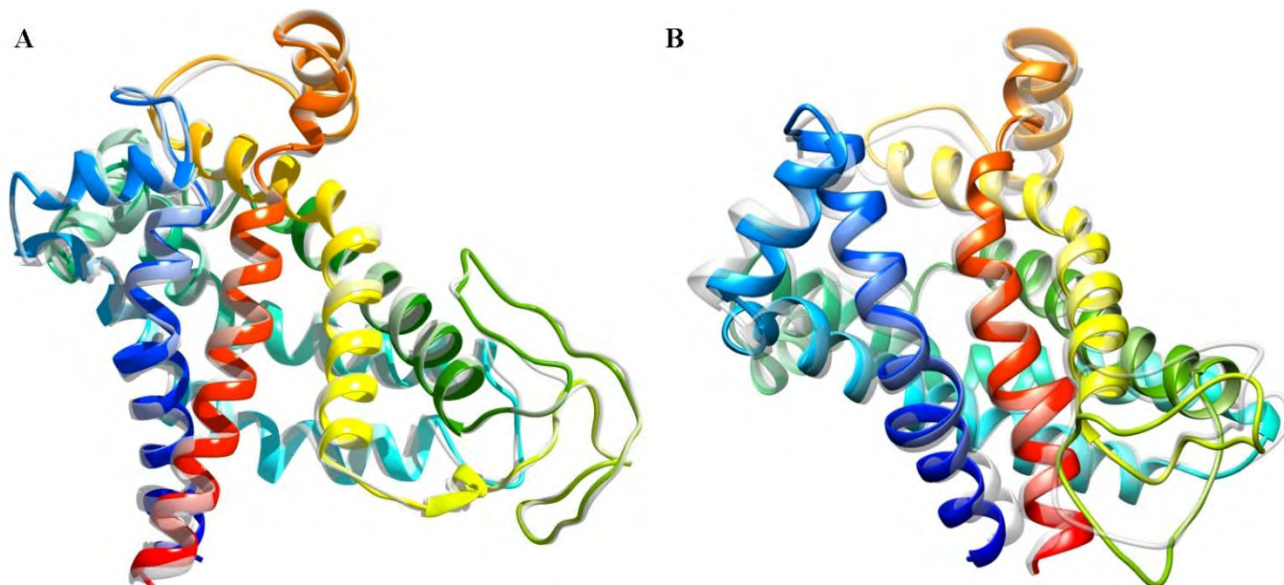


Figura 13 Modelo refinado del transportador de citrato/alfacetoglutarato (PF3D7_1223800) de *P. falciparum*, la proteína refinada se encuentra coloreada y se superpone en gris el modelo original obtenido en Phyre2 (izquierda) y de SwissModel (derecha). **A)** conformación C y **B)** conformación M. Visualización producida con UCSF Chimera 1.13.1.

Los acoplamientos moleculares (*Dockings*) se realizaron con citrato y α -cetoglutarato con la proteína en la conformación C y M. En la **Figura 14** se ve el resultado de estos acoplamientos y en las **Tablas 4** y **5** (sección de Anexos) se presentan los valores de la diferencia en la energía libre de Gibbs (ΔG) y *Fullfitness* para cada uno de los acoplamientos mostrados. El ΔG fue menor para los acoplamientos con las proteínas en estado M respecto al estado C. Nótese que en ambas conformaciones hay residuos de aminoácidos que interactúan con ambos sustratos en casi todos los acoplamientos; lisina (Lys) 67, glutamina (Gln) 152 y arginina (Arg) 151, no obstante, algunos residuos solo son accesibles en la conformación M como la arginina 262, otros residuos como el triptófano 156 interactuaron con el sustrato solo en algunos acoplamientos.

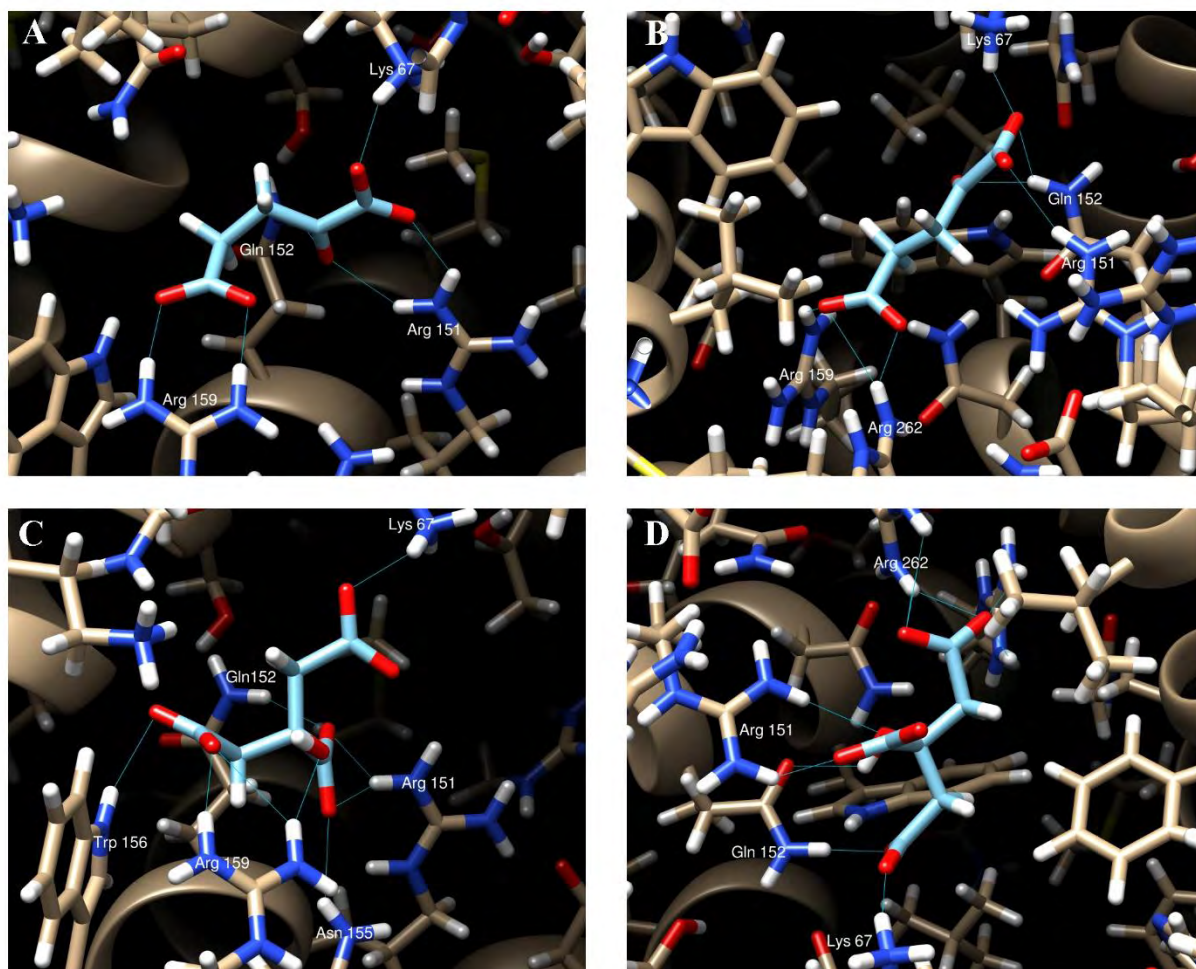


Figura 14 Acoplamiento molecular en el transportador PfCOCP realizados con SwissDock. **A)** y **C)** α -cetoglutarato y citrato con la proteína en la conformación C, respectivamente. **B)** y **D)** α -cetoglutarato y citrato con la proteína en la conformación M. Se usaron acoplamiento que pertenecían al cluster de menor energía predicho por el servidor, también se resaltan los residuos de aminoácidos que forman puentes de hidrógeno con el sustrato según la opción FindHBond de UCSF Chimera 1.13.1.

La **Figura 15** muestra a PfCOCP con los acoplamiento ya mencionados vistos desde diferentes ángulos, se observa que en la conformación C el citrato (rojo) y el α -cetoglutarato (azul) no están centrados en el sitio activo del transportador y pese a que en ambas conformaciones hay interacción con parte de los mismos residuos (Arg 151, Gln 152 y Lys 67) sólo hay interacción con dos segmentos transmembranales H2 y H4 (**Figura 15 A, C y D**), el aumento en la energía libre de Gibbs y la ubicación de los sustratos respecto a los diferentes segmentos transmembranales que conforman el transportador, podría indicar que el transporte es más efectivo en la conformación M que en la conformación C. Que el sitio I interactúe con el sustrato mediante una lisina, el sitio II con una arginina y glutamina, y el sitio III con una arginina concuerda con los sitios de unión reportados para al menos dos transportadores mitocondriales de *S. cerevisiae*; el transportador de succinato (PDB ID: FC1P) y el de citrato malato (TP1P) (Robinson y Kunji, 2006).

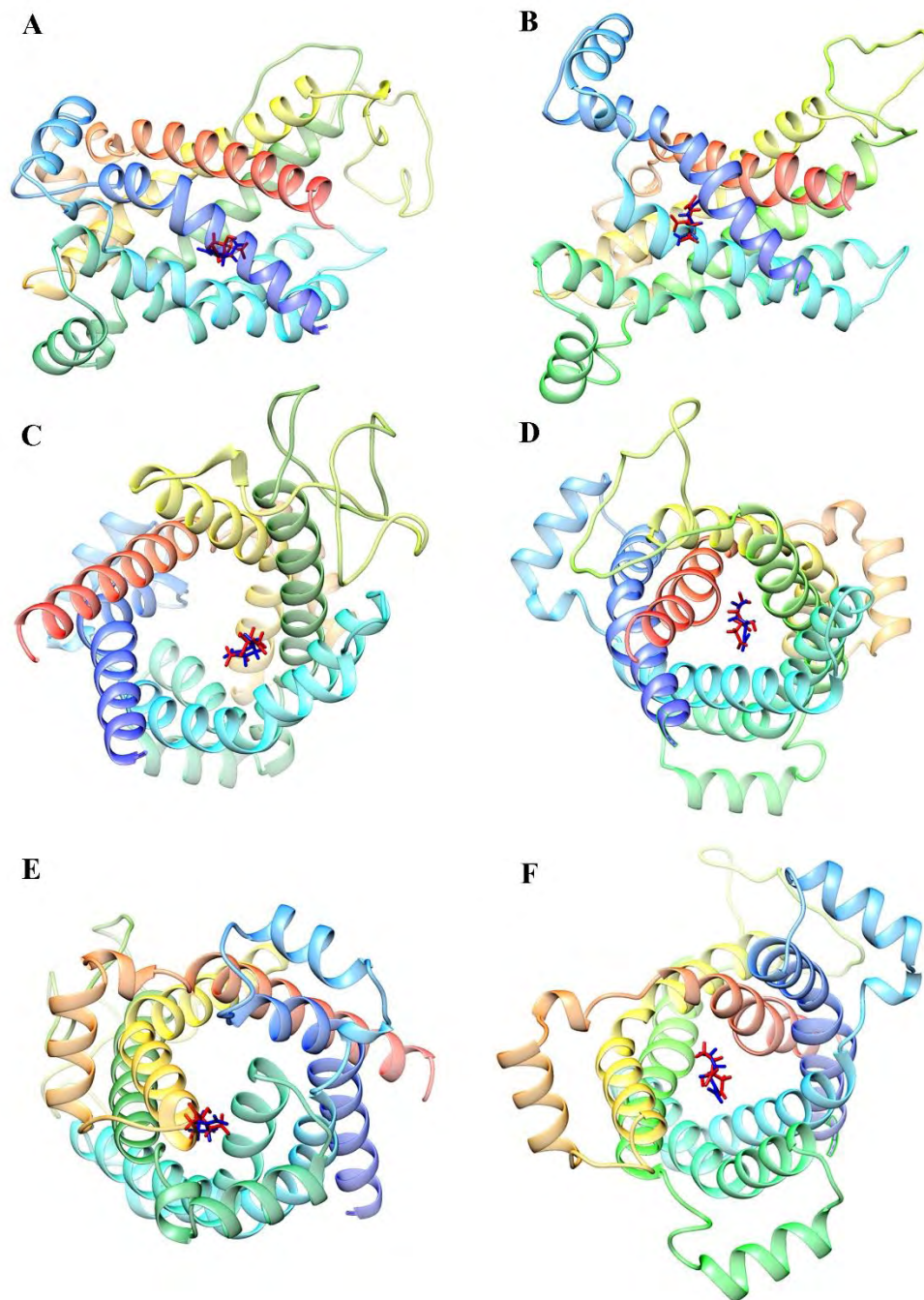


Figura 15 Acoplamiento molecular de citrato (rojo) y alfaetoglutarato (azul) con el transportador mitocondrial de citrato PfCOCP en conformación C (A, C, E) y M (B, D, F) vistas desde diferentes ángulos; vista lateral (A y B), desde el citosol (C y D), desde la Matriz mitocondrial (E y F). Representaciones realizadas con UCSF Chimera 1.13.1

En la **Figura 16** se presenta el alineamiento de la secuencia de PfCOCP con su homólogo en levaduras YHM2 realizado usando T-coffee. El resultado en general es un buen alineamiento

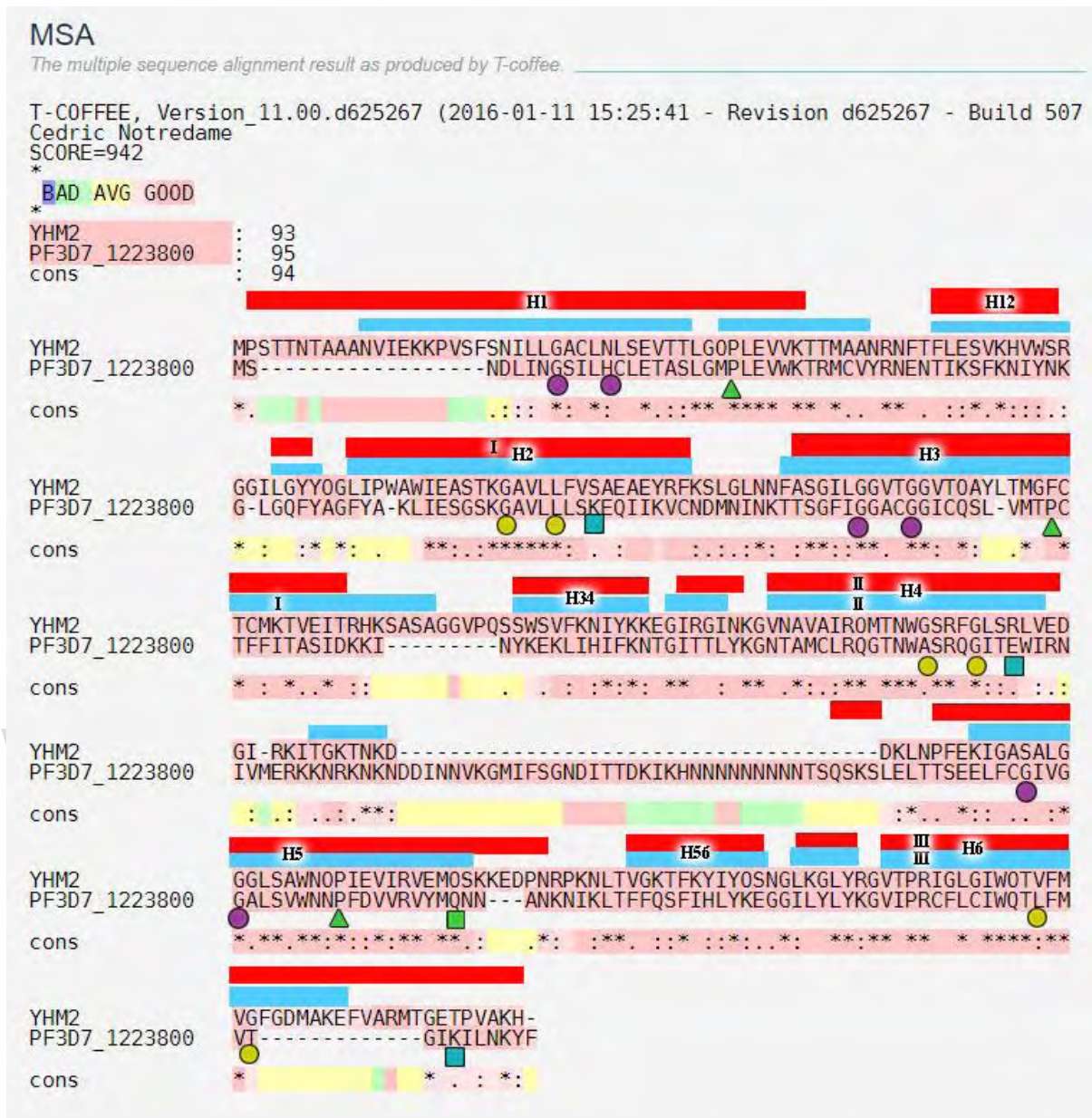


Figura 16 Alineamiento de las secuencias de PfCOCP con YHM2 realizado en T-coffee. Los asteriscos (*) representan residuos conservados, dos puntos (:)residuos con propiedades similares y punto (.) residuos con propiedades distintas. En base a qué tan conservados son los residuos, presencia de vacíos, y otros aspectos el servidor colorea en rosado las zonas que representan un buen alineamiento, en amarillo un alineamiento regular y en verde un mal alineamiento. Se resaltan en azul y en rojo las hélices- α en la proteína de *P. falciparum* y *S. cerevisiae*, respectivamente, en base al modelado obtenido para cada proteína. Los 6 segmentos transmembranales H1,2, 3, 4, 5, 6, segmentos H12, H34, H56 y sitios de unión al sustrato I, II, III se encuentran rotulados en ambas proteínas. El sitio III identificado para PfCOCP solo interactúa con el sustrato en la conformación M. Los motivos GxxxG y π xxx π se indican con círculos violetas y amarillos, respectivamente, los motivos [PS]x[DE]xx RK se resaltan con triángulos verdes, las abrazaderas Q y Y con cuadrados verdes y azules respectivamente.

entre ambas proteínas, donde la mayoría de los residuos están conservados (*) o sustituidos por un aminoácido de propiedades similares (:), la única región con poca similitud y vacíos se encuentra entre

H4 y H5, donde la proteína de *P. falciparum* no tiene ningún segmento transmembranal y tiene una zona rica en Asparagina (N) una particularidad de numerosas proteínas de este parásito que no comparte con las levaduras. Todos los segmentos transmembranales se encuentran conservados en estructura para ambas proteínas y la ubicación de distintos motivos de estos transportadores como los sitios de unión sustrato II y III en las hélices H2 y H4 también concuerdan. En esta figura también se resaltan diferentes motivos comunes para los transportadores mitocondriales.

A fin de evaluar el grado de conservación de esta proteína en el género *Plasmodium* se realizó un alineamiento de los homólogos de PfCOCP en otras especies del género que infectan a humanos; *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, otros que infectan roedores; *P. chabaudi*, *P. yoelii*, *P. berghei*, y otras especies que infectan simios; *P. reichenowi*, *P. gaboni* y *P. praefalciparum* estas últimas se encuentran cercanas filogenéticamente con *P. falciparum*. El alineamiento de las secuencias (**Anexo 3**) muestra un alto grado de conservación en los 6 dominios transmembranales del transportador y en todos los casos los tres sitios de unión con el sustrato son idénticos, solamente la región entre H4 y H5 que no tiene dominios transmembranales presenta diferencia entre varias especies, este hecho se verificó midiendo la variación de la diversidad nucleotídica (π) entre las secuencias de estas proteínas (**Anexo 4**) que resultó ser baja en las regiones correspondientes con los 6 segmentos transmembranales y elevada en la zona entre H4 y H5 que ya mencionamos. La prueba D de Tajima (**Anexo 5**) muestran valores de $D < 0$ en varias regiones de los segmentos transmembranales incluyendo los sitios de unión al sustrato en H2, H4 y H6, lo que podría indicar que estos sitios están bien conservados y posiblemente bajo selección negativa, no obstante aparecen varias zonas con valores de $D > 0$ lo que indica que son altamente polimórficos, la mayoría de estos polimorfismos probablemente se deban a diferencias entre especies y sean sustituciones sinónimas ya que hay pocos cambios de residuos en las secuencias proteicas de las especies (**Anexo 3**), algunas regiones tienen valores de D cercanos a 0 lo que sugiere que se encuentran evolucionando bajo neutralidad.

La evaluación del mejor modelo con MEGA X arrojó al modelo de Tamura-Nei con una distribución Gamma de 2,6 y algunos sitios invariables (36,28%) como el más adecuado para los datos, con esos parámetros y 1000 réplicas con el método *Bootstrap* se realizó el árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud para el gen de la proteína PfCOCP en *Plasmodium spp.* (**Anexo 6**). Las agrupaciones obtenidas en el árbol concuerdan en parte con las encontradas en el trabajo de Loy *et al.* (2017) (**Anexo 7**), esta concordancia se ve en los grupos más cercanos, como *P. vivax* y *P. cynomolgi*, pero las relaciones más distantes, como la que existe entre *P. ovale* y *P. vivax*, no concuerdan, los resultados sugieren que los genes de COCP han tenido pocos cambios que pueden estar asociados con la

diversificación de las diferentes especies de *Plasmodium* y agregando lo obtenido en el alineamiento, la diversidad nucleotídica y la prueba D, hay clara evidencia de que COCP es un gen funcional en todas las especies y las regiones importantes para de la proteína (los segmentos transmembranales), se encuentran bien conservadas en *Plasmodium spp.*

www.bdigital.ula.ve

7 DISCUSIÓN

7.1 Análisis de la función de proteínas desconocidas

Con el fin de identificar las funciones putativas se usaron diferentes servidores que en una parte del total de proteínas desconocidas permitió al menos identificar las superfamilias, familias o dominios que tenían estas proteínas, y en algunos casos asociarlas con funciones específicas, de estas algunas pudieron relacionarse con la resistencia a la artemisinina.

En el caso de las correlacionadas positivamente, se pudo identificar la posible función de 31 proteínas, de ellas al menos 6 se podrían asociar con el procesamiento del material genético; el factor de elongación EF1B necesario para el acoplamiento del ARNt con el ribosoma, la subunidad SNAP43 implicada en la síntesis de ARNsn, Noc1p necesaria para el ensamblaje del ribosoma, dominio WDR47 implicado en el reclutamiento de otras proteínas en la formación de las partículas ribosomales pre-60S, subunidad del complejo CBC que permite asociar el *cap* al ARNm inmaduro y dominio THUMP que reconoce motivos de ARN. En el listado propuesto por Mok *et al.* (2015) muestra un aumento en muchas proteínas implicadas en el procesamiento del material genético (maduración del ARNm, producción de ARNt, ADN polimerasas, entre otros, **Anexo 1**) así que estas 6 proteínas pueden ser concordantes con el patrón observado por estos investigadores, no obstante el mecanismo de la resistencia se complica más al tomar en cuenta que también hay proteínas implicadas en el procesamiento del material genético subexpresadas. Es probable que las cepas resistentes, ante la presencia de la artemisinina, requieran de la expresión de proteínas implicadas en rutas metabólicas específicas y de la reducción de otras, lo que supone, por ejemplo, que algunos factores que inducen el *splicing* del ARN y tARN ligasas se encuentren sobreexpresados y otros se encuentren subexpresados como lo muestran los datos provistos por Mok *et al.* (2015).

Por otro lado, hay 5 proteínas correlacionadas positivamente que podrían estar implicadas de alguna manera en el tráfico vesicular y modificación del citoesqueleto; dominios ARK, DIX, región de interacción con adaptinas, regulador Ist1 para el desensamblaje del complejo ESCRT-III (implicado en la formación de cuerpos multivesiculares), tráfico vesicular del aparato de Golgi (subunidad 1 del complejo SNAP receptor del aparato de Golgi) y proteína de fusión vacuolar CCZ1. Estos resultados sugieren que en cepas resistentes podría haber un cambio en el importe o exporte de vesículas. Ya se ha reportado que las vesículas que importan Hb al parásito se encuentran reducidas en cepas resistentes (Yang *et al.*, 2019) y también que requieren del importe de varios aminoácidos respecto a cepas sensibles (Bunditvorapoom *et al.*, 2018), de forma que las cepas resistentes podrían presentar alteraciones en el

tráfico vesicular, posiblemente para tomar nutrientes o metabolitos necesarios para tolerar el efecto de la droga.

Se encontró un posible transportador de folato-biopterina (PF3D7_1022200) correlacionado positivamente con la resistencia. El folato es necesario para la producción de purinas y pirimidinas. *P. falciparum* puede obtener el folato sintetizándolo *de novo* o importándolo del medio (Hyde, 2005). Si PF3D7_1022200 es un transportador de folato podría indicar que el parásito requiere una mayor disponibilidad de este cofactor para tolerar los efectos de la droga, y como es sabido el folato en forma de N⁵,N¹⁰-metilen-tetrahidrofolato es esencial para la conversión de los residuos de uracilo del dUMP en timina para formar dTMP para la biosíntesis de ADN, esencial en la reparación de las células que están sometidas a estrés oxidativo. A la fecha solo se han descrito dos transportadores para el folato en *P. falciparum*; PfFT1 (PF3D7_0828600) y PfFT2 (PF3D7_1116500), ambos transportan principalmente ácido p-amino benzoico (pABA), un precursor para la síntesis de folato y otros compuestos metabólicamente activos que surgen de él (Salcedo-Sora *et al.*, 2011). En el plasma sanguíneo la forma más abundante del folato es el 5-metiltetrahidrofolato, compuesto pobremente transportado por PfFT2 y en absoluto por PfFT1 (Salcedo-Sora *et al.*, 2011), surge la posibilidad de que el nuevo transportador de folato descrito pueda asociarse con formas del metabolito que no son transportadas por PfFT2 o PfFT1 como el 5-metiltetrahidrofolato, esta hipótesis requeriría más evidencia experimental para probarse.

Por otra parte, se encontró una proteína con un dominio de unión a proteína Ran, esto puede indicar que se moviliza desde o hacia el núcleo, además tiene un motivo de ubicación nuclear (señal de localización nuclear bipartita) identificado mediante MotifScan, haciendo posible que sea una proteína que se importa hacia el núcleo celular.

En el caso de las proteínas correlacionadas negativamente se pudo identificar la posible función de 35, de estas hay 8 posiblemente implicadas en el procesamiento del material genético; Fcf1/Utp23, L44 componente de la subunidad ribosomal 54S, helicasa DNA2/NAM7, dominio *G-patch*, factor de transcripción TFIIC, subunidad 2 del complejo CPSF e Histona acetiltransferasa GCN5. Dos proteínas, Fcf1/Utp24 y la subunidad 54S, podrían indicar una reducción en la producción de proteínas en la mitocondria, recuérdese que este organelo tiene su propio material genético y produce algunas proteínas implicadas en los procesos metabólicos que se llevan a cabo en él, varios de estos procesos se encuentran reducidos en cepas resistentes, por lo que una disminución en dos proteínas relacionadas con los ribosomas mitocondriales concuerda con lo esperado en vista a un posible reducción en algunas proteínas de este organelo. La helicasa DNA2/NAM7 pudiese relacionarse con una reducción en la replicación de

ADN que concuerda con el retraso en el ciclo celular. La histona acetiltransferasa GCN5 podría indicar cambios en patrones epigenéticos en cepas resistentes, y de hecho en los datos de transcriptómica hay otros 3 genes conocidos que podrían ser histonas; nombrados *Histone H2A variant putative* (PF3D7_0320900), *Histone H2B variant putative* (PF3D7_0714000) y una posible chaperona de histonas ASF1 (PF3D7_1224500), todos subexpresados en cepas resistentes lo que concuerda con lo planteado. Los cambios en patrones epigenéticos ya han sido estudiados en *Plasmodium* sobre todo para los genes implicados en la invasión a eritrocitos, evasión del sistema inmune y citoadherencia, estos genes se encuentran en un gran número de copias en el genoma de *P. falciparum* y solo se expresan de manera individual o en un número reducido en cada parásito (Cortes y Deitsch, 2017). Además, se ha probado que la resistencia a drogas que acceden al parásito a través del canal PSAC (canal aniónico de superficie) es regulada por el gen *clag3*, a su vez regulado de manera epigenética, cuando se aplican inhibidores de las histonas metiltransferasa se puede reducir esta clase de resistencia (Chan *et al.*, 2020). Por último, las drogas que afectan la metilación del ADN, un proceso epigenético distinto a la modificación de histonas, son eficientes contra cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina (Nardella *et al.*, 2020), todavía se requieren otros estudios para verificar específicamente el papel de qué modificaciones en las histonas pueden asociarse con la resistencia a la artemisinina.

Dos proteínas subexpresadas también podrían estar participando en el tráfico vesicular: Get4 y la GTPasa activadora de proteína (GAP). Get4 participa en el tráfico de proteínas desde el aparato de Golgi hacia el RE o proteasoma, GAP participa en el tráfico desde la endosoma al aparato de Golgi. Es difícil concluir sobre cómo estas proteínas podrían estar afectando a cepas resistentes, pero Get4 tiene un dominio DUF41 que se superpone con la región homóloga a la proteína Get4, el hecho de que estas dos regiones calcen en longitud y ubicación podría ayudar a esclarecer la función de los dominios DUF41 en base a la información ya conocida para la proteína Get4, este planteamiento requiere de estudios posteriores. El hecho de que estas proteínas se encuentren subexpresada también podría implicar que el parásito tiene cambios en el tráfico vesicular.

Dos proteínas actuantes en la cadena transportadora de electrones se encontraron subexpresadas; Sdh5 del complejo succinato deshidrogenasas y la subunidad 2 del complejo citocromo C oxidasa. Estas concuerdan con la reducción en la expresión de proteínas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en cepas resistentes. Hay que resaltar que al analizar los genes correlacionados positivamente se encontró la subunidad VIb del complejo citocromo C oxidasa, este es un resultado que se sale del modelo planteado ya que varias subunidades de los complejos implicados en la cadena de transporte de electrones se encontraron correlacionados negativamente con cepas resistentes, pero podría

ser una pista de que la subunidad VIb cumple otra función fuera del complejo citocromo C oxidasa que aún no ha sido descrita.

En este análisis hay dos proteínas con un tamaño considerable (más de 4000 AA) que pertenecen a la familia de proteínas similares a receptores Toll, estas presentan una similitud en cuanto a la secuencia de entre 30 a 40% entre ellas y una se encuentra correlacionada positivamente y otra negativamente. Los receptores *Toll-like* se encuentran en varias células del sistema inmune y reaccionan hacia antígenos en microorganismos bien conservados (Kaisho y Akira, 2006). Es difícil predecir que función podrían cumplir esta clase de proteínas en *Plasmodium* debido a que han sido estudiadas principalmente en el sistema inmune de diferentes organismos pluricelulares, sin embargo, sería bueno profundizar más en su estudio, en vista a que más de una tiene la expresión modificada en cepas resistentes.

Si bien para una parte de las proteínas no pudo ser esclarecida su función, este enfoque permitió tener un punto de inicio para profundizar más sobre muchas de ellas a las cuales se les pudo asociar con superfamilias, familias así como la presencia de dominios que antes no estaban reportados para estas proteínas.

www.bdigital.ula.ve

7.2 Construcción de un modelo metabólico para las cepas resistentes de *P. falciparum* a la artemisinina

7.2.1 Glicólisis, ciclo de Krebs y estrés oxidativo

En la **Figura 17** se muestra un diagrama más detallado de la glicólisis, ciclo de Krebs y estrés oxidativo ya expuestos en la **Figura 10**.

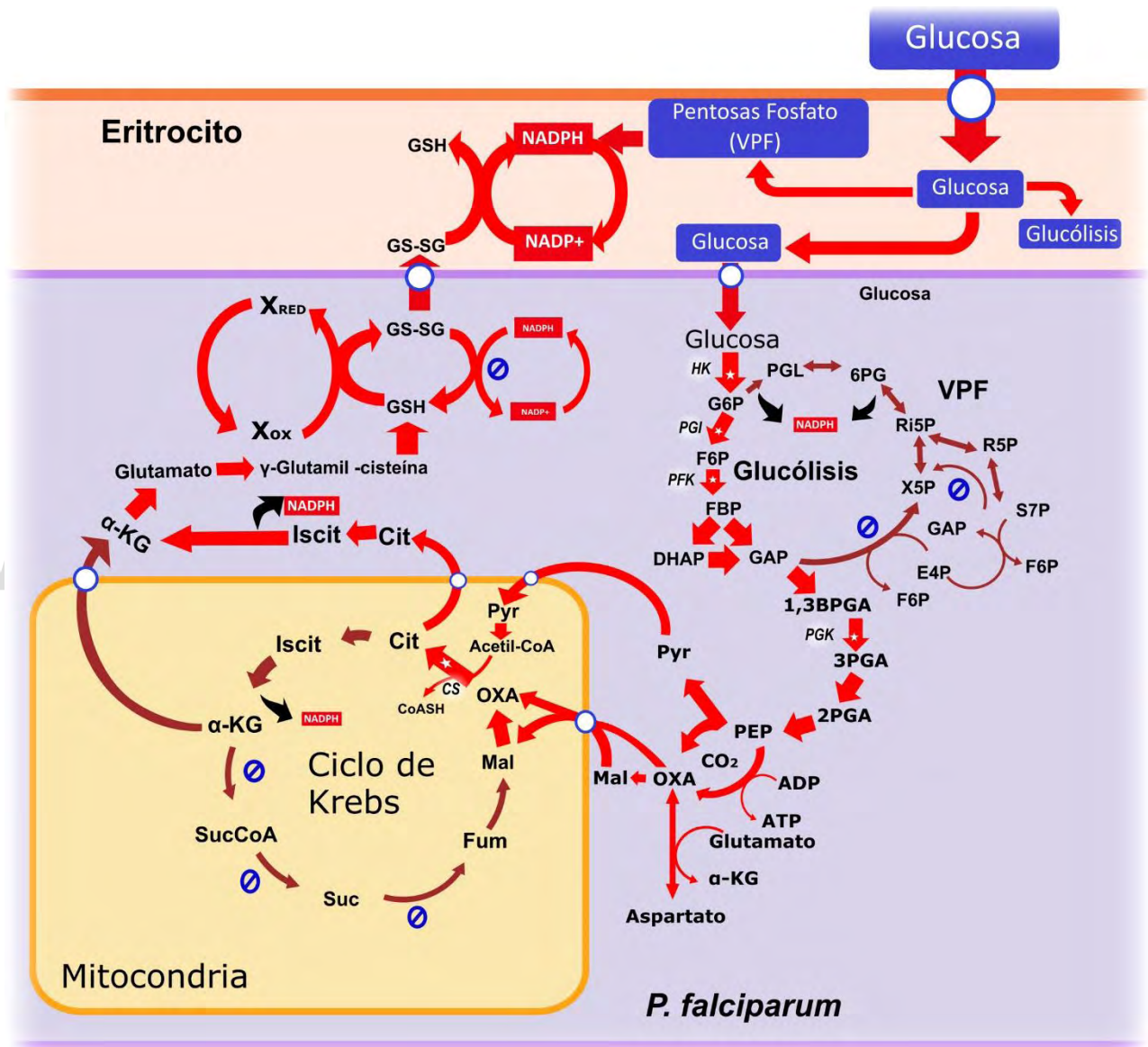


Figura 17 Cambios en las rutas metabólicas; glucólisis, ciclo de Krebs y estrés oxidativo propuesto para cepas resistentes, las flechas de color rojo brillante indican el principal flujo metabólico en estas rutas, las flechas opacas muestran reacciones con menor flujo. Se muestran los nombres abreviados de las enzimas correlacionadas positivamente con la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* y los círculos azules representan aquellas proteínas correlacionadas negativamente, basados en los datos de Mok et al. (2015).

Como ya se ha mencionado, *P. falciparum* tiene a su disposición grandes concentraciones de glucosa durante el ciclo intraeritrocítico y esta debe atravesar dos membranas para poder ser utilizada: la membrana de la vesícula parasítica y la del parásito. El transporte de la glucosa a la vesícula parasítica ocurre de forma pasiva, así que las concentraciones en este compartimiento son tan elevadas como en el citosol del eritrocito. Por otra parte, el transporte en la membrana del parásito se ha descrito como activo y es mediado por la proteína PfHT1 (PF3D7_0204700), que tiene una similitud de 20 a 30% con los transportadores de glucosa en seres humanos GLUTs (Landfear, 2010), hay que agregar que PfHT1 es un transportador de alta afinidad por la glucosa con una Km de 0.48 mM, a modo de comparación, el transportador del eritrocito GLUT1 tiene una Km de 6.9 mM (Woodrow *et al.*, 1999). El parásito regula el consumo de glucosa en base a su producción de ATP, que sería el factor limitante en este transporte, ya que la glucosa es abundante en el entorno y el transportador de PfHT1 tiene alta afinidad. No se han reportado cambios en la expresión de la proteína PfHT1 en cepas resistentes (Mok *et al.*, 2015) pero esto no implica que no exista un cambio en el flujo de glucosa ya que el transportador podría permitir un mayor flujo si así lo requiere el parásito al producir más ATP.

Es de resaltar que un transportador de triosas o hexosas (PF3D7_1218400) se encuentra subexpresado en cepas resistentes (Mok *et al.*, 2015) y podría estar participando en el importe de glucosa, sin embargo, esta proteína ha sido poco estudiada y solo por técnicas bioinformáticas (Martin *et al.*, 2005), a la fecha no se ha podido describir su función y ubicación subcelular *in vitro*, así que la información disponible indica que el importe de glucosa ocurre principalmente a través del transportador PfHT1 (Slavic *et al.*, 2010).

Lo expuesto debe tomarse en cuenta para hablar de un posible aumento en el flujo glucolítico en cepas resistentes en vista de un aumento en la expresión de las primeras tres enzimas de la glucólisis: Hexoquinasa (HK, PF3D7_0624000), Fosfoglucosa isomerasa (PGI, PF3D7_1436000) y Fosfofructoquinasa (PFK, PF3D7_0915400, **Figura 17** y **Figura 18**) (Mok *et al.*, 2015). Estas enzimas emplean ATP y son claves dentro de esta ruta, al ser puntualizado como puntos de regulación en muchos organismos, adicionalmente HK y PFK se han descrito con un importante coeficiente de control de flujo en *P. falciparum* (Penkler *et al.*, 2015; Niekerk *et al.*, 2016). Adicionalmente la fosfogliceratoquinasa (PGK, PF3D7_0922500) también esta sobreexpresada. Varias de estas enzimas transfieren grupos fosfato y pueden regular la velocidad en que se producen intermediarios en toda la glucólisis. Es probable que las cepas resistentes del parásito utilicen una mayor cantidad de glucosa, también esta sobreexpresión enzimática podría deberse a que la HK, PGI y PGK pueden interactuar con artemisinina (Ismail *et al.*, 2016) y quizás perder su actividad, obligando al parásito a sobreexpresar las proteínas para contrarrestar

este efecto, aunque el efecto de la Dihidroartemisinina (DHA, la forma metabólicamente activa de la droga) sobre la actividad de estas enzimas no ha sido medido.

A diferencia de otros organismos del filo Apicomplexa, *P. falciparum* posee todas las enzimas del ciclo de Krebs funcionales pero no son necesarias para la producción de ATP durante el ciclo intraeritrocítico, el ATP se produce por glucólisis como se puede evidenciar por el aumento de lactato, esto concuerda con la alta disponibilidad de glucosa en el medio, la dependencia de la glucólisis para la producción de ATP se puede ver en otros parásitos que se desarrollan en la sangre, como algunos tripanosomátidos (Coley *et al.*, 2011). El ciclo de Krebs no es indispensable para los estadios de anillo, trofozoíto y esquizonte, sin embargo si lo es en otros como gametocitos u ooquinetos (Ke *et al.*, 2015) y en cepas resistentes la diferencia de potencial en la membrana de la mitocondria es necesaria para que el parásito pueda continuar su ciclo celular luego de un estado de latencia (Peatey *et al.*, 2015) asociado generalmente a la resistencia a la artemisinina (Cheng *et al.*, 2012)(sección 1.4.2). Este hecho quizás se deba a que las enzimas del ciclo de Krebs pueden tener un papel importante en la latencia, y probablemente en la respuesta al estrés oxidativo u otro mecanismo que emplee el parásito para tolerar los efectos que produce la artemisinina.

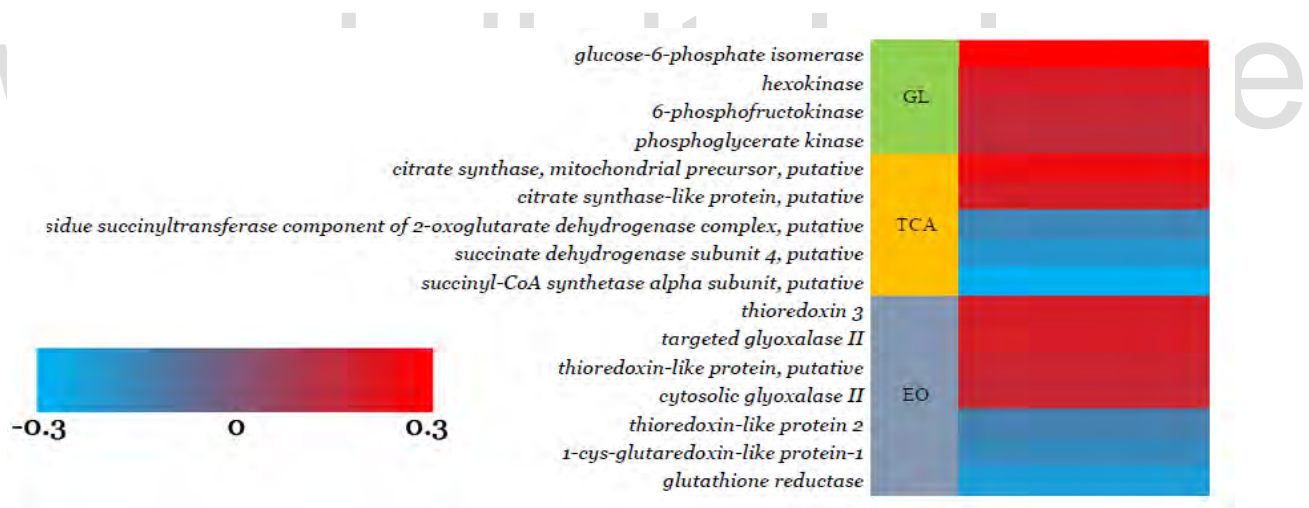


Figura 18 Genes correlacionados positiva (rojo) y negativamente (azul) con la resistencia implicados en la Glicólisis (GL), ciclo de Krebs (TCA) y estrés Oxidativo (EO) en cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina. Datos tomados de (Mok *et al.*, 2015).

Por otro lado, cuando se inactiva la expresión de diferentes enzimas del ciclo de Krebs en cepas mutantes el parásito sigue desarrollándose durante el ciclo intraeritrocítico (Ke *et al.*, 2015), lo que sugiere una gran plasticidad metabólica en esta ruta, siendo más acentuada en cepas resistentes (Carey *et al.*, 2017). Los datos de transcriptómica sugieren que las cepas resistentes emplean solo una parte del ciclo. Las enzimas succinato deshidrogenasa (PF3D7_1010300, subunidad 4 putativa), succinato CoA ligasa (PF3D7_1108500, subunidad α putativa) y α -cetoglutarato deshidrogenasa (PF3D7_1320800) se

encuentran subexpresadas en cepas resistentes. Por el contrario, la citrato sintasa (PF3D7_1022500 y PF3D7_0609200 putativa) se encuentra sobreexpresada (**Figura 17** y **Figura 18**).

Se ha evidenciado mediante el marcaje radiactivo de diferentes metabolitos que en las cepas silvestres de *P. falciparum* gran parte del carbono que entra ciclo de Krebs proviene de la glutamina que es obtenida del medio o de la digestión de Hb, esta glutamina es transformada en α -cetoglutarato (**Figura 19 A**) que se convierte finalmente en malato y sale de la mitocondria (Ke *et al.*, 2015). En cambio cuando se generan mutantes que no expresan la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa el parásito produce glutamato, en vez de usarlo, ya que los carbonos marcados en la glutamina nunca entran al ciclo de Krebs (**Figura 19 B**) (Ke *et al.*, 2015).

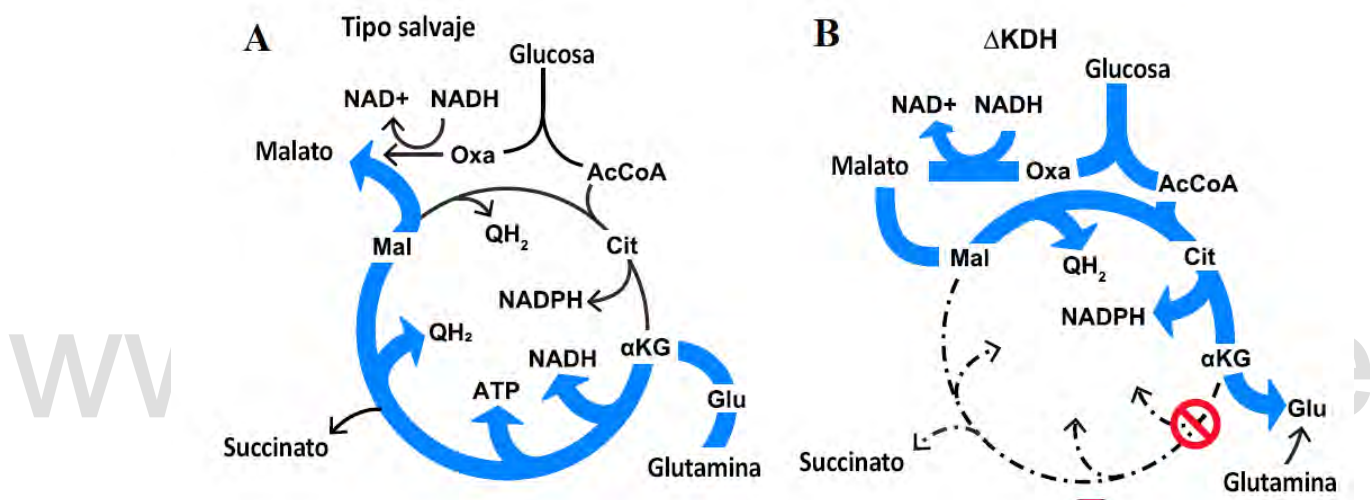


Figura 19 Flujo de metabolitos en el ciclo de Krebs en *Plasmodium falciparum* durante el ciclo intraeritrocítico . **A)** Flujo normal en cepas salvajes **B)** Flujo en cepas mutantes sin la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa. Extraído de Ke *et al.* (2015)

El modelo propuesto plantea que los cambios en la expresión de varias enzimas del ciclo de Krebs producen en el parásito cambios en esta ruta metabólica similares a los vistos en mutantes deficientes de α -cetoglutarato deshidrogenasa (**Figura 19 B**), también ilustrado en la **Figura 17**. La mayoría de la glucosa que entra al parásito se transforma en lactato (fermentación láctica), sin embargo, en nuestro modelo planteamos que una parte de esta glucosa entra al ciclo de Krebs en forma de malato y acetilCoA, en concordancia con lo ilustrado en la **Figura 19 B**.

El fosfoenol piruvato (PEP) se transformará en oxalacetato mediante la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) o por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) citosólica. Estas enzimas pueden transformar el fosfoenolpiruvato (PEP) en oxalacetato; la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) emplea

PEP y CO₂ para producir oxalacetato y fosfato libre, mientras que la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) usa PEP, CO₂ y además ADP para producir oxalacetato y ATP. Sin embargo, en el ciclo intraeritrocítico se ha propuesto que la PEPCK trabajaría en la dirección gluconeogénica, es decir produciendo fosfoenolpiruvato, ADP y CO₂ (Storm *et al.*, 2014), además de encontrarse mayormente expresada en el gametocito y estadios del parásito en el mosquito (Hayward, 2000), no obstante evidencia más reciente muestra que diferentes cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina pueden sobreexpresar PEPCK (Mok *et al.*, 2021). Usar la PEPCK tiene como ventaja la producción de una molécula de ATP por cada molécula de PEP, esto es relevante pues cada molécula de PEP que se desvía de la glucólisis no produce ATP mediante la piruvato quinasa (PK). Creemos que la PEPCK podría estar proveyendo del ATP que no se produce por la PK, de esta manera el desvío de moléculas de PEP para producir oxalacetato no causa una reducción en la energía neta producida en la ruta glucolítica. Estos argumentos nos llevan a pensar que el parásito usa principalmente PEPCK en cepas resistentes, a pesar de que la PEPC también podría seguir operando.

Una vez se produce el oxalacetato puede ser reducido a malato mediante una malato deshidrogenasa también citosólica (MDH). En las cepas resistentes a la artemisinina el malato entraría a la mitocondria a través del transportador PfDTC (PF3D7_0823900) mientras que el α -cetoglutarato sale a través del mismo transportador. Hay que resaltar que PfDTC no muestra cambios en la expresión en los datos de transcriptómica (Mok *et al.*, 2015). Por el contrario, en las cepas salvajes el malato sale mediante el transportador PfDTC que también puede transportar el oxalacetato mientras el α -cetoglutarato entra a la mitocondria (Nozawa *et al.*, 2011). Este malato que sale de la mitocondria en las cepas salvajes, puede ser transformado en oxalacetato mediante la MDH citosólica del parásito y dirigirse a otras rutas metabólicas como la recuperación de purinas o síntesis de pirimidinas si se transforma en aspartato (Jacot *et al.*, 2016).

Por otro lado, el piruvato que entra a la mitocondria se convertirá en acetil-CoA. Es de hacer notar que *P. falciparum* no posee el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) en la mitocondria y para transformar el piruvato producido por la glucólisis en Acetil-CoA emplea un sustituto, la BCKDH (del inglés *Branched-Chain Ketoacid Dehydrogenase*) que pertenece a la misma familia que la PDH y puede producir la reacción de PDH en otros organismos. Esta enzima es la única de la degradación de α -cetoácidos de cadena ramificada que tiene el parásito por lo que estaría huérfana en esta ruta metabólica, entonces es muy posible que su función sea la de sustituir a la PDH en la mitocondria (Jacot *et al.*, 2016).

En el modelo el ciclo de Krebs concluiría con la producción de α -cetoglutarato que sería expulsado de la mitocondria a la vez que el malato entraría en este organelo. En este planteamiento la mayoría de los átomos de carbono que entran al ciclo de Krebs provendrían principalmente de la glucosa y no de la glutamina que sería el origen en las cepas no resistentes.

Por su parte, un posible transportador de citrato/ α -cetoglutarato (PF3D7_1223800) se encuentra sobreexpresado en los datos de (Mok *et al.*, 2015), un potencial homólogo de la proteína YHM2 de levaduras. YHM2 ha sido bien caracterizado en el intercambio de citrato/ α -cetoglutarato y en mucha menor medida fumarato y succinato pero no malato (Castegna *et al.*, 2010). Resalta el hecho de que YHM2 en levaduras proporcione al citosol de NADPH para reacciones de síntesis y para tolerar el estrés oxidativo (Castegna *et al.*, 2010), si el homólogo de esta proteína en *P. falciparum* tiene la misma función estaría en concordancia con el modelo planteado (**Figura 17**); donde el parásito tiene distintos cambios metabólicos para tolerar el estrés oxidativo producido por la artemisinina. Este sería el hallazgo importante en este estudio, un aporte novedoso del modelo que plantea que la transformación de citrato en α -cetoglutarato en el citosol provee de una cantidad importante de NADPH disponible para tolerar el estrés oxidativo, hecho que solo ha sido reportado en levaduras.

En base a la importancia del transportador de citrato/ α -cetoglutarato para el modelo, se realizaron otros estudios bioinformáticos a fin de caracterizarlo mejor mediante análisis *in silico* (secciones 6.3 y 7.3), la proteína se nombró PfCOCP (del inglés *Citrate/Oxoglutarate Carrier Protein*) tomando en cuenta su posible función.

En el modelo, PfCOCP estaría transportando solutos desde la matriz hacia el citosol, esto como consecuencia de la acumulación de citrato y α -cetoglutarato dentro de la matriz, recuérdese que la citrato sintasa en estas cepas se encuentra sobreexpresada y las enzimas que llevan acabo la transformación de α -cetoglutarato en malato estan subexpresadas, lo que podría significar una acumulación de citrato y α -cetoglutarato, por otro lado la evidencia obtenida al realizar modelados del transportador PfCOCP y acoplamiento moleculares con citrato y α -cetoglutarato tambien concuerda con que el transporte ocurre solamente en un sentido.

El citrato requiere de dos enzimas comunmente encontradas en la mitocondria para transformarse en α -cetoglutarato; la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa (IDH). La primera enzima transforma el citrato en isocitrato mientras la segunda oxida el isocitrato en α -cetoglutarato. La aconitasa de *P. falciparum* (PF3D7_1342100), ha sido nombrada como IRP (*iron regulatory-like protein*) por su similitud con las proteínas reguladas por hierro en mamíferos (Hodges *et al.*, 2005), se ha probado que

esta proteína posee actividad aconitasa y se encuentra en mitocondria y en otro compartimiento, posiblemente citosol o vacuola digestiva (Hodges *et al.*, 2005). Por otro lado la IDH de *P. falciparum* (PF3D7_1345700) se encuentra en la mitocondria (Wrenger y Muller, 2003) sin embargo no se ha esclarecido si la proteína posee otra localización subcelular en *P. falciparum*. Un indicio importante de que tambien podría encontrarse en el citosol fue obtenido de *P. knowlesi* donde la mayoría de la actividad isocitrato deshidrogenasa se hallaba en la fracción citosólica (Sahni *et al.*, 1992). Estas evidencias sugieren que ambas enzimas podrían estar disponibles en el citosol para la transformación de citrato en α -cetoglutarato. En concordancia con el modelo, la IDH del parásito es dependiente de NADPH y se ha propuesto que su rol más relevante es contribuir con la producción de NADPH para mantener el equilibrio redox en el parásito (Wrenger y Muller, 2003), en este caso planteamos que la IDH podría cumplir ese rol en el citosol de *P. falciparum* en las cepas resistentes a la artemisinina y contribuir a el aumento en la tolerancia al estrés oxidativo.

Como ya fue expuesto en cepas sensibles a la artemisinina; el flujo del ciclo de Krebs proviene de la glutamina que se convierte en glutamato en una reacción llevada a cabo por la glutamina sintetasa (PF3D7_0922600) y el glutamato se transforma en α -cetoglutarato por la glutamato deshidrogenasa (GDH), por otro lado en las cepas resistentes a la artemisinina, ocurre la reacción inversa, el α -cetoglutarato se transforma en glutamato, posiblemente mediante la GDH. *P. falciparum* tiene 3 GDHs y dos se cree que pueden estar actuando en el citosol, una dependiente de NADPH (GDH1, PF3D7_1416500) y otra dependiente de NADH (GDH3, PF3D7_0802000) (Olszewski y Llinas, 2011). Debido a que el parásito puede necesitar de NADPH extra para tolerar el estrés oxidativo, para el reciclaje del glutatión y la tierreoxina, seria improbable que esté usando la GDH1 que depende de NADPH, pues cada molecula de NADPH producida al transformar isocitrato en α -cetoglutarato se gastaría en transformar el α -cetoglutarato en glutamato, así que el parásito debería usar la GDH3 que depende de NADH y no de NADPH. En vista a que ninguna de estas enzimas tiene cambios en la expresión en los datos de transcriptómica, podemos observar como es la expresión normal en cepas salvajes para tener una idea de cual podría ser más relevante en cepas resistentes, en este sentido, se comparó la expresión de estos genes usando PlasmoDB mostrando los datos de expresión obtenidos por (Bártfai *et al.*, 2010). De esto se ve que GDH3 tiene los mayores niveles de expresión durante el ciclo intraeritrocítico, llegando a 500 FPKM (Fragmentos por kilobase de transcrito por cada millón de lecturas), por otro lado GDH1 (dependiente de NADPH) tiene niveles que oscilan los 200 FPKM al inicio del ciclo intraeritrocítico y luego su expresión decae, por último la aspartatodesaminasa ronda los 80 FPKM, para tener un punto de comparación, la HK tiene valores que rondan los 400 FPKM durante estos estadios. Otra posible

evidencia del uso de GDH3 por *P. falciparum* para la producción de glutamato es el aumento en la cantidad de NAD^+ en los datos de metabolómica obtenidos en cepas resistentes a la artemisinina (Siddiqui *et al.*, 2017). Así, aunque estas enzimas no tienen cambios en la expresión en cepas resistentes, el hecho de que hay 3 proteínas que pueden transformar α -ctoglutarato en glutamato sugiere que el parásito no tendría problemas en llevar a cabo esta reacción en las condiciones necesarias: alta disponibilidad de α -ctoglutarato, aspartato, grupos aminos, NADH y/o NADPH, y de las tres enzimas GDH3 sería la principal.

Los datos de metabolómica obtenidos de cepas resistentes por Siddiqui *et al.* (2017) muestran 3 metabolitos en mayor cantidad: NAD^+ (ya mencionado), Glutación (GSH) y γ -Glutamilcisteína. Estos metabolitos sugieren un aumento en el estrés oxidativo debido a que el GSH es el principal antioxidante de las células (Pompella *et al.*, 2003) además la γ -Glutamilcisteína permite producir glutación. El glutación extra que se ve en cepas resistentes puede ser consecuencia del ciclo de Krebs truncado que produce glutamato y que puede transformarse en γ -Glutamilcisteína por la γ -Glutamilcisteína Sintetasa (PF3D7_0918900) y luego en glutación por la glutación sintasa (PF3D7_0512200).

El glutación requiere de NADPH para reducirse y puede obtenerse de otras vías que no hemos mencionado hasta el momento. Primero podría ser producido por la vía de las pentosas fosfato (VPF) mediante dos enzimas, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (PF3D7_1453800) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PF3D7_1454700), ninguna sobreexpresada en los datos de Mok *et al.* (2015). Esta vía tendría que competir con la glucólisis por la glucosa 6-fosfato y en vista de que la PGI de la glucólisis está sobreexpresada gran parte de la glucosa seguiría por la glucólisis y un pequeño porcentaje la vía de las pentosas fosfato. Hay que agregar que la transcetolasa (PF3D7_0610800) de las pentosas fosfato se encuentran subexpresadas (Mok *et al.*, 2015). Otra forma de obtener NADPH sería por medio de la NAD⁺kinasa (PF3D7_0913300) o la NAD(P) transhidrogenasa (PF3D7_1453500), pese a que no tienen su expresión alterada en cepas resistentes (Mok *et al.*, 2015). Estas proteínas han sido poco estudiadas y solo identificadas por técnicas bioinformáticas, no obstante podrían estar proveyendo al parásito del NADPH extra que necesita. El NADPH también puede producirse mediante la isocitrato deshidrogenasa (PF3D7_0820700) en el ciclo de Krebs que como ya mencionamos se ha propuesto que es la fuente principal de NADPH en *P. falciparum* (Wrenger y Muller, 2003), la vía concuerda con un posible aumento de citrato, y con el ciclo de Krebs truncado propuesto donde este citrato será transportado hacia el citosol y allí transformado en α -cetoglutarato produciendo NADPH (**Figura 17**).

Existe otra alternativa a esta propuesta de que las cepas resistentes a la artemisinina toleran el estrés oxidativo mediante el reciclaje del glutatión oxidado (GSSG) por la glutatión reductasa (GR). Los datos de metabolómica muestran un aumento en el glutatión (GSH) y la γ -glutamylcisteína, esta es producida por la γ -glutamylcisteína ligasa, luego la glutatión sintasa produce GSH en una reacción mediada por la hidrólisis de ATP incorporando glicina a la γ -glutamylcisteína. De esta forma, las cepas resistentes toleran el estrés oxidativo haciendo uso de la síntesis *de novo* de GSH y no el reciclaje de GSSG y al respecto hay varios hechos que sostienen esta propuesta: i) En los datos suministrados por Mok *et al.* (2015) la glutatión reductasa (PF3D7_1419800) se encuentra correlacionada negativamente con la resistencia (subexpresada, **Figura 18**), ii) el aumento en las concentraciones de GSH y γ -Glutamylcisteína en los datos de metabolómica (Siddiqui *et al.*, 2017) sugieren directamente un aumento en la producción *de novo* de GSH, iii) Patzewitz *et al.* (2011) encuentran que la biosíntesis de GSH es indispensable para el desarrollo asexual de *P. falciparum*, iv) al aumentar la cantidad de γ -glutamylcisteína ligasa en cepas mutantes y someterlas junto con cepas salvajes a un inhibidor de esta enzima, obtienen una concentración de GSH igual en ambas cepas. Adicionalmente, cuando la biosíntesis de GSH se encuentra aumentada se produce una reducción en la cantidad de glutatión reductasa y un aumento en el eflujo de GSSG hacia el eritrocito. v) En cepas Dd2 resistentes a la cloroquina, encontradas comúnmente en el sudeste asiático, estas responden al estrés oxidativo mediante la producción *de novo* de GSH y no por la reducción por la GR (Meierjohann *et al.* (2002). Esta alternativa concuerda también con el modelo que hemos discutido hasta el momento pues el citrato citosólico se terminaría transformando en GSH.

Aunque sea menos relevante el reciclaje de GSSG en estas cepas, aún podrían necesitar de mayores niveles de NADPH para el reciclaje de otras moléculas para tolerar el estrés oxidativo como la tioredoxina, así que una reducción del reciclaje de GSSG no implica que no haya mayor demanda de NADPH en cepas resistentes. Y como ya se mencionó, la transformación de isocitrato en α -ctoglutarato podría ser la fuente principal de este NADPH. Por último, las cepas resistentes a la droga obtenidas *in vitro* luego de años de exposición a altas concentraciones de artemisinina, mostraron una sobreexpresión de la GR, lo que sugiere que en parásito pueden surgir mecanismos para tolerar el estrés oxidativo que involucren un aumento o una disminución de la GR (Cui *et al.*, 2012).

El porqué de los cambios metabólicos que podrían estar ocurriendo en estas cepas resistentes expuestos en el modelo (**Figura 17**) posiblemente sea una consecuencia de aumentar la tolerancia del parásito contra el estrés oxidativo producido por la artemisinina, un efecto bien documentado de la droga sobre el parásito (Rocamora *et al.*, 2018).

Otro indicio que vale la pena agregar y podría indicar un aumento en el flujo glucolítico planteado inicialmente en esta sección es la sobreexpresión de 2 glioxalasa en las cepas resistentes: glioxalasa citosólica II (cGLO2, PF3D7_1205700) y glioxilasa dirigida II (del inglés *targeted glyoxalase II*, tGLO2 PF3D7_0406400) (**Figura 18**). Estas enzimas están involucradas en la eliminación de especies reactivas producidas como producto secundario de la glucólisis como metilglioxal y otros 2-oxo-aldehídos para prevenir la formación de productos finales de glicosilación avanzada que pueden ser dañinos para el parásito (Wezena *et al.*, 2017). Cabe resaltar que cGLO2 es dispensable para el parásito durante el ciclo intraeritrocítico y tGLO2 no se ha podido evaluar (Wezena *et al.*, 2017).

7.2.2 Cadena de transporte de electrones y síntesis de pirimidinas

Además de una subexpresión de varias enzimas implicadas en el ciclo de Krebs, distintas subunidades de los complejos proteicos que participan en la cadena de transporte de electrones (I, II, III, IV) y también de la ATP sintasa mitocondrial se encuentran subexpresados (**Figura 20**). En el caso de *P. falciparum* el complejo I de la cadena se encuentra sustituido por una sola proteína, una NADH deshidrogenasa del tipo II (PF3D7_0915000) que no tiene la capacidad de bombear protones, pero sí transferir los electrones del NADH a la Ubiquinona y recientemente se probó que es dispensable durante el ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (Ke *et al.*, 2019), encontrándose este correlacionado negativamente con las cepas resistentes. Por su parte, el complejo succinato deshidrogenasas (SDH, también llamado complejo II) actúa en el ciclo de Krebs oxidando el succinato para formar fumarato y a la vez que reduce la ubiquinona a ubiquinol. Como ya se mencionó en cepas resistentes la subunidad 4 del complejo (SDH4, PF3D7_1010300) está correlacionada negativamente. El complejo III se encarga de oxidar ubiquinol formando ubiquinona y también reduce el citocromo C, por ello se denomina ubiquinol-citocromo-C reductasa. El gen PF3D7_0211300 identificado en PlasmoDB como *ubiquinol-cytochrome-reductase assembly factor 1, putative* está correlacionado negativamente en cepas resistentes, es probable que esta proteína cumpla un papel como chaperona para la formación del complejo III de la cadena de electrones, por otro lado la subunidad 7 del complejo (PF3D7_1012300) también se encuentra subexpresada. El complejo IV, Citocromo C oxidasa también tiene varios genes correlacionados negativamente con la resistencia, las subunidades ApiCOX14(PF3D7_1339400), ApiCOX19(PF3D7_1402200), ApiCOX25(PF3D7_1465000) y ApiCOX26(PF3D7_1439600), también el factor de ensamblaje 5 (PF3D7_0825600). De estos ApiCOX25 es indispensable para la fosforilación oxidativa en *T. gondii* (Seidi *et al.*, 2018), no obstante, los genes ApiCOX no han sido estudiados en *P. falciparum*. El análisis de proteínas sobreexpresadas y subexpresadas con función desconocida (secciones 6.1.1 y 6.1.2) mostró otras proteínas de la cadena de transporte subexpresadas; Sdhs5 del complejo SDH

(PF3D7_0728400) y la subunidad II del complejo citocromo oxidasa (PF3D7_1147400) hecho que concuerda con lo ya descrito, hay que resaltar que de este complejo se encontró la subunidad Vib correlacionada positivamente con la resistencia.

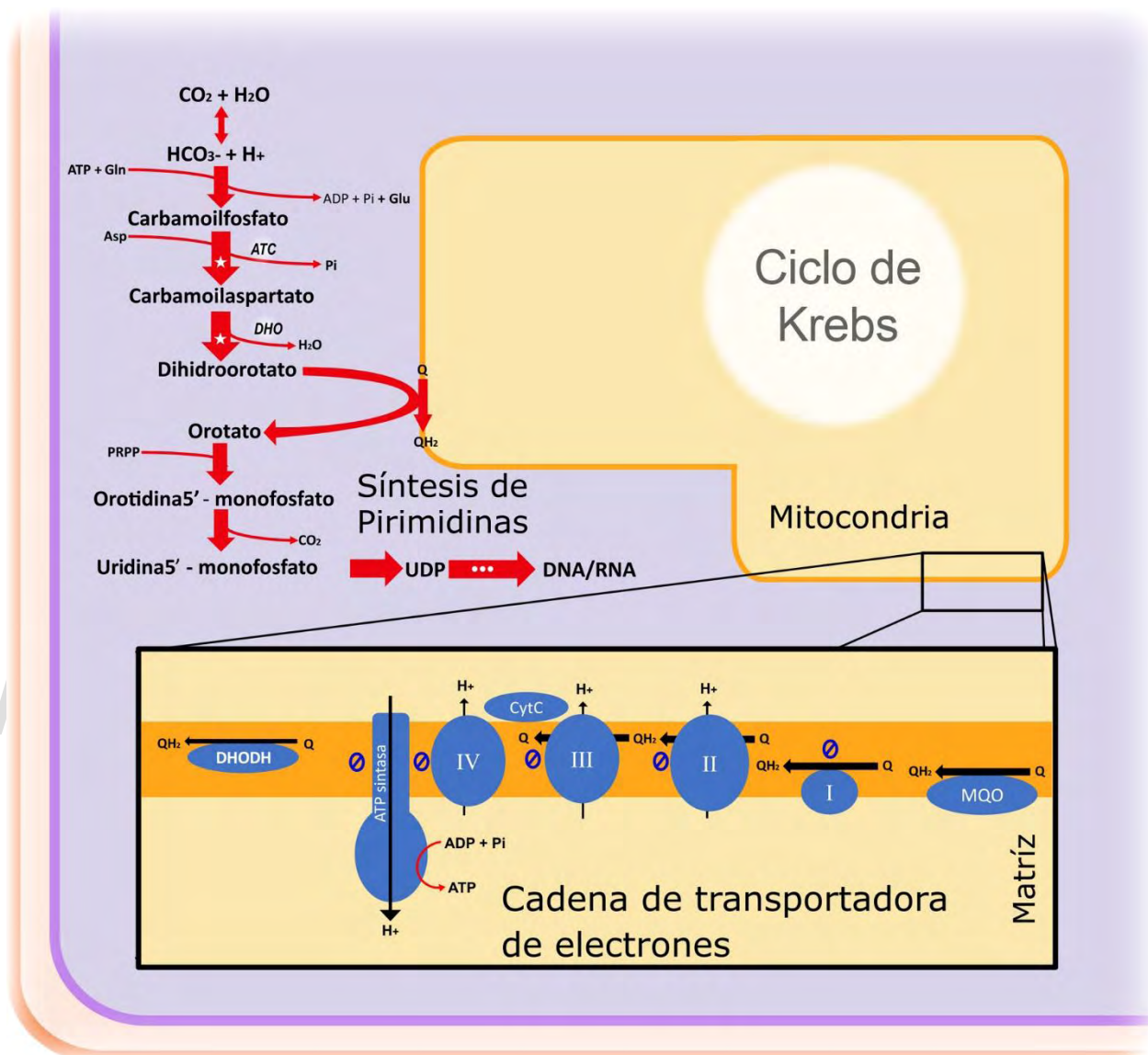


Figura 20 Cambios cadena transportadora de electrones y síntesis de pirimidinas para cepas resistentes , se muestran los nombres abreviados de las enzimas correlacionadas positivamente con la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* según los datos de (Mok et al., 2015)

Normalmente la diferencia de potencial generada por el bombeo de protones en los 3 complejos de la cadena de transporte de electrones (recuérdese que el complejo I en *P. falciparum* no tiene esta capacidad) es usada para sintetizar ATP mediante el complejo ATP sintetasa, los datos mostrados sugieren una reducción notable en la diferencia de potencial en la membrana de la matriz mitocondrial, agregado a esto, 3 proteínas que forman parte de la ATPsintasa se encuentran correlacionadas

negativamente con las cepas resistentes; la subunidad α (PF3D7_0217100), subunidad C (PF3D7_0705900) y el factor de ensamblaje 1 del complejo F1 (PF3D7_1209800).

Se puede concluir entonces que en cepas resistentes hay una reducción en la producción de ATP mediante la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (fosforilación oxidativa), pese a que durante el ciclo intraeritrocítico la producción de ATP por esta vía ya es limitada. Se debe resaltar que, pese a los cambios antes mencionados, la cadena de transporte de electrones debe seguir operando en cepas resistentes debido a dos hechos importantes: i) Debe haber oxidación de ubiquinol a fin de producir ubiquinona para la síntesis de pirimidinas mediante la DHODH (Painter *et al.*, 2007) y ii) Se ha probado que los parásitos requieren diferencia de potencial de membrana mitocondrial para surgir de la latencia (Peatey *et al.*, 2015), el segundo hecho puede ser debido al primero.

La síntesis de pirimidinas *de novo* es un proceso metabólico de 6 pasos (**Figura 6, Figura 20** sección 1.2.2), en el paso 2 se produce carbamoil aspartato a partir de aspartato y carbamoilfosfato, llevado a cabo por la enzima Aspartato transcarbamoilasa (ATC, PF3D7_1344800), el paso 3 emplea el carbamoilaspartato para formar dihidrooorotato a través de la Dihidrooorotasa (DHO, PF3D7_1472900), ambas enzimas se encuentran correlacionadas positivamente en los datos de transcriptómica (**Figura 20**) (Mok *et al.*, 2015) y también la proteína *enhancer of rudimentary* (PF3D7_1037700) una proteína bien conservada en eucariotas que estimula la producción de pirimidinas y cumple otras funciones en la célula. Por último, en la identificación de las proteínas con función desconocida (sección 6.1.1) fue encontrado un posible transportador de folato-biopterina (PF3D7_1022200), hecho que podría indicar que estas cepas requieren de una mayor cantidad de folato para tolerar el estrés oxidativo, tomando en cuenta que el folato se encuentra implicado en la síntesis de pirimidinas (Hyde, 2005), la sobreexpresión de este transportador putativo podría estar asociada con el aumento en la producción de pirimidinas.

Todo esto sugiere que hay un aumento en la síntesis de pirimidinas *de novo* en cepas resistentes y hace necesario que algunas enzimas implicadas en la cadena de transporte de electrones operen solo para el reciclaje de la ubiquinona, que es usada en la síntesis de pirimidinas por la DHODH, la única función esencial de la cadena durante el ciclo intraeritrocítico (Painter *et al.*, 2007), no obstante surge una contradicción debido a que los cambios en la expresión de diferentes proteínas de los complejos de la cadena podrían afectar la disponibilidad de ubiquinona necesaria para que la DHODH actúe. Los complejos I y II se encuentran subexpresados lo que podría indicar que hay una mayor disponibilidad de ubiquinona para la DHODH, pero de forma similar, la subexpresión del complejo III sugiere que hay una menor oxidación de ubiquinol, la reacción que produce ubiquinona. Hay que agregar que la malato

quinona oxidoreductasa (MQO) no tiene cambios en la expresión en estas cepas y cumple una función importante para el flujo de metabolitos en el ciclo de Krebs propuesto, al transformar malato en oxalacetato (**Figura 10** y **Figura 17**), contribuyendo también a la reducción en la ubiquinona disponible. Sería difícil esclarecer del todo el ciclo de la ubiquinona en estas cepas con los datos presentes, siendo un aspecto del modelo que requiere de más estudios. La evidencia reciente en cepas resistentes muestra que existe una acumulación de malato (Mok *et al.*, 2021), hecho que sugiere que el malato se acumula en la mitocondria posiblemente debido a que la MQO no puede transformar todo el malato a la velocidad que es producido o importado del citosol, esto podría ser un problema en el modelo, sin embargo, el transportador de malato/ α -glutarato también es muy eficiente transportando oxalacetato (Nozawa *et al.*, 2011), de esta forma si el malato se acumula porque la MQO no lo puede procesar rápidamente, el oxalacetato puede entrar directamente a la mitocondria.

El aumento en la síntesis de pirimidinas pudiera ser debido a que las cepas resistentes requieren de una mayor reparación del ADN, recuérdese que la droga produce un aumento en el estrés oxidativo (Rocamora *et al.*, 2018), lo que también afecta al ADN. Normalmente el parásito requiere de las pirimidinas para la duplicación del material genético en diferentes estadios del ciclo intraeritrocítico, no obstante, las cepas resistentes presentan un letargo en el ciclo celular lo que también sugiere una duplicación menor del material genético, estos planteamientos apuntan a que las pirimidinas extras que está produciendo el parásito en cepas resistentes no contribuyen a la duplicación del ADN sino a la reparación de este. Es necesario realizar más estudios para esclarecer el rol de este aumento de las pirimidinas en cepas resistentes.

7.2.3 El Ca^{+2} y otras rutas de señalización

P. falciparum regula los niveles de calcio (Ca^{+2}) citosólico en un rango menor al micromolar (Alleva y Kirk, 2001) y pueden aumentar en base a la concentración de Ca^{+2} en el medio externo llegando a 0,76 en un medio externo con 1mM de Ca^{+2} (Alleva y Kirk, 2001), cabe resaltar que los eritrocitos no infectados mantienen niveles de Ca^{+2} de 30-60 nM (Bogdanova *et al.*, 2013), ante esto, el parásito induce cambios en el entorno dentro de la vacuola parasítica para que la concentración de Ca^{+2} aumente a $\sim 40\mu\text{M}$ y el parásito pueda desarrollarse (Gazarini *et al.*, 2003). Se produce también un aumento en el flujo de Ca^{+2} desde el plasma hacia el glóbulo rojo de hasta 18 veces por medio de la incorporación de canales de calcio en la membrana del eritrocito (Budu y Garcia, 2012). Las reservas del Ca^{+2} del parásito probablemente se encuentran en el retículo endoplasmático (RE) y en estructuras similares a los acidocalcisomas de otros protozoarios (Alleva y Kirk, 2001).

La homeóstasis del Ca^{+2} durante el ciclo intraeritrocítico se ve regulada por muchos otros mensajeros (Budu y Garcia, 2012), uno de ellos es el fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P). En este sentido, se ha observado que el PI3P induce la liberación de Ca^{+2} desde las reservas del retículo endoplasmático, efecto que se ve en trofozoíto, pero no en esquizonte y es posible que los estímulos que permiten la liberación de calcio dependan del estado de desarrollo del parásito (Alves *et al.*, 2011). Hay que resaltar que los niveles de Ca^{+2} varían en los estadios sanguíneos del parásito siendo de 372,5 nM en anillo, 30 nM en trofozoíto, 310 nM en esquizonte y 949,6 nM en merozoíto (Pandey *et al.*, 2016), es importante tomar en cuenta estos cambios para estudiar como el aumento o disminución del calcio afecta al ciclo celular.

Resalta el hecho de que en los datos de transcriptómica PfATP6 (PF3D7_0106300) se encuentra correlacionada negativamente en cepas resistentes a la artemisinina. Esta proteína posiblemente se encarga de transportar el calcio hacia el RE lo que podría indicar un aumento en los niveles de Ca^{+2} citosólico, sin embargo, hay que tomar en cuenta que el parásito tiene otras reservas de este ion, como la vacuola digestiva o acidocalcisomas, también puede ser que la homeostasis de Ca^{+2} sea mediada por otras proteínas. La tapsigargina es un inhibidor de ATPasas del tipo SERCA y ha sido comúnmente usada para inhabilitar la retención de Ca^{+2} dentro del RE en *P. falciparum*, mostrando que el RE no es el único lugar donde se retiene Ca^{+2} , otro compartimiento ácido, posiblemente la vacuola digestiva (Pereira *et al.*, 2020) o acidocalcisomas probablemente estaría contribuyendo a la retención de Ca^{+2} .

Por otro lado, en cepas obtenidas *in vitro* de *T. gondii* (otro parásito del phylum Apicomplexa) que presentaban una resistencia baja a la artemisinina, se encontró una desregulación de los niveles de Ca^{+2} citosólico, de hecho estas cepas tenían entre 2 y 2,5 veces mayor concentración de calcio citosólico respecto a cepas sensibles a la droga, los parásitos también eran poco eficientes reduciendo los niveles de Ca^{+2} si se aplicaba tapsigargina, además no secretaban las proteínas MIC (secreción dependiente de Ca^{+2}) cuando se aplicaba artemisinina en ellas (Nagamune *et al.*, 2007). Esta clase de desregulaciones en los niveles de Ca^{+2} pueden estar ocurriendo en cepas de *P. falciparum* resistentes a la artemisinina, sin embargo, aún no se ha reportado una reducción o aumento en los niveles de Ca^{+2} en cepas resistentes respecto a cepas salvajes.

Mbengue *et al.* (2015) proponen un mecanismo que permite a cepas de *P. falciparum* resistir a la artemisinina a causa de un aumento en la concentración de Fosfatidil Inositol 3 fosfato (PI3P), debido a que la proteína PfKelch 13 mutada (C580Y) no es tan eficiente ubiquitinando la enzima fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K, que produce PI3P) por ello se degrada menos y los niveles de PI3P son mayores. En

efecto estos investigadores encontraron que en cepas resistentes del sudeste asiático con diversas mutaciones en PfKelch13 (C580Y, Q431K, R538T) los niveles de PI3K eran entre 1,5 y 2 veces mayores respecto a cepas sensibles, de forma similar, cuando se modificaron genéticamente cepas sensibles insertando en el cromosoma la proteína PfKelch13 con la mutación C580Y se consiguió entre 2 a 3 veces más PI3K respecto a aquellos parásitos que no tenían la mutación. También encontraron que la proteína Pfkelch13 se asociaba con PI3K de manera más eficiente si no estaba mutada. En este trabajo no se midieron los niveles de Ca^{+2} citosólico, lo que habría sido importante para determinar si el PI3P afectaba sus niveles en estas cepas. Por último estos investigadores no encontraron cambios en los niveles de la proteína pfKelch13, cambios si encontrados en otros trabajos de la resistencia, una reducción en la cantidad de PfKelch13 (Siddiqui *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019).

Por otra parte, la concentración de fosfoinosítoles durante el ciclo intraeritrocítico para *P. falciparum* aumenta hasta 13 veces respecto a glóbulos rojos no infectados, lo que muestra la importancia de estos lípidos para el parásito (Tawk *et al.*, 2010). Adicionalmente, la concentración de PI3P es bien diferenciable en los distintos estadios del ciclo intraeritrocítico; 11.64 en anillo, 146.39 en trofozoíto y 184.72 en esquizonte (medido en conteos de radiactividad por minuto empleando lípidos marcados). Con todo lo dicho es probable que algunas cepas resistentes a la artemisinina presenten niveles mayores de PI3P en el estadio anillo respecto a cepas sensibles, básicamente lo propuesto por Mbengue *et al.* (2015), sin embargo tomando en cuenta los niveles de PI3P durante el ciclo intraeritrocítico es posible que un aumento de este lípido dentro del estadio anillo pueda activar respuestas al estrés oxidativo que emplea el parásito durante el estadio de trofozoíto lo que incrementaría la tolerancia a la artemisinina, respuestas tentativamente activadas por niveles más elevados de Ca^{+2} en vista al hecho de que el PI3P aumenta los niveles de este ion y a que en cepas de *T. gondii* resistentes a la droga existe una desregulación en los niveles de calcio, sin embargo hace falta mayor evidencia experimental para probar esta teoría, sobre todo tomando en cuenta que los niveles de Ca^{+2} son muy variables durante los distintos estadios del parásito en el ciclo intraeritrocítico (Pandey *et al.*, 2016) y que los estímulos que regulan la concentración de Ca^{+2} (como el PI3P), pueden tener un efecto distinto dependiendo del estadio en que se encuentre el parásito (Alves *et al.*, 2011).

Cuando (Mbengue *et al.*, 2015) plantearon este mecanismo no se había esclarecido la función de la proteína PfKelch13, hoy en día la evidencia muestra que actúa junto con muchas otras proteínas en la formación de vesículas que permiten la toma de hemoglobina por el parásito (Yang *et al.*, 2019), PI3K también se encuentra implicada en este proceso y es exportada hacia el eritrocito (Vaid *et al.*, 2010). Esto puede complicar más el panorama porque las proteínas cumplen funciones diferentes, por un lado PI3K

permite la producción del PI3P y por otro funciona en la formación de vesículas que transportan Hb del eritrocito hacia el parásito, de manera similar PfKelch13 permite la formación de vesículas con Hb y también ubiquitina a PI3K para su degradación, establecer como estas funciones tienen un efecto en la resistencia a la artemisinina permitiría esclarecer como realmente funciona el mecanismo propuesto por Mbengue *et al.* (2015), también si en efecto el PI3P aumenta los niveles de Ca^{+2} y esto le permite a las cepas resistentes tolerar mejor el estrés oxidativo.

El parásito tiene además otros segundos mensajeros que actúan en cascadas de señalización que también pueden verse afectadas por el calcio de manera directa o indirecta. El adenosin mono fosfato cíclico (AMPC) es uno de ellos, este se encuentra implicado en diferentes procesos celulares y se ha reportado su importancia para microbios patógenos (McDonough y Rodriguez, 2011). El AMPC puede ser generado mediante adenil ciclasas (AC) que emplean ATP y producen difosfato, el cual puede ser degradado mediante fosfodiesterasas que producen AMP (McDonough y Rodriguez, 2011). *P. falciparum* posee dos AC; adenil ciclasa α (PfAC α , PF3D7_1404600) y adenil ciclasa β (PfAC β , PF3D7_0802600). En el ciclo intraeritrocítico el parásito depende principalmente de PfAC β que es indispensable para su supervivencia y tiene un aumento en su expresión en el trofozoíto y los niveles más altos del ARNm se ven en el esquizonte (Eric Salazar *et al.*, 2012), PfAC α se expresa en otros estadios del parásito, y al parecer no es indispensable durante el ciclo intraeritrocítico (Eric Salazar *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que el AMPC tienen un efecto sobre los niveles citosólicos de Ca^{+2} y posiblemente regula la velocidad del ciclo celular, esta interacción se encuentra intervenida por quinasas dependientes de cAMP (PKA) (Beraldo *et al.*, 2005). Una mayor cantidad de parásitos en el estadio esquizonte durante el ciclo intraeritrocítico son producidos cuando los niveles de AMPC son mayores, sin embargo, si los niveles de AMPC se reducen o se inhiben las PKA la proporción de parásitos en estadio trofozoíto o anillo tardío se incrementa (Beraldo *et al.*, 2005). Se debe destacar que el retraso en la progresión de la primera mitad del ciclo intraeritrocítico ha sido mencionada en la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* (Mok *et al.*, 2011; Mok *et al.*, 2015). El aumento del Ca^{+2} citosólico ocurre por la liberación desde las reservas del parásito como el retículo endoplasmático o los acidocalcisomas y también por un aumento en la toma de calcio desde la vacuola parasítica (Beraldo *et al.*, 2005).

En los datos de transcriptómica la enzima PfAC β se encuentra correlacionada negativamente con la resistencia, lo que sugiere una disminución en el AMPC, un retraso en el ciclo celular en función a lo propuesto anteriormente y una posible reducción en los niveles del Ca^{+2} citosólico en cepas resistentes. Hay una reducción del AMPC y posiblemente del Ca^{+2} , sin embargo, ya se había mencionado que las

cepas resistentes tienen un nivel mayor de PI3P y con ello mayores niveles de Ca^{+2} citosólico. Posiblemente los mecanismos de liberación de calcio inducidos por AMPc y por PI3P sean distintos, si tomamos en cuenta que el estadio de trofozoíto presenta los niveles de Ca^{+2} más bajos del ciclo intraeritrocítico (Pandey *et al.*, 2016), es probable que un aumento en la concentración de Ca^{+2} citosólico durante el estadio anillo o una disminución del ion luego de la formación del trofozoíto puedan ser ambos procesos que ralenticen el ciclo celular. Serían necesarios más ensayos experimentales para dilucidar si el Ca^{+2} aumenta en cepas resistentes, en qué momentos del ciclo celular, qué segundo mensajero induce esta respuesta o desde qué compartimiento procede el Ca^{+2} (ER, acidocalcisomas o el espacio extracelular), también es posible que la resistencia pueda surgir de diferentes maneras y que no todas impliquen el aumento en los niveles de Ca^{+2} en las primeras fases del ciclo intraeritrocítico.

Las quinasas dependientes del AMPc (PKA) ya mencionadas, no son las únicas que juegan un papel importante en la regulación del ciclo de vida de *P. falciparum* de hecho el parásito tiene un pequeño quinoma, de menos de 100 quinasas y muchas enzimas esenciales han sido descritas (Lucet *et al.*, 2012), en general los segundos mensajeros actúan mediante diferentes quinasas, como las PKA o las quinasas dependientes de calcio (CDPK), solo presentes en apicomplejos y plantas. Solyakov *et al.* (2011) identificaron 1177 sitios de fosforilación en 650 proteínas del parásito y de todas las quinasas presentes 36 parecen ser esenciales durante el ciclo intraeritrocítico. En los datos de transcriptómica hay 5 de estas quinasas indispensables y 4 dispensables. Las 5 esenciales para el ciclo intraeritrocítico son: la quinasa similar a tirosin quinasa 1 (PfTKL1, PF3D7_0211700), la quinasa dependiente de ciclina 1 (PfCLK1, PF3D7_1445400) y 4 (PfCLK4, PF3D7_0302100), la quinasa dependiente de calcio 5 (PfCDPK5, PF3D7_1337800) y la quinasa 9 (PfPK9, PF3D7_1315100). Por otro lado las 4 quinasas dispensables son: la quinasa 2 involucrada implicada en la fosforilación de $\text{eIF2}\alpha$ (PfEIK2, PF3D7_1444500), la quinasa 4 relacionada con NIMA (PfNEK4, PF3D7_0719200), la quinasa dependiente de calcio 4 (PfCDPK4, PF3D7_0717500) y la quinasa dependiente de calcio/calmodulina (PF3D7_0715300).

PfTKL1 es una de las 4 proteínas identificadas en *P. falciparum* similares a las Tirosin quinasas (*Tyrosine Kinase-like*), las tirosin quinasas se encuentran en otros grupos de eucariotas como mamíferos, pero no han sido identificadas en *P. falciparum*, y varias de las PfTKL no se parecen a ninguna quinasa vista en animales. De las cuatro PfTKL solo ha sido estudiada PfTKL3 (PF3D7_1349300) siendo la más parecida en cuanto a presencia y ubicación de los motivos SAM y MORN con PfTKL1 que se encuentra sobreexpresada en los datos de Mok *et al.* (2015). Lamentablemente es difícil esclarecer la función de PfTKL1 y qué papel puede estar cumpliendo en la resistencia, no obstante, el hecho de que sea indispensable para el desarrollo en el ciclo intraeritrocítico la hace un blanco de investigación atractivo.

PfCLK1 fue denominada inicialmente como PfLAMMER en vista a la semejanza con la familia de las quinasas LAMMER, y a la vez pertenece a la familia de las quinasas dependientes de ciclina (J.-L. Li, Targett, *et al.*, 2001). PfLAMMER ha sido asociada con la diferenciación sexual del parásito en base a la expresión en estos estadios (J.-L. Li, Targett, *et al.*, 2001). Posteriormente Agarwal *et al.* (2011) se refieren a PfLAMMER como PfCLK1 (quinasa dependiente de ciclina 1) y encuentran que es importante no solo en el ciclo sexual sanguíneo sino también en el asexual. Estos investigadores determinan que PfCLK1 se localiza principalmente en el núcleo y que puede fosforilar a Sky1p (su homólogo en levaduras) y dos factores de *splicing*, además se asociaba con proteínas que posiblemente posean funciones de nucleasas, fosfatasas y helicasas, lo que indica que PfCLK1 actúa en la regulación génica posiblemente a través de la modificación postraduccional del ARNm. En los datos de transcriptómica esta proteína se encuentra correlacionada negativamente con la resistencia y su posible papel en la regulación génica concuerda con los cambios en la expresión de enzimas implicadas en la maduración de ARN vista en estas cepas, PfCLK1 requiere más investigación para saber específicamente que procesos metabólicos se encuentran reducidos cuando la expresión es menor.

PfCLK4 también es conocida como PfSRPK1 (quinasa 1 relacionada con el *splicing*) y actúa en la regulación génica, interactuando con el factor de *splicing* PfSR1, probablemente promueve el *splicing* dentro del núcleo al inicio del ciclo intraeritrocítico asexual, y reprime la traducción en el citoplasma posteriormente en el ciclo, además puede tener un papel regulatorio durante el ciclo sexual (gametocito) (Dixit *et al.*, 2010), asimismo LaCount *et al.* (2005) sugieren que PfCLK4 puede interactuar con otra quinasa, PfMAPK1 (PF3D7_1431500). PfCLK4 al igual que PfCLK1 cumplen papeles en la regulación génica en cepas resistentes, cabe resaltar que PfCLK4 se encuentra sobreexpresada en cepas resistentes mientras que PfCLK1 subexpresada.

PfCDPK5 (quinasa 5 dependiente de calcio) pertenece a una clase de proteínas solo vistas en plantas y Apicomplejos, las quinasas dependientes de calcio, de ellas PfCDPK5 es probablemente la más estudiada. Por su parte Dvorin *et al.* (2010) demostraron que PfCDPK5 es necesaria para el surgimiento de los merozoítos desde los eritrocitos infectados y que en parásitos deficientes de PfCDPK5 se veía un arresto en el esquizonte tardío, es decir, no surgían los merozoítos del glóbulo rojo infectado. Posteriormente Absalon *et al.* (2018) encuentran que PfCDPK5 se colocaliza con los micronemas del parásito, organelos especializados en la segregación de proteínas necesarias para el egreso de los merozoítos en el esquizonte tardío, y la prueban cooperación entre PfCDPK5 con la quinasa (PKG) dependiente de Guanosina monofosfato cíclico (GMPc), la cooperación entre ambas quinasas también había sido reportada por Dvorin *et al.* (2010), no obstante Absalon *et al.* también encuentran que la

sobreexpresión de PfPKG permite remediar la deficiencia de PfCDPK5 en cepas mutantes, lo que sugiere una redundancia funcional. Un trabajo reciente de Blomqvist *et al.* (2020) evalúa el fosfoproteoma (la fosforilación de todas las proteínas del parásito) en el esquizonte tardío de *P. falciparum* y encuentran que la deficiencia de PfCDPK5 produce una reducción en la fosforilación de 58 sitios en 50 proteínas diferentes. Estos investigadores hallan que una de las proteínas que posiblemente se ve fosforilada por PfCDPK5 es PfNPT1 (transportador novedoso 1, PF3D7_0104800) un posible transportador específico de los Apicomplejos. En los datos de transcriptómica PfCDPK5 y PfNPT1 se encuentran correlacionados negativamente con las cepas resistentes, esto podría sugerir que existe un arresto del estadio esquizonte tardío, el efecto que pudiera tener esto sobre la resistencia a la artemisinina es difícil de dilucidar, por una parte la droga mata al parásito principalmente en el estadio trofozoíto así que, *a priori*, alargar el estadio de esquizonte tardío quizás no mejora la supervivencia del parásito, sin embargo retener los merozoítos dentro del esquizonte hasta que disminuya la concentración de la droga en sangre pudiese evitar los efectos de la droga en los nuevos anillos que se forman una vez los merozoítos infectan otros glóbulos rojos, una posible explicación para la reducción de PfCDPK5. Hay que agregar que PfCDPK5 puede tener otras funciones en otros estadios del parásito que si puedan asociarse claramente con la resistencia a la artemisinina, quizás también ralenticen el ciclo celular en estos otros estadios. Hay que destacar que el arresto de los merozoítos en el esquizonte sería un proceso diferente al estado de latencia que han reportado otros investigadores, ya que dicho estado ocurre al inicio del ciclo intraeritrocítico, en el anillo, la deficiencia de PfCDPK5 produciría un retraso en el ciclo celular a nivel de esquizonte, que como hemos discutido, puede ser beneficioso para evitar los efectos de la droga.

PfCDPK1 (PF3D7_0217500) es una quinasa esencial que no se encuentra entre las que presentan cambios de expresión, sin embargo, la proteína RKIP (PF3D7_1219700) se halla correlacionada positivamente y se ha probado que puede regular la fosforilación de PfCDPK1 ya sea actuando como sustrato o promoviendo la autofosforilación en la quinasa (Kugelschadt *et al.*, 2007). PfCDPK1 se ha asociado con procesos como la invasión del eritrocito en *P. falciparum* y también interactúa con las quinasas dependientes de AMPc (PKA) lo que muestra una relación entre la señalización dependiente de Ca^{+2} y de AMPc.

PfPK9 es bastante particular pues no se puede agrupar en ninguna clase de las quinasas vistas en eucariotas, se ubica en la base de las quinasas dependientes de calcio (CDPK) antes descritas, pero no forma parte de este grupo (Philip y Haystead, 2007). Esta proteína se comienza a expresar durante el ciclo intraeritrocítico en el anillo tardío y su máximo se observa en el esquizonte, su ubicación también cambia dependiendo del estadio; en la membrana de la vesícula parasítica durante el anillo y en la

membrana plasmática del parásito durante el esquizonte, lo que sugiere una regulación espacial de la proteína y hasta ahora solo se ha probado que interactúa con PfUBC13 que actúa en la ubiquitinación de proteínas, asociada con procesos como la reparación de DNA, progresión mitótica, entre otros (Philip y Haystead, 2007). En los datos de transcriptómica PfPK9 tiene una correlación negativa con cepas resistentes y podría significar que en estas cepas hay una reducción en la ubiquitinación de proteínas en base a lo ya mencionado.

Las quinasas no esenciales con la expresión alterada en cepas resistentes posiblemente cumplan un rol en la tolerancia al efecto de la droga en el parásito. PfeIK2 es una de las 3 quinasas involucradas en la fosforilación del factor de transcripción eIF2 α , otra de ellas ya ha sido mencionada (Sección 1.4.2) PK4, relacionada directamente con la dormancia vista en cepas resistentes (Zhang *et al.*, 2017). PfeIK2 es necesaria para la fosforilación de eIF2 α en ausencia de aminoácidos, y es posible que no sea esencial debido a que *P. falciparum* compensa su función empleando otras proteínas ya que en cepas mutadas sin PfeIK2 el parásito completa todos los estadios de su ciclo de vida sin diferencias apreciables en su crecimiento con respecto a cepas salvajes (Fennell *et al.*, 2009). Se ha probado que la resistencia a la artemisinina puede producir deficiencia en la obtención de aminoácidos en *P. falciparum* (Bunditvorapoom *et al.*, 2018), surge la posibilidad de que una reducción en PfeIK2 en parásitos con mayor tolerancia a la artemisinina inhiba la respuesta al estrés producido por deficiencias de aminoácidos, es necesario estudiar qué efecto tiene la deficiencia de PfeIK2 cuando se aplica la artemisinina para poder dilucidar su posible papel en la resistencia contra la droga.

Las siguientes quinasas; PfNEK4 y PfCDPK4, se pueden asociar con el desarrollo sexual del parásito. PfNEK4 (quinasa 2 relacionada con NIMA) pertenece a una familia de quinasas que actúan en la meiosis (el acrónimo NIMA proviene de *Never in mitosis /Aspergillus*), y es altamente expresada en gametocitos pese a no ser indispensable para la formación de gametos en *P. berghei*, no obstante es necesaria para la formación del ooquinetto (Reininger *et al.*, 2005). PfCDPK4 pertenece a la misma familia que PfCDPK5 (ya mencionada), promueve junto con un aumento en el Ca⁺² citosólico la diferenciación del gametocito en el gameto masculino en *P. berghei* (Billker *et al.*, 2004) y se ha profundizado más en este aspecto pudiendo asociar a PfCDPK4 con 3 procesos esenciales para la transformación del microgametocito haploide en el microgametocito con 8 flagelos, también en *P. berghei* (Fang *et al.*, 2017). En los datos de transcriptómica PfNEK4 y PfCDPK4 se encuentran correlacionadas positivamente, lo que podría significar un aumento en la diferenciación de gametos, sin embargo, ya que los estudios de estas quinasas no han sido realizados durante el ciclo asexual intraeritrocítico, sería difícil concluir qué función cumplen en la resistencia, es posible que además de su

importancia para el desarrollo de distintos estadios sexuales también cumplan un papel durante el desarrollo asexual.

La última quinasa dispensable que tiene su expresión reducida en cepas resistentes (PF3D7_0715300) no ha sido estudiada hasta la fecha.

El hecho de que en cepas resistentes varias quinasas importantes implicadas en la regulación del ciclo de vida de *P. falciparum* se encuentren sobreexpresadas o subexpresadas muestra que la tolerancia a la artemisinina produce una compleja red de fosforilaciones en distintas proteínas a fin de producir cambios en la fisiología del parásito en presencia de la droga. De todas ellas, resaltamos que la deficiencia de PfCDPK5 puede indicar un retardo final del ciclo de vida dentro del intraeritrocítico.

7.2.4 Metabolismo de lípidos en la resistencia

Los lípidos son macromoléculas indispensables para todos los organismos conocidos y participan en la formación de membranas, señalización celular y otros procesos imprescindibles. *P. falciparum* obtiene la mayoría de los lípidos que necesita modificando ácidos grasos que obtiene del suero sanguíneo durante el ciclo intraeritrocítico y aunque el parásito tiene la maquinaria enzimática para producir ácidos grasos *de novo* en el apicoplasto, este proceso es dispensable dentro del eritrocito (Vaughan *et al.*, 2009).

En el modelo propuesto (**Figura 21**) se plantean varios cambios importantes en el metabolismo de los lípidos, que involucran una reducción en la producción de membrana y un posible aumento en cardiolipina, comúnmente encontrada en la membrana interna mitocondrial, lo que sugiere un aumento en el transporte que ocurre a través de esta membrana.

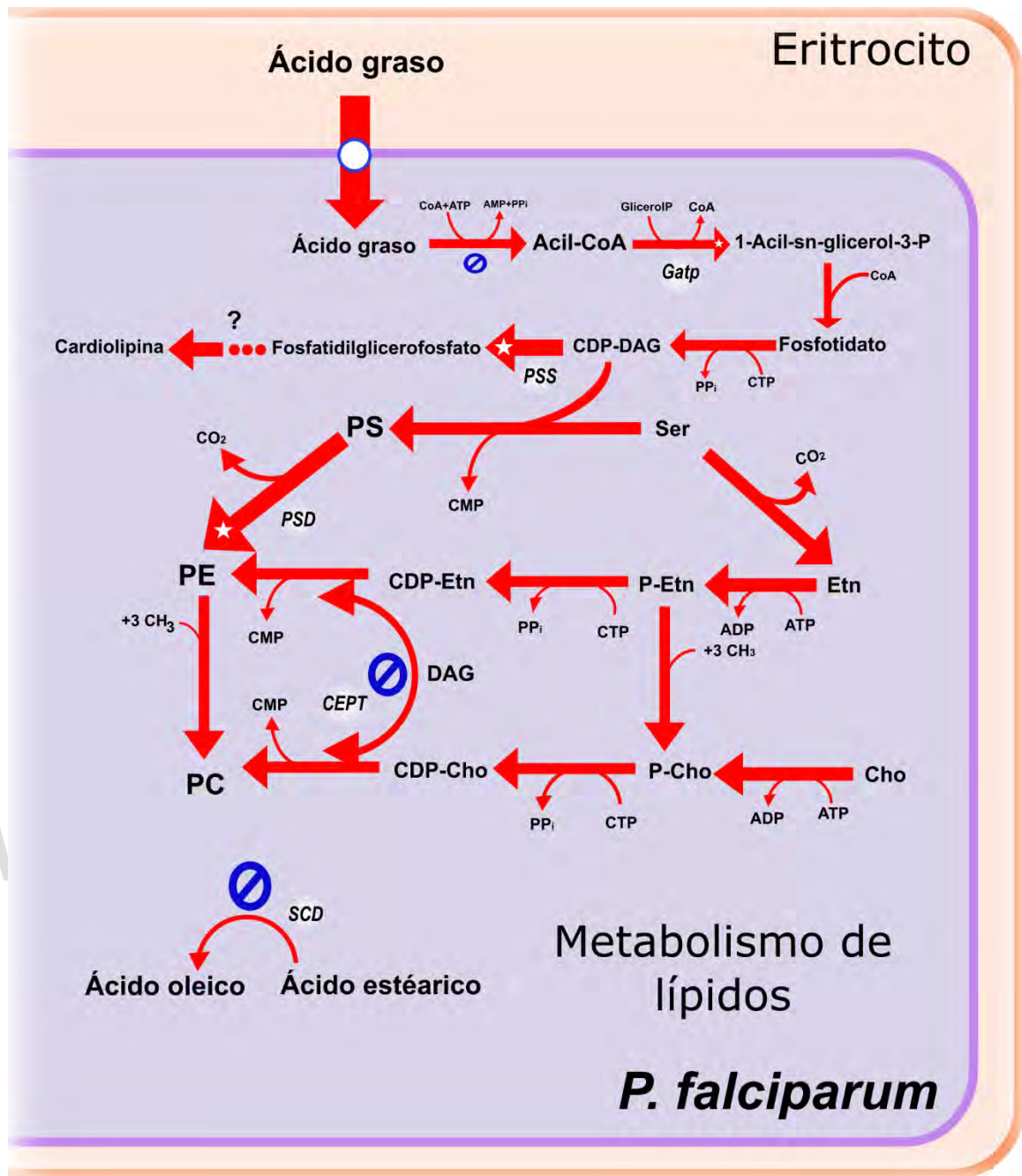


Figura 21 Cambios en el metabolismo de lípidos propuesto para cepas resistentes de *P. falciparum* a la artemisinina. Se muestran los nombres abreviados de las enzimas correlacionadas positiva y negativamente con la resistencia a la artemisinina según los datos de Mok et al. (2015)

Las cadenas de ácidos grasos deben ser activadas con la Coenzima A (CoA) para poder ser usadas por el parásito, labor llevada a cabo por varias acil-CoA sintetas (ACS) que codifican en el genoma de *P. falciparum* (Matesanz et al., 2003; Bethke et al., 2006), de todas ellas al menos dos se encuentran correlacionadas negativamente en cepas resistentes; PfACS2 (PF3D7_0301000) y PfACS5 (PF3D7_0731600), no obstante el parásito tiene varias otras enzimas de este tipo sin cambios en la expresión en cepas resistentes.

El ácido oleico es producido en el RE a base de ácido esteárico por la esteroil-CoA desaturasa (SCD, PF3D7_0511200), y es empleado por *P. falciparum* para la fabricación de lípidos indispensables para su desarrollo en el ciclo intraeritrocítico incluyendo fosfolípidos y lípidos neutrales, más aún, la inhibición de la SCD mediante drogas es perjudicial para el desarrollo del parásito (Gratraud *et al.*, 2009). La SCD se encuentra correlacionada negativamente en los datos de transcriptómica (**Figura 21**), lo que sugiere que en cepas resistentes hay una inhibición en la producción del ácido oleico (18:1), pudiendo indicar una reducción en la formación de membrana en cepas resistentes.

Como ya se mencionó en eritrocitos infectados la mayor proporción de lípidos se encuentra de forma de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), el ácido oleico se encuentra principalmente en la fosfatidilcolina (16:0-18:1) y fosfatidilserina (16:0-18:1) que en glóbulos rojos infectados representan el 32 y 11% del total de PC y PS (Wein *et al.*, 2018). Tomando en cuenta el alto porcentaje de PC que produce el parásito y siendo esta la más abundante, una reducción en el suministro del ácido oleico probablemente abarque una reducción en la producción de membrana. La mayor producción de ácido oleico se ve durante el esquizonte, donde el parásito requiere la mayor síntesis de membrana para formar los merozoítos que surgirán una vez colapse el eritrocito (Gratraud *et al.*, 2009), en cepas resistentes se requeriría más tiempo para poder sintetizar los lípidos de los merozoítos en vista a que la enzima que produce el ácido oleico está subexpresada.

Por otro lado, tres posibles lisofosfolipasas (PF3D7_1401500, PF3D7_1476700 y PF3D7_0936700) que podrían estar implicadas en la degradación de lípidos se encuentran correlacionadas positivamente con la resistencia a la artemisinina, hecho que podría indicar una reducción en la producción de lípidos. De estas ninguna ha sido estudiada a fondo, sin embargo, todas tienen similitud con PfPARE (PF3D7_0709700) que al estar mutada puede generar resistencia a la pepstatina, un inhibidor de las aspartil proteasas (Tewari *et al.*, 2020). Sería necesario caracterizar cada una de estas enzimas para medir su efecto en la degradación de lípidos, cabe resaltar que en la resistencia PfPARE está correlacionada negativamente y sus 3 homólogos positivamente.

Otra enzima no caracterizada posiblemente implicada en la elongación de ácidos grasos (PF3D7_0605900) también se encuentra correlacionada negativamente en las cepas resistentes.

Por último, la colina/etanolamina fosfotransferasa (CEPT, PF3D7_0628300) se encuentra correlacionada negativamente con las cepas resistentes, esta enzima permite la transformación de CDP-colina y CDP-etanolamina en fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), respectivamente (**Figura 21**), y es fundamental para las rutas Kennedy de la síntesis de fosfolípidos en *Plasmodium*

(Dechamps *et al.*, 2010). Ya que la CEPT realiza un paso primordial para la producción de los dos fosfolípidos más abundantes en el parásito, PC y PE, una reducción en su expresión durante el ciclo intraeritrocítico se puede asociar con una reducción general en los lípidos de membrana PC y PE, lo que concuerda con lo antes planteado para la SDC, también subexpresada.

Entre las proteínas correlacionadas positivamente se encuentra la fosfatidilserina descarboxilasa (PSD, PF3D7_0927900) que permite la transformación de fosfatidilserina (PS) en fosfatidiletanolamina. *P. falciparum* puede producir fosfatidiletanolamina por dos vías; a partir de CDP-etanolamina (donde actúa la enzima CEPT ya mencionada) o mediante la descarboxilación de fosfatidilserina, esta última es de vital importancia para el parásito, y es probable que origine formas de PE que no pueden ser producidas por la otra vía (Choi *et al.*, 2016) cabe resaltar que la PE es el segundo fosfolípido más abundante en *P. falciparum* durante el ciclo intraeritrocítico (Wein *et al.*, 2018). PSD podría estar sobreexpresada para reestablecer un poco los niveles de PE, que ya son bajos en cepas resistentes debido a la disminución de CEPT

Como ya se mencionó, la reducción en el ácido Oleico, PE y PC en cepas resistentes son un buen indicio de una reducción en la producción de membrana, no obstante, algunas enzimas implicadas directamente en la producción de lípidos se encuentran correlacionadas positivamente con las cepas resistentes, lo que sugiere que hay lípidos indispensables para tolerar los efectos de la droga. La primera de ellas es la Glicerol-3-fosfato 1-O-aciltransferasa (Gatp, PF3D7_1212500) que realiza el primer paso para la producción de fosfolípidos (**Figura 21**), la acilación del glicerol-3-fosfato, y se encuentra en la membrana del RE. Otra enzima sobreexpresada es la fosfatidilglicerofosfato sintasa (PSS, PF3D7_0820200) que transforma el CDP-diacilglicerol en fosfatidilglicerofosfato. La Gatp y PSS de *P. falciparum* no han sido estudiadas a fondo, sin embargo, ambas intervienen en la síntesis de cardiolipina según la información mostrada en PlasmoDB y MPMP, esta ruta metabólica no se ha esclarecido del todo en *P. falciparum* pero existe evidencia de que hay un aumento en la cardiolipina en los eritrocitos infectados por el parásito (Botté *et al.*, 2013). La cardiolipina se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial (Paradies *et al.*, 2019), así que un aumento en la expresión de la Gatp y PSS puede indicar que mantener la membrana mitocondrial es necesario para tolerar los efectos de la droga en el parásito. La cardiolipina ayuda a estabilizar muchas proteínas y complejos proteicos de la matriz mitocondrial, y también podría verse implicada en la topología misma de la membrana (Schlame y Ren, 2009). El estudio realizado por Nozawa *et al.* (2020) podría arrojar algo de luz sobre el papel de la cardiolipina en *P. falciparum*, estos investigadores evaluaron varios transportadores mitocondriales (MC) del parásito y encontraron que en 4 de los 5 MC evaluados (PfAAC1, PfAAC2, PfDTC y PfPiC)

hay un aumento en el transporte cuando las membranas de los liposomas tienen una mayor cantidad de cardiolipina. En la sección 0 se explicó que hay dos transportadores mitocondriales muy importantes para el modelo metabólico planteado para cepas resistentes, PfDTC de malato/ α -cetoglutarato y PF3D7_1223800 de citrato/ α -cetoglutarato. PfDTC fue uno de los transportadores evaluados por Nozawa *et al.* (2020) y mostró un aumento en la tasa de transporte cuando se elevaba la concentración de cardiolipina, es posible que en las cepas resistentes a pesar de que PfDTC no muestre cambios en la expresión (Mok *et al.*, 2015), un aumento en la cantidad de cardiolipina en la membrana mitocondrial estimule el flujo de metabolitos a través de PfDTC. El transportador de citrato/ α -cetoglutarato no fue evaluado por los investigadores mencionados, no obstante, también podría verse estimulado por la cardiolipina, y además tiene mayor expresión en las cepas resistentes a la artemisinina (Mok *et al.*, 2015). Todo ya mencionado concuerda con el modelo planteado en la sección 0 y es una explicación plausible a porqué algunas enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos se encuentran correlacionadas positivamente con la resistencia a la artemisinina. Hay que agregar que otro transportador mitocondrial que aún no se ha estudiado (PF3D7_0905200) también se encuentra correlacionado positivamente con la resistencia a la artemisinina.

7.2.5 **Varias formas de generar resistencia a la artemisinina por el parásito**

La resistencia a la artemisinina puede involucrar varios mecanismos, uno de ellos es la adquisición y digestión de hemoglobina que cumple un papel fundamental en el desarrollo de *P. falciparum* y de hecho hay al menos 4 rutas que le permiten al parásito la obtención de esta proteína, algunas dependientes de actina (Elliott *et al.*, 2008).

Se ha probado que la actividad de la artemisinina en *P. falciparum* es dependiente de la digestión de hemoglobina por el parásito, en primer lugar por los experimentos realizados por Klonis *et al.* (2011), a parte se ha probado que la droga se activa mediante hierro o grupos hemo (Xie *et al.*, 2016) y también que la producción de grupos hemo *de novo* en el ciclo intraeritrocítico es dispensable (Goldberg y Sigala, 2017), esta evidencia sugiere que en el ciclo intraeritrocítico la mayoría de la artemisinina que se activa se debe a la digestión de hemoglobina por el parásito y el hecho de que los estadios trofozoíto y esquizonte sean más susceptibles a la droga también lo corrobora (en estos estadios la digestión de hemoglobina es mayor que en el estadio de anillo) (Elliott *et al.*, 2008).

Wilairat *et al.* (2016) proponen que el surgimiento de cepas con mayor tolerancia a la artemisinina, medido en un tiempo mayor para eliminar el parásito de la sangre, puede ser un proceso de convergencia evolutiva. El parásito se encuentra sometido a un estrés por la droga que puede tolerar de diferentes

maneras, lo que concuerda con que las mutaciones en la proteína PfKelch 13 no son el único marcador genético de cepas resistentes, de hecho otros genes pueden producir cepas con mayor tolerancia a la droga (Mukherjee *et al.*, 2017; Demas *et al.*, 2018; Rocamora *et al.*, 2018). En este contexto hay que agregar que existen diferencias genéticas entre cepas de *P. falciparum* y al someterse al estrés que produce la artemisinina pueden responder de maneras muy diferentes, este hecho puede verificarse si se comparan cepas resistentes obtenidas en laboratorio partiendo de cepas distintas. Cui *et al.* (2012) parten de cepas Dd2 (obtenidas del sudeste asiático por primera vez) para producir resistencia a la artemisinina *in vitro*, mientras que Rocamora *et al.* (2018) emplearon la cepa 3D7 proveniente de África. En ambos trabajos se obtienen aumentos drásticos en la tolerancia a la artemisinina respecto a las cepas sensibles iniciales, y ambos obtienen un aumento en la respuesta al estrés oxidativo. Sin embargo, existen diferencias en las resistencias generadas, por ejemplo en la amplificación del número de copias para el gen *pfmdr1* y aumento en la tolerancia a muchas otras drogas en el trabajo de Cui *et al.* pero no en el de Rocamora *et al.*.

P. falciparum al parecer puede aumentar su tolerancia a la artemisinina haciendo uso de diferentes mecanismos que impliquen al menos tres procesos fisiológicos: reducción en el importe y digestión de Hb, aumento de la respuesta al estrés oxidativo y retardo del ciclo celular (dormancia). El parásito puede producir estas respuestas fisiológicas por diferentes medios, hecho que no extraña si tomamos en cuenta su redundancia metabólica para diferentes rutas.

De la digestión de hemoglobina la evidencia es bastante robusta, de hecho, el papel de la proteína más usada como marcador para la resistencia a la artemisinina, PfKelch 13, es la de regular la formación de las vesículas de 170nm similares a citostomos que permiten al parásito tomar hemoglobina del medio externo a la vacuola parasítica, una proteína PfKelch13 mutada hace menos eficiente el proceso de formación de vesículas, nótese que en este proceso se encuentran implicadas muchas otras proteínas (Birnbbaum *et al.*, 2020; Gnadig *et al.*, 2020). Por otra parte, se ha probado *in silico* que varias de las mutaciones en PfKelch 13 pueden desestabilizar la estructura β -propeller del dominio Kelch y que el grado de desestabilización podría asociarse con la tolerancia a la artemisinina (He *et al.*, 2019) posiblemente por lo ya mencionado. Otras proteínas asociadas con el proceso de vesiculación al estar mutadas producen un aumento en la tolerancia a la artemisinina, como es el caso de la coronina (PF3D7_1251200), una proteína que interactúa con actina y se encontró mutada luego de 4 años de presión *in vitro* con artemisinina en cepas de *P. falciparum* que además no presentaron mutación en la proteína PfKelch13 (Demas *et al.*, 2018), la coronina mutada posiblemente afecte el tráfico vesicular, lo haga menos eficiente y produzca una reducción en la digestión de hemoglobina neta producida por el

parásito. Ahora bien en la transcriptómica de cepas resistentes (Mok *et al.*, 2015) la coronina se encuentra correlacionada negativamente con la resistencia, es posible que una reducción en la cantidad de proteína pueda contribuir a la tolerancia a la artemisinina al igual que una coronina mutada como en el trabajo mencionado, queda por esclarecerse en qué caso aumenta más la tolerancia a la droga, cuestión que requeriría evidencia experimental para solucionarse. Otra proteína implicada en el importe de hemoglobina es Rab5a (PF3D7_0211200) que posiblemente regula parte del proceso de toma y transporte de hemoglobina (Elliott *et al.*, 2008), en los datos de transcriptómica esta proteína también se encuentra correlacionada negativamente, lo que también sugiere un cambio en la toma y transporte de Hb respecto a parásitos sensibles, posiblemente una reducción.

En cuanto a la tolerancia al estrés oxidativo es posible que el parásito este aumentando la producción de GSH como ya se mencionó y también existe un aumento en varias enzimas como varias tioredoxinas y glioxilasas (**Figura 18**) la propuesta del ciclo de Krebs truncado también sugiere un aumento en la respuesta al estrés oxidativo por parte del parásito.

Sobre el periodo de latencia, la evidencia más reciente encuentra que se ve producido por la fosforilación de la subunidad α del factor de iniciación 2 de eucariotas (eIF2 α) mediante la quinasa PK4 (Zhang *et al.*, 2017), la latencia no solo es producida por la droga, en otras condiciones de estrés como ausencia de isoleucina también se puede ver este retraso en el ciclo celular (Babbitt *et al.*, 2012) y solo ocurre si el amino ácido se encuentra ausente antes de que ocurra la esquizogonia en el ciclo intraeritrocítico (McLean y Jacobs-Lorena, 2020). En los datos provistos por Mok *et al.* (2015) no hay diferencias en el factor de transcripción eIF2 α ni en la PK4, sería difícil determinar si eso afecta o no la capacidad que tienen estas cepas de entrar en latencia. Por otro lado, es posible que la reducción en el AMPc antes mencionada pueda asociarse con un retardo en el ciclo celular.

Con lo dicho varios de los genes que mostraron estos investigadores podrían estar directamente relacionados con una reducción en la digestión de hemoglobina, el estrés oxidativo y cambios en la velocidad del ciclo celular, estos procesos hay que agregarles el aumento en la reparación y plegamiento de proteínas reportados inicialmente por dichos investigadores (Mok *et al.*, 2015).

La resistencia a la artemisinina abarca muchos aspectos del parásito y contempla mecanismos para evadir los efectos de la droga, como la reducción en la digestión de Hb, y mecanismos para tolerar dichos efectos, como la respuesta al estrés oxidativo, es probable que la resistencia multifacética sea fruto de la marcada promiscuidad de la artemisinina una vez es activada por grupos hemo o hierro, que le permite a la droga, afectar al parásito en muchos niveles. Ante esta situación los parásitos sobreviven mediante los

mecanismos ya presentes en su material genético que varía dependiendo de la cepa y si el tiempo de exposición dura lo suficiente, desarrollan nuevos mecanismos como los vistos en varias de las cepas obtenidas *in vitro* luego de años de presión con la artemisinina, pero que todavía no se ven *in vivo* probablemente debido a una reducción en el *fitness* de estas cepas resistentes por la poca obtención de amino aminoácidos (Bunditvorapoom *et al.*, 2018), o porque sencillamente invierten más energía en tolerar la droga que en el crecimiento y división celular.

Los datos de transcriptómica involucran muchos mecanismos, y en el presente trabajo se ha indagado en varios, lo que contribuye a esclarecer un poco toda la trama metabólica que permite a *P. falciparum* de muchas maneras, resistir los efectos de la droga. Entender todos estos mecanismos es de vital importancia pues permiten reformular los tratamientos ya sea empleando nuevas drogas o cambiando las combinaciones de las actuales, y permite estar preparados para un escenario donde surjan cepas resistentes de *P. falciparum* que no muestren diferencias en el *fitness* respecto a cepas sensibles, si esto ocurre, la resistencia a la artemisinina podría expandirse rápidamente fuera del sudeste asiático, un escenario que podría poner en riesgo la vida de millones de personas.

7.3 Modelado de un posible transportador de citrato/ α -cetoglutarato mitocondrial de *P. falciparum*

Los transportadores mitocondriales (*mitochondrial carriers*) permiten el intercambio de moléculas pequeñas como metabolitos, iones inorgánicos, nucleótidos y cofactores entre la mitocondria y el citoplasma (Kunji y Crichton, 2010). En el ser humano hay más de 50 transportadores de esta clase, muchos aún no caracterizados (Taylor, 2017), en *P. falciparum* se han identificado 9 (Nozawa *et al.*, 2011), la mayoría solo por herramientas bioinformáticas, de estos PfDTC (el transportador de dicarboxilato-tricarboxilato) ha sido el mejor caracterizado (Nozawa *et al.*, 2011) y ya ha sido mencionado en la sección 0, es el encargado del intercambio de malato por α -cetoglutarato en el modelo metabólico (**Figura 10**). Nozawa *et al.* (2020) en un estudio reciente analizan *in vitro* el efecto de la cardiolipina en los transportadores mitocondriales de *P. falciparum*, la importancia de este estudio para el modelo la hemos resaltado en la sección 7.2.4, los dos trabajos de Nozawa *et al.* (2011 y 2020) son de las pocas determinaciones en laboratorio que se han realizado hasta la fecha para los transportadores mitocondriales de *P. falciparum*, lo que muestra una falta de conocimiento sobre este aspecto del parásito.

A fin de entender mejor los resultados obtenidos para PfCOCP es necesario explicar dos generalidades de los transportadores mitocondriales, para ello se usará la **Figura 22**. La primera es que

cuando el transportador se encuentra en el estado M (abierto a la matriz), el lado citosólico se halla cerrado por el acercamiento de las hélices pares (**Figura 22 B**), y cuando está en el estado C (abierto al citosol), sucede el acercamiento de las hélices impares del lado de la matriz (**Figura 22 A**), es decir, la proteína solo puede abrirse hacia uno de los dos compartimientos y cuando esto ocurre la región cercana al compartimento opuesto se cierra por el acercamiento de 3 de las hélices (Robinson *et al.*, 2008; Ruprecht *et al.*, 2019; Ruprecht y Kunji, 2019a). La segunda generalidad es que el sitio de unión al sustrato es debe ser el mismo para las dos conformaciones del transportador (**Figura 22**), esto se debe a que el sustrato sirve de fulcro para el movimiento de los 6 segmentos transmembranales y debido a la pseudo simetría de la proteína el sitio de unión se encuentra en el centro del transportador aproximadamente en la mitad de la membrana, estabilizado por la interacción con las hélices H2, H4 y H6, que contienen 3 sitios de unión con el sustrato nombrados I, II y III, respectivamente (Robinson *et al.*, 2008).

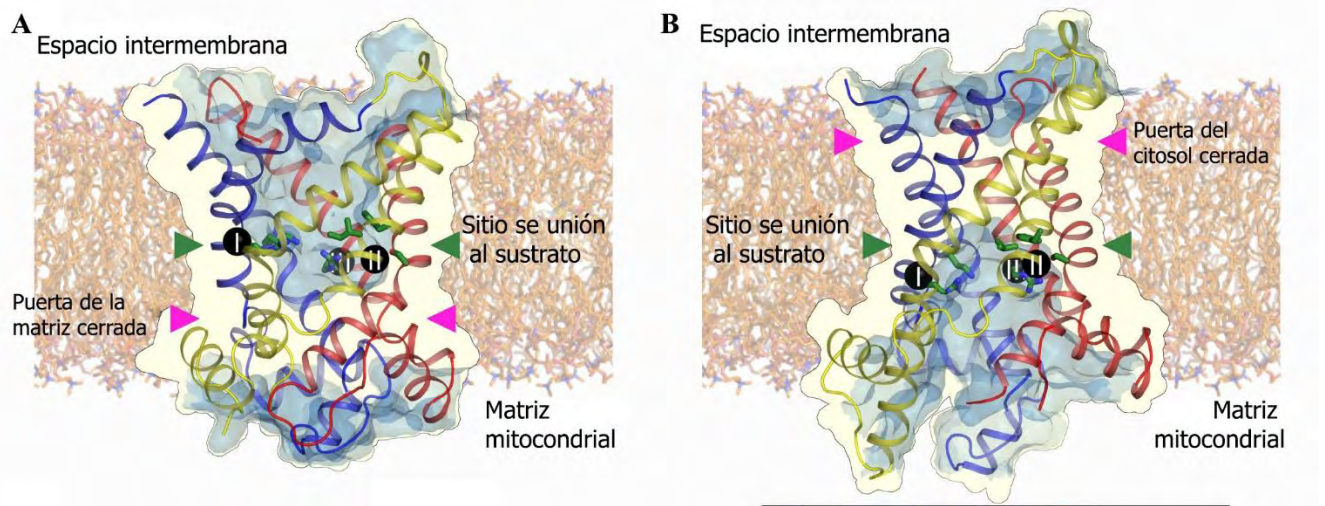


Figura 22 A Transportador de ADP/ATP (PDB: 4C9H) de *S. cerevisiae* en la conformación C. **B** Transportador de ATP/ADP (PDB:6GCI) de *Thermothelomyces thermophila* en la conformación M. Se señala el sitio de unión con el sustrato en flechas verdes y las puertas citoplasmáticas y de la matriz en flechas moradas, la superficie accesible para el agua se resalta en azul pálido. Extraído de Ruprecht y Kunji (2019a).

Con estas ideas descritas se pueden evaluar los análisis bioinformáticos realizados en PfCOCP. Los acoplamientos moleculares realizados con la conformación M (**Figura 14 B y D**) muestran la interacción con los residuos Lys 67, Arg 151, Gln 152 y Arg 159, pero aparece otro residuo que no estaba interactuando en la conformación C, Arg 262, y esto podría producir cambios drásticos en la eficiencia del transporte entre una conformación y la otra, hecho que se ve claramente en la **Figura 15** donde se compara el sitio de unión con el sustrato en las dos conformaciones de la proteína, y se ve que en el estado M el sustrato queda centrado en el interior del transportador. Cuando tomamos en cuenta qué

residuos interactúan con el sustrato esto se vuelve mucho más evidente (**Figura 16**); en el estado C la Lys 67 pertenece al segmento H2 y la Arg 151,159 y Gln 152 pertenecen al segmento H4, no hay ningún residuo del segmento H6 en los acoplamientos, por otro lado en el estado M aparece la Arg 262 interactuando con el sustrato, este residuo se encuentra en el segmento H6, y concuerda con la forma que se ha descrito para el funcionamiento de los transportadores mitocondriales, que involucra la interacción con los sitios I, II y III de unión con el sustrato en los segmentos H2, H4 y H6, respectivamente (Robinson y Kunji, 2006).

En concordancia con un transporte más eficiente en el estado M respecto al C, se encontró que la diferencia en la energía libre de Gibbs(ΔG) de los acoplamientos moleculares con citrato y α -cetoglutarato era menor en ambos casos para el estado M (**Tabla 4** en la sección de **ANEXOS**), esto muestra que se requiere menos energía para que el sustrato alcance el sitio de unión si el transportador está en el estado M respecto al C. Hay que resaltar que las concentraciones de los sustratos en ambos compartimientos (dentro y fuera de la mitocondria) son las principales responsables de que el transporte ocurra en uno u otro sentido, y lo que se ha propuesto es un aumento en el citrato y α -cetoglutarato dentro de la mitocondria, es decir, una alta concentración de estos metabolitos promueve el transporte hacia el citosol. Ahora bien, el citrato y α -cetoglutarato citosólico deben ser consumidos rápidamente para mantener el transporte desde la matriz al citosol, y para este aspecto ya hemos propuesto que ambos compuestos terminan formando glutatión que el parásito usa para tolerar el estrés oxidativo, una vez oxidado el glutatión será exportado hacia el eritrocito (sección 0). La evidencia obtenida de los acoplamientos sumada a el modelo que hemos construido en base a evidencia experimental disponible en la literatura sustenta que PfCOCP transporta citrato hacia el citosol de *P. falciparum* en cepas resistentes a la artemisinina.

Hay que resaltar la existencia moléculas que ayudan a estabilizar los transportadores mitocondriales que no fueron tomados en cuenta para realizar el modelado, específicamente la cardiolipina, un lípido comúnmente encontrado en la mitocondria e importante para estabilizar la estructura de estos transportadores, de hecho en la estructura resuelta por Ruprecht *et al.* (2019) hay varias cardiolipinas interactuando con el transportador. La posible interacción con la cardiolipina también ha sido estudiada en *P. falciparum* en el trabajo de Nozawa *et al.* (2020) que reportan un aumento en la velocidad de transporte en varios *carriers* mitocondriales del parásito cuando la concentración de cardiolipina era mayor en liposomas.

Varios de los motivos comunes para los transportadores mitocondriales fueron encontrados en la secuencia de PfCOCP (**Figura 16**). [PS] $\times$ [DE] $\times$ [RK] fue localizado en H1 (**PLEvwK**) y en H5(**PfDVVR**), mientras que en H3 los residuos PCTFFI podrían estar cumpliendo su papel ya que no se encontró el motivo, por otro lado este patrón se ve bien conservado entre las diferentes especies de *Plasmodium* (**Anexo 3**), parte de su importancia es que la prolina permite la torsión de las hélices para que la proteína permanezca cerrada por el lado de la matriz cuando está en la conformación C (Ruprecht y Kunji, 2019a). Por otro lado, los motivos [FY][DE] $\times$ [RK] no pudieron ser identificados claramente en las hélices pares y es probable que otros residuos cumplan su papel. Estos patrones en hélices pares y los ya mencionados para las impares permiten la estabilización de las regiones de la proteína que se cierran en cada conformación, [PS] $\times$ [DE] $\times$ [RK] $\times$ xxxQ (con la Q añadida) se denomina abrazadera de glutamina (*glutamine brace* o *Q brace*) y en los transportadores mitocondriales hay de una a tres abrazaderas Q (Ruprecht y Kunji, 2019a), en PfCOCP se pudo identificar una en H5 (**PfDVVRVYMQ**, **Figura 16**). Los motivos [FY][DE] $\times$ [RK] se denominan abrazaderas de tirosina (*tyrosine brace* o *Y braces*) y al parecer no son tan conservados como las regiones [PS] $\times$ [DE] $\times$ [RK] (Ruprecht y Kunji, 2019a), esto concuerda con que no se hayan podido identificar claramente en PfCOCP.

Los patrones GxxxG y π xxx π también fueron hallados en PfCOCP (**Figura 16**). GxxxG se encontró en H3 (**GGACG**) y en H5 (**GIVGG**), pero no en H1 donde se existe la secuencia GSILH que quizás cumpla el mismo rol, no obstante, un cambio de glicina (G) por histidina (H) es bastante drástico en base al tamaño de los grupos funcionales. En cuanto al motivo π xxx π en los segmentos pares; en H2 está **GSKGV**, en H4 **TMWAS** y en H6 **TLFMV** (**Figura 16**). Los motivos que hemos propuesto en los casos donde el patrón no concuerda claramente con la literatura, GSILH en H1 y PCTFFI en H3, fueron basados en la ubicación cercana en las hélices respecto a los otros motivos de interés que sí pudieron ser identificados, para ello se utilizó UCSF Chimera 1.13.1.

Hemos demostrado que PfCOCP aparece bien conservada *Plasmodium spp.* (**Anexo 3**) en todos los dominios transmembranales, siendo la única diferencia resaltada un posible alargamiento de H1 en los parásitos que infectan a roedores (*P. berghei*, *P. chabaudi* y *P. yoelii*) y en *P. ovale*, también es posible que al realizar los modelados para la proteína de estos parásitos el segmento H1 tenga un tamaño comparable a las otras especies y el extremo C terminal tenga varios residuos adicionales que no forman ninguna estructura.

Cuando se evalúa la diversidad nucleotídica (**Anexo 4**) se observa que los segmentos transmembranales tienen poca diversidad mientras que la región que separa H4 de H5 tiene mayor

variabilidad. La diversidad nucleotídica (π) se define como el número promedio de diferencias en nucleótidos de dos secuencias de ADN seleccionadas al azar (Nei y Li, 1979) y se emplea para evaluar el grado de polimorfismo en una población, en este caso el grado de polimorfismo en la secuencia de la proteína de PfCOCP en *Plasmodium* spp.. Para profundizar más en la variabilidad de la proteína se calculó la D de Tajima (**Anexo 5**), este estadístico permite ver qué regiones podrían encontrarse bajo neutralidad (Tajima, 1989), la neutralidad plantea que un alto número de mutaciones se acumulan en el material genético por deriva génica y una importante consecuencia de esto es la acumulación de mutaciones a una tasa constante en las poblaciones, estas mutaciones no tienen un efecto en el *fitness* (adecuación o aptitud biológica) del organismo (Kimura, 1968). Se observa bastante variabilidad en el valor del estimador en la secuencia, donde resalta que los sitios de unión al sustrato (I,II y III) tienden a estar en zonas con una valor de $D < 0$, lo que indica que estos sitios están conservados y podría sugerir selección negativa, ya que hay pocos polimorfismos en estas regiones y de hecho en aminoácidos son casi idénticas (**Anexo 3**), esto concuerda con que estos residuos deben estar conservados para que la proteína pueda cumplir adecuadamente su función, por otro lado hay varias regiones de los segmentos transmembranales (en H1, H4, H5 y H6) que tienen valores $D > 0$, hecho que muestra la presencia de polimorfismos en estas zonas en las diferentes especies de *Plasmodium*, y la mayoría de los polimorfismos serían sustituciones sinónimas en vista a que en el alineamiento de las proteínas (**Anexo 3**) se ven pocos cambios en los residuos. Estas zonas llenas de sustituciones sinónimas también pueden indicar un proceso de selección, donde los codones deben codificar para los mismos aminoácidos a fin de conservar la función adecuada del transportador, como consecuencia las sustituciones no sinónimas podrían acumularse más lentamente en esta región. Hay varias zonas de la secuencia donde D tiende a cero lo que indica que se podrían encontrar bajo neutralidad.

Por último, se realizó un árbol filogenético (**Anexo 6**) con las mismas secuencias para evaluar si los cambios que se ven en cada especie concuerdan con la distancia evolutiva entre los distintos parásitos, para eso el árbol obtenido se compara con un árbol filogenético encontrado en la literatura para *Plasmodium* spp. (**Anexo 7**). El árbol obtenido muestra un grado alto de certeza en las separaciones de los principales clados de *Plasmodium* spp., de hecho, los nodos que tienen poca certeza (pintados en rojo en el **Anexo 6**) son aquellos donde se encuentran varias secuencias de la misma especie y es normal que el algoritmo tenga problemas separando de manera certera secuencias muy similares que pertenecen a la misma especie (caso de *P. falciparum* y *P. vivax*). *P. vivax* y *P. cynomolgi* se encuentran cercanos filogenéticamente (**Anexo 7**) y concuerda con el árbol que realizamos, *P. chabaudi*, *P. berghei* y *P. yoelii* infectan a roedores y su agrupación concuerda con la literatura. *P. falciparum*, *P. praefalciparum*, *P.*

reichenowi y *P. gaboni*, que infectan primates (subgénero *Laverania*) se agruparon también en concordancia con la literatura, esta evidencia muestra que las diferencias en PfCOCP en *Plasmodium spp.* concuerdan con la diversificación evolutiva de los grupos más cercanos de estos parásitos. No obstante, el árbol realizado no muestra las relaciones filogenéticas más lejanas; *P. knowlesi*, *P. malariae* y *P. ovale* deberían agruparse con la rama donde está *P. vivax* y *P. cynomolgi*, donde también deberían estar las tres especies que infectan roedores (**Anexo 7**). El árbol realizado no pretende mostrar las relaciones filogenéticas reales entre estos parásitos sino dar una idea de los cambios evolutivos que pudo tener la proteína PfCOCP y si concuerdan con las relaciones filogenéticas ya conocidas para el género o saber si la proteína, como otras de *Plasmodium spp.*, es altamente variable. La evidencia encontrada muestra que los segmentos transmembranales están bien conservados en *Plasmodium spp.* lo que sugiere que PfCOCP puede cumplir una función similar en cada especie, la función específica que le hemos asignado en base al modelo construido en este trabajo es la de proveer de citrato al citosol para transformarlo en α -cetoglutarato produciendo NADPH y tener la materia prima para producir Glutación, dos productos que permiten al parásito tolerar mejor el estrés oxidativo, estrés que no solo es producido por la artemisinina sino que probablemente siempre ha existido en algún momento del ciclo de vida de estos parásitos y con esto en mente la presencia de mecanismos anti estrés oxidativo en todo el género es un hecho plausible.

8 CONCLUSIONES

Las proteínas desconocidas pudieron asociarse con diferentes funciones; regulación del material genético, tráfico vesicular, cadena transportadora de electrones mitocondrial, entre otros. Funciones que esencialmente muestran que en la resistencia existen muchos cambios respecto a cepas sensibles, y que la mayoría de los genes desconocidos requieren de un mayor estudio para asociarse con dicha resistencia sin cometer ambigüedades, no obstante, este enfoque plantea el comienzo de muchos posibles estudios en estas proteínas.

Se pudo construir un modelo metabólico teórico que abarca varias de las rutas más importantes para el parásito, cuyas características son el aumento en la producción de glutatión y NADPH citosólico, ambos usados por el parásito para tolerar el estrés oxidativo producido por la droga. El modelo también plantea un letargo en la fase final del ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* debido a cambios en la concentración de Ca^{+2} citosólico, reducción de la formación de lípidos, y cambios en la expresión de varias quinasas implicadas en la regulación del ciclo celular. También las cepas resistentes parecen incorporar y digerir menos hemoglobina, hecho conseguido mediante distintos mecanismos presentes en estas cepas.

El Carrier COCP puede promover el aumento de las concentraciones de NADPH y glutatión en el citosol. En vista a su importancia, la proteína fue modelada mediante técnicas bioinformáticas y lo obtenido muestra a un transportador plausible de citrato y α -cetoglutarato desde la matriz mitocondrial hacia el citosol, pero no tan eficiente en sentido contrario. Analizamos la secuencia y los homólogos de este transportador en otras especies del género *Plasmodium*, hallando un alto grado de conservación en las regiones más importantes de la proteína, hecho que sugiere la importancia de este transportador para estos parásitos, posiblemente para tolerar el estrés oxidativo.

9 PERSPECTIVAS

De las proteínas desconocidas estudiadas recomendamos estudiar PF3D7_1022200, un posible transportador de folato que podría tener un papel importante para el parásito.

También, recomendamos caracterizar *in vitro* a PfCOCP con una metodología similar a la usada por Castegna *et al.* (2010) para estudiar la proteína homóloga en *S. cerevisiae* (YHM2), y además hacer un ensayo sometiendo a cepas sensibles y resistentes de *P. falciparum* con el transportador mutado o silenciado, también, aplicar artemisinina para evaluar qué efecto puede tener sobre la tolerancia a la droga.

10 REFERENCIAS

- 1 Absalon, S., Blomqvist, K., Rachel M. Rudlaff, DeLano, T. J., Pollastri, M. P., y Dvorina, J. D. (2018). Calcium-Dependent Protein Kinase 5 Is Required for Release of Egress-Specific Organelles in *Plasmodium falciparum*. *mBio*, 9, 16. doi:10.1128/mBio
- 2 Afonso, A., Hunt, P., Cheesman, S., Alves, A. C., Cunha, C. V., do Rosario, V., y Cravo, P. (2006). Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 50(2), 480-489. doi:10.1128/AAC.50.2.480-489.2006
- 3 Agarwal, S., Kern, S., Halbert, J., Przyborski, J. M., Baumeister, S., Dandekar, T., Doerig, C., y Pradel, G. (2011). Two nucleus-localized CDK-like kinases with crucial roles for malaria parasite erythrocytic replication are involved in phosphorylation of splicing factor. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(5), 1295-1310. doi:10.1002/jcb.23034
- 4 Agrawal, V., y Kishan, K. V. R. (2003). OB-fold: Growing Bigger with Functional Consistency. *Current Protein and Peptide Science*, 4, 195-206.
- 5 Alleva, L. M., y Kirk, K. (2001). Calcium regulation in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 117, 121-128.
- 6 Altschul, S. F., Madden, T. L., Sch  ffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- 7 Alves, E., Bartlett, P. J., Garcia, C. R., y Thomas, A. P. (2011). Melatonin and IP3-induced Ca^{2+} release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5905-5912. doi:10.1074/jbc.M110.188474
- 8 Aly, A. S., Vaughan, A. M., y Kappe, S. H. (2009). Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annual Review of Microbiology*, 63, 195-221. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073403
- 9 Amunts, A., Brown, A., Bai, X. C., Llacer, J. L., Hussain, T., Emsley, P., Long, F., Murshudov, G., Scheres, S. H. W., y Ramakrishnan, V. (2014). Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science*, 343(6178), 1485-1489. doi:10.1126/science.1249410
- 10 Anand, M., Rush, J. S., Ray, S., Doucey, M.-A., Weik, J., Ware, F. E., Hofsteenge, J., Waechter, C. J., y Lehrman, M. A. (2001). Requirement of the *Lec35* Gene for All Known Classes of Monosaccharide-P-Dolichol-dependent Glycosyltransferase Reactions in Mammals. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 487-501.
- 11 Andersen, G. R., Nissen, P., y Nyborg, J. (2003). Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(8), 434-441. doi:10.1016/s0968-0004(03)00162-2
- 12 Anthony, C. (2001). Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) and Quinoprotein Enzymes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3(5), 757-774.
- 13 Antony, H. A., y Parija, S. C. (2016). Antimalarial drug resistance: An overview. *Tropical Parasitology*, 6, 11. doi:10.4103/2229-5070.175081
- 14 Arie, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C. M., Bout, D. M., Menard, S., Rogers, W. O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J. C., Fairhurst, R. M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O., y Menard, D. (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505(7481), 50-55. doi:10.1038/nature12876
- 15 Atamna, H., Pascarmona, G., y Ginsburg, H. (1994). Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 67(1), 79-89.
- 16 Aurrecochea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. A., Nayak, V., Pennington, C., Pinney, D. F., Roos, D. S., Ross, C., Stoeckert, C. J., Treatman, C., y Wang, H. (2009). PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D539-D543. doi:10.1093/nar/gkn814
- 17 Babbitt, S. E., Altenhofen, L., Cobbold, S. A., Istvan, E. S., Fennell, C., Doerig, C., Llin  sd, M., y Goldberg, D. E. (2012). *Plasmodium falciparum* responds to amino acid starvation by entering into a hibernatory state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), E3278-E3287.
- 18 B  rtfai, R., Hoeijmakers, W. A. M., Salcedo-Amaya, A. M., Smits, A. H., Janssen-Megens, v., Kaan, A., Treeck, M., Gilberger, T.-W., Fran  oij, K.-J., y Stunnenberg, H. G. (2010). H2A.Z demarcates intergenic regions of the *Plasmodium falciparum* epigenome that are dynamically marked by H3K9ac and H3K4me3. *PLoS Pathogens*, 6(12), 14. doi:10.1371/journal.ppat.1001223
- 19 Battaille, K. P., Molin-Case, J., Paschke, R., Wang, M., Bennett, D., Vockley, J., y Kim, J. J. (2002). Crystal structure of rat short chain acyl-CoA dehydrogenase complexed with acetoacetyl-CoA: comparison with other acyl-CoA dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 12200-12207. doi:10.1074/jbc.M111296200
- 20 Baumeister, S., Winterberg, M., Przyborski, J. M., y Lingelbach, K. (2010). The malaria parasite *Plasmodium falciparum*: cell biological peculiarities and nutritional consequences. *Protoplasma*, 240(1-4), 3-12. doi:10.1007/s00709-009-0090-3
- 21 Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C., y Schirmer, R. H. (2003). Glutathione – Functions and Metabolism in the Malarial. *Biological Chemistry*, 384, 551-566.
- 22 Beraldo, F. H., Almeida, F. M., da Silva, A. M., y Garcia, C. R. (2005). Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *Journal of Cell Biology*, 170(4), 551-557. doi:10.1083/jcb.200505117

- 23 Bethke, L. L., Zilversmit, M., Nielsen, K., Daily, J., Volkman, S. K., Ndiaye, D., Lozovsky, E. R., Hartl, D. L., y Wirth, D. F. (2006). Duplication, gene conversion, and genetic diversity in the species-specific acyl-CoA synthetase gene family of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 150(1), 10-24. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.06.004
- 24 Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., y Brinkmann, V. (2004). Calcium and a Calcium-Dependent Protein Kinase Regulate Gamete Formation and Mosquito Transmission in a Malaria Parasite. *Cell*, 117, 503-514.
- 25 Birnbaum, J., Scharf, S., Schmidt, S., Jonscher, E., Hoeijmakers, W. A. M., Flemming, S., Toenhake, C. G., Schmitt, M., Sabitzki, R., Bergmann, B., Fröhlike, U., Mesén-Ramírez, P., Soares, A. B., Herrmann, H., Bártfai, R., y Spielmann, T. (2020). A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. *Science*, 367, 51-59.
- 26 Blomqvist, K., Helm, M., Wang, C., Absalon, S., Labunska, T., Rudlaff, R. M., Adapa, S., Jiang, R., Steen, H., y Dvorin, J. D. (2020). Influence of *Plasmodium falciparum* Calcium-Dependent Protein Kinase 5 (PfCDPK5) on the Late Schizont Stage Phosphoproteome. *mSphere*, 5(1). doi:10.1128/mSphere.00921-19
- 27 Boehm, M., y Bonifacino, J. S. (2001). Adaptins. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 2907-2920.
- 28 Bogdanova, A., Makhro, A., Wang, J., Lipp, P., y Kaestner, L. (2013). Calcium in Red Blood Cells—A Perilous Balance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9848-9872. doi:10.3390/ijms14059848
- 29 Booth, V., Koth, C. M., Edwards, A. M., y Arrowsmith, C. H. (2000). Structure of a conserved domain common to the transcription factors TFIIS, elongin A, and CRSP70. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31266-31268. doi:10.1074/jbc.M002595200
- 30 Botté, C. Y., Yamaryo-Botté, Y., Rupasinghe, T. W. T., Mullin, K. A., MacRae, J. I., Spurck, T. P., Kalanon, M., Shears, M. J., Coppel, R. L., Crellin, P. K., Maréchal, E., McConville, M. J., y McFadden, G. I. (2013). Atypical lipid composition in the purified relict plastid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(80), 7506-7511.
- 31 Bradley, R. M., y Duncan, R. E. (2018). The lysophosphatidic acid acyltransferases (acylglycerophosphate acyltransferases) family: one reaction, five enzymes, many roles. *Curr Opin Lipidol*, 29(2), 110-115. doi:10.1097/MOL.0000000000000492
- 32 Bruzual, A. D., López-Loyo, E. S., Blas, G. C. d. S., Allison, A. M., Arocha, C. G., Scharifker, B., Natera, D. L., León, J., Arocha, C. G., Bianco, N., Mendoza-León, A., Aguilera, M., Arbeláez, M. T., Tapia, F., Walter, C., Torres, J., Castro, J., Oletta, J. F., Carvajal, A., Cuenca, M. H., Polanco, J. D., Pereira, J., Villavicencio, A., A, F. G., Cabrera, L. H., Serrano, J. C., Melendez, M., Durán, M., Dávila, E., Castillo, L. C. T., Reviakina, V., Espitia, A., López, M. E., Urbina, H., Castro, M. J., A, S. O. P., Contreras, K., López, M. G., Fernández, C. T., y Sandoval, M. (2018). Pronunciamento Ante la Grave Epidemia de Malaria en Venezuela – 18 de enero de 2018 [Press release]
- 33 Budu, A., y García, C. R. (2012). Generation of second messengers in Plasmodium. *Microbes Infect*, 14(10), 787-795. doi:10.1016/j.micinf.2012.04.012
- 34 Bunditvorapoom, D., Kochakarn, T., Kotanan, N., Modchang, C., Kumpornsin, K., Loesbanluechai, D., Krasae, T., Cui, L., Chotivanich, K., White, N. J., Wilairat, P., Miotto, O., y Chookajorn, T. (2018). Fitness Loss under Amino Acid Starvation in Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Isolates from Cambodia. *Sci Rep*, 8(1), 12622. doi:10.1038/s41598-018-30593-5
- 35 Burns, W. (2008). Zhou Hou Bei Ji Fang 肘後備急方. Extraído de: <http://qinghaosu.blogspot.com/2008/05/zhou-hou-bei-jifang.html>
- 36 Capelluto, D. G. S., Kutateladze, T. G., Habas, R., Finkielstein, C. V., Hek, X., y Overduin, M. (2002). The DIX domain targets dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes. *Nature*, 419, 726-729.
- 37 Cappellini, M. D., y Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Lancet*, 371(9606), 64-74. doi:10.1016/S0140-6736(08)60073-2
- 38 Carey, M. A., Papin, J. A., y Guler, J. L. (2017). Novel *Plasmodium falciparum* metabolic network reconstruction identifies shifts associated with clinical antimalarial resistance. *BMC Genomics*, 18(1), 543. doi:10.1186/s12864-017-3905-1
- 39 Cassera, M. B., Zhang, Y., Hazleton, K. Z., y Schramm, V. L. (2011). Purine and Pyrimidine Pathways as Targets in *Plasmodium falciparum*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(16), 2103-2115.
- 40 Castegna, A., Scarcia, P., Agrimi, G., Palmieri, L., Rottensteiner, H., Spera, I., Germinario, L., y Palmieri, F. (2010). Identification and functional characterization of a novel mitochondrial carrier for citrate and oxoglutarate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17359-17370. doi:10.1074/jbc.M109.097188
- 41 CDC. (2019). Malaria. Extraído de: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
- 42 Chan, A., Dziedziech, A., Kirkman, L. A., Deitsch, K. W., y Ankarklev, J. (2020). A Histone Methyltransferase Inhibitor Can Reverse Epigenetically Acquired Drug Resistance in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 64(6). doi:10.1128/AAC.02021-19
- 43 Cheeseman, I. H., Miller, B. A., Nair, S., Nkhoma, S., Tan, A., Tan, J. C., Al Saai, S., Phyto, A. P., Moo, C. L., Lwin, K. M., McGready, R., Ashley, E., Imwong, M., Stepniewska, K., Yi, P., Dondorp, A. M., Mayxay, M., Newton, P. N., White, N. J., Nosten, F., Ferdig, M. T., y Anderson, T. J. (2012). A major genome region underlying artemisinin resistance in malaria. *Science*, 336(6077), 79-82. doi:10.1126/science.1215966
- 44 Chen, N., LaCrue, A. N., Teuscher, F., Waters, N. C., Gatton, M. L., Kyle, D. E., y Cheng, Q. (2014). Fatty acid synthesis and pyruvate metabolism pathways remain active in dihydroartemisinin-induced dormant ring stages of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 58(8), 4773-4781. doi:10.1128/AAC.02647-14
- 45 Cheng, Q., Kyle, D. E., y Gatton, M. L. (2012). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*: A process linked to dormancy? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2, 249-255. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.01.001
- 46 Choi, J. Y., Kumar, V., Pachikara, N., Garg, A., Lawres, L., Toh, J. Y., Voelker, D. R., y Ben Mamoun, C. (2016). Characterization of *Plasmodium* phosphatidylserine decarboxylase expressed in yeast and application for inhibitor screening. *Molecular Microbiology*, 99(6), 999-1014. doi:10.1111/mmi.13280
- 47 Cobbold, S. A., Chua, H. H., Nijagal, B., Creek, D. J., Ralph, S. A., y McConville, M. J. (2016). Metabolic Dysregulation Induced in *Plasmodium falciparum* by Dihydroartemisinin and Other Front-Line Antimalarial Drugs. *Journal of Infectious Diseases*, 213(2), 276-286. doi:10.1093/infdis/jiv372

- 48 **Cobbold, S. A., Martin, R. E., y Kirk, K.** (2011). Methionine transport in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *International Journal for Parasitology*, 41(1), 125-135. doi:10.1016/j.ijpara.2010.09.001
- 49 **Codd, A., Teuscher, F., Kyle, D. E., Cheng, Q., y Gatton, M. L.** (2011). Artemisinin-induced parasite dormancy: a plausible mechanism for treatment failure. *Malar J*, 10(56).
- 50 **Coley, A. F., Dodson, H. C., Morris, M. T., y Morris, J. C.** (2011). Glycolysis in the african trypanosome: targeting enzymes and their subcellular compartments for therapeutic development. *Mol Biol Int*, 2011, 123702. doi:10.4061/2011/123702
- 51 **Cortes, A., y Deitsch, K. W.** (2017). Malaria Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(7). doi:10.1101/cshperspect.a025528
- 52 **Cozier, G. E., Carlton, J., Bouyoucef, D., y Cullen, P. J.** (2004). Membrane Targeting by pleckstring Homology Domains. In H. Stenmark (Ed.), *Phosphoinositides in Subcellular Targeting and Enzyme Activation* (pp. 49-88).
- 53 **Cui, L., Wang, Z., Miao, J., Miao, M., Chandra, R., Jiang, H., Su, X.-z., y Cui, L.** (2012). Mechanisms of in vitro resistance to dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 86(1), 111-128. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08180.x
- 54 **D'Andrea, L. D., y Regan, L.** (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(12), 655-662. doi:10.1016/j.tibs.2003.10.007
- 55 **Darkoh, E. L., Larbi, J. A., y Lawer, E. A.** (2017). A Weather-Based Prediction Model of Malaria Prevalence in Amenfi West District, Ghana. *Malar Res Treat*, 2017, 7820454. doi:10.1155/2017/7820454
- 56 **Dasgupta, T., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., Maneeruttanarungroj, C., Nichols, S. E., Lyons, T. M., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W. L., Yuthavong, Y., y Anderson, K. S.** (2009). Exploiting structural analysis, in silico screening, and serendipity to identify novel inhibitors of drug-resistant falciparum malaria. *ACS Chem Biol*, 4(1), 29-40. doi:10.1021/cb8002804
- 57 **Dechamps, S., Wengelnik, K., Berry-Sterkers, L., Cerdan, R., Vial, H. J., y Gannoun-Zaki, L.** (2010). The Kennedy phospholipid biosynthesis pathways are refractory to genetic disruption in *Plasmodium berghei* and therefore appear essential in blood stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 173(2), 69-80. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.05.006
- 58 **Demas, A. R., Sharma, A. I., Wong, W., Early, A. M., Redmond, S., Bopp, S., Neafsey, D. E., Volkman, S. K., Hartl, D. L., y Wirth, D. F.** (2018). Mutations in *Plasmodium falciparum* actin-binding protein coronin confer reduced artemisinin susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(50), 12799-12804. doi:10.1073/pnas.1812317115
- 59 **Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobitg, M., Montanyola, A., Chang, J. M., Taly, J. F., y Notredame, C.** (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W13-17. doi:10.1093/nar/gkr245
- 60 **Di Ventura, B., Lemerle, C., Michalodimitrakis, K., y Serrano, L.** (2006). From in vivo to in silico biology and back. *Nature*, 443(7111), 527-533. doi:10.1038/nature05127
- 61 **Dickson, K. S., Bilger, A., Ballantyne, S., y Wickens, M. P.** (1999). The cleavage and polyadenylation specificity factor in *Xenopus laevis* oocytes is a cytoplasmic factor involved in regulated polyadenylation. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8).
- 62 **Dixit, A., Singh, P. K., Sharma, G. P., Malhotra, P., y Sharma, P.** (2010). PfSRPK1, a novel splicing-related kinase from *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(49), 38315-38323. doi:10.1074/jbc.M110.119255
- 63 **Doerks, T., Copley, R. R., Jorg Schultz, Ponting, C. P., y Bork, a. P.** (2002). Systematic Identification of Novel Protein Domain Families Associated with Nuclear Functions. *Genome Research*, 12(1), 47-56. doi:10.1101/
- 64 **Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M., y Bork, P.** (2000). GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), 483-485.
- 65 **Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., Bright, A. T., Westerberger, S., Winzeler, E., Blackman, M. J., Baker, D. A., Wandless, T. J., y Duraisingh, M. T.** (2010). A Plant-Like Kinase in *Plasmodium falciparum* Regulates Parasite Egress from Erythrocytes. *Science*, 328(5980), 910-912. doi:10.1126/science.1188191
- 66 **Eddy, S. R.** (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol*, 7(10), 16. doi:10.1371/journal.pcbi.1002195
- 67 **Edgar, R. C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- 68 **Elliott, D. A., McIntosh, M. T., Hosgood, H. D., 3rd, Chen, S., Zhang, G., Baeovova, P., y Joiner, K. A.** (2008). Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), 2463-2468. doi:10.1073/pnas.0711067105
- 69 **Eric Salazar, Bank, E. M., Ramsey, N., Hess, K. C., Deitsch, K. W., Levin, L. R., y Buck, J.** (2012). Characterization of *Plasmodium falciparum* Adenylyl Cyclase-b and Its Role in Erythrocytic Stage Parasites. *PLoS One*, 7(6), 8. doi:10.1371/journal.pone.0039769.g001
- 70 **Eudes, A., Kunji, E. R., Noiriell, A., Klaus, S. M., Vickers, T. J., Beverley, S. M., Gregory, J. F., 3rd, y Hanson, A. D.** (2010). Identification of transport-critical residues in a folate transporter from the folate-biopterin transporter (FBT) family. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4), 2867-2875. doi:10.1074/jbc.M109.063651
- 71 **Fang, H., Klages, N., Baechler, B., Hillner, E., Yu, L., Pardo, M., Choudhary, J., y Brochet, M.** (2017). Multiple short windows of calcium-dependent protein kinase 4 activity coordinate distinct cell cycle events during *Plasmodium* gametogenesis. *eLife*, 6, 23. doi:10.7554/eLife.26524.001
- 72 **Fatumo, S., Plaimas, K., Mallm, J.-P., Schramm, G., Adebisi, E., Oswald, M., Eils, R., y König, R.** (2009). Estimating novel potential drug targets of *Plasmodium falciparum* by analysing the metabolic network of knock-out strains in silico. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(3), 351-358. doi:10.1016/j.meegid.2008.01.007
- 73 **Fennell, C., Babbitt, S., Russo, I., Wilkes, J., Ranford-Cartwright, L., Goldberg, D. E., y Doerig, C.** (2009). PfeIK1, a eukaryotic initiation factor 2alpha kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, regulates stress-response to amino-acid starvation. *Malar J*, 8, 99. doi:10.1186/1475-2875-8-99
- 74 **Florens, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., Anthony, R. M., Graingerk, M., Haynes, J. D., Moch, J. K., Muster, N., Sacchi, J. B., Tabb, D. L., Witney, A. A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M. J., Holderk, A. A., Sinden, R. E., Yates, J. R., y Carucci, D. J.** (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, 419, 520-526.

- 75 **Gangwar, D., Kalita, M. K., Gupta, D., Chauhan, V. S., y Mohammed, A.** (2009). A systematic classification of *Plasmodium falciparum* P-loop NTPases: structural and functional correlation. *Malar J*, 8, 69. doi:10.1186/1475-2875-8-69
- 76 **Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., W.Hyman, R., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M. A., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., y Barrell, B.** (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419(6906), 35.
- 77 **Gazarini, M. L., Thomas, A. P., Pozzan, T., y Garcia, C. R.** (2003). Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *Journal of Cell Biology*, 161(1), 103-110. doi:10.1083/jcb.200212130
- 78 **Ginsburg, H., Artyomov, A., y Lev, O. B.** (2020). Malaria Parasite Metabolic Pathways. Extraído de: <https://mpmp.huji.ac.il/>
- 79 **Gloor, J. W., Balakrishnan, L., Campbell, J. L., y Bambara, R. A.** (2012). Biochemical analyses indicate that binding and cleavage specificities define the ordered processing of human Okazaki fragments by Dna2 and FEN1. *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6774-6786. doi:10.1093/nar/gks388
- 80 **Gnadig, N. F., Stokes, B. H., Edwards, R. L., Kalantarov, G. F., Heimsch, K. C., Kuderjavy, M., Crane, A., Lee, M. C. S., Straimer, J., Becker, K., Trakht, I. N., Odom John, A. R., Mok, S., y Fidock, D. A.** (2020). Insights into the intracellular localization, protein associations and artemisinin resistance properties of *Plasmodium falciparum* K13. *PLoS Pathog*, 16(4), e1008482. doi:10.1371/journal.ppat.1008482
- 81 **Goldberg, D. E., y Sigala, P. A.** (2017). *Plasmodium* heme biosynthesis: To be or not to be essential? *PLoS Pathog*, 13(9), 6. doi:10.1371/journal.ppat.1006511.g001
- 82 **Grant, P. A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L., y Workman, J. L.** (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones characterization of an Ada complex and the SAGA (SptAda) complex. *Genes & Development*, 11, 1640-1650.
- 83 **Gratraud, P., Huws, E., Falkard, B., Adjalley, S., Fidock, D. A., Berry, L., Jacobs, W. R., Jr., Baird, M. S., Vial, H., y Kremer, L.** (2009). Oleic acid biosynthesis in *Plasmodium falciparum*: characterization of the stearyl-CoA desaturase and investigation as a potential therapeutic target. *PLoS One*, 4(9), e6889. doi:10.1371/journal.pone.0006889
- 84 **Grosdidier, A., Zoete, V., y Michielin, O.** (2007). EADock: docking of small molecules into protein active sites with a multiobjective evolutionary optimization. *Proteins*, 67(4), 1010-1025. doi:10.1002/prot.21367
- 85 **Grosdidier, A., Zoete, V., y Michielin, O.** (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W270-277. doi:10.1093/nar/gkr366
- 86 **Groves, M. R., y Barford, D.** (1999). Topological characteristics of helical repeat protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 383-389.
- 87 **Gubbels, M.-J., Vaishnava, S., Boot, N., Dubremetz, J.-F., y Striepen, B.** (2006). A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *Journal of Cell Science*, 119, 2236-2245. doi:10.1242/jcs
- 88 **Haldar, K., Bhattacharjee, S., y Safeukui, I.** (2018). Drug resistance in *Plasmodium*. *Nature Reviews: Microbiology*, 16(3), 156-170. doi:10.1038/nrmicro.2017.161
- 89 **Hao, H.-X., Khalimonchuk, O., Schraders, M., Dephoure, N., Bayley, J.-P., Kunst, H., Devilee, P., Cremers, C. W. R. J., Schiffman, J. D., Bentz, B. G., Gygi, S. P., Winge, D. R., Kremer, H., y Rutter, J.** (2009). SDH5, a Gene Required for Flavination of Succinate Dehydrogenase, Is Mutated in Paraganglioma. *Science*, 325, 1139-1142.
- 90 **Hasin, Y., Seldin, M., y Lusi, A.** (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*, 18(1), 83. doi:10.1186/s13059-017-1215-1
- 91 **Hayward, R. E.** (2000). *Plasmodium falciparum* Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Is Developmentally Regulated in Gametocytes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 107(2), 227-240.
- 92 **He, Y., Campino, S., Diez Benavente, E., Warhurst, D. C., Beshir, K. B., Lubis, I., Gomes, A. R., Feng, J., Jiazhi, W., Sun, X., Huang, F., Tang, L. H., Sutherland, C. J., y Clark, T. G.** (2019). Artemisinin resistance-associated markers in *Plasmodium falciparum* parasites from the China-Myanmar border: predicted structural stability of K13 propeller variants detected in a low-prevalence area. *PLoS One*, 14(3), e0213686. doi:10.1371/journal.pone.0213686
- 93 **Heo, L., Park, H., y Seok, C.** (2013). GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W384-388. doi:10.1093/nar/gkt458
- 94 **Hiraishi, N., Ishida, Y., y Nagahama, M.** (2015). AAA-ATPase NVL2 acts on MTR4-exosome complex to dissociate the nucleolar protein WDR74. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(3), 534-540. doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.160
- 95 **Hodges, M., Yikilmaz, E., Patterson, G., Kasvosve, I., Rouault, T. A., Gordeuk, V. R., y Loyevsky, M.** (2005). An iron regulatory-like protein expressed in *Plasmodium falciparum* displays aconitase activity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 143(1), 29-38. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.05.004
- 96 **Hoffman-Sommer, M., Migdalski, A., Rytka, J., y Kucharczyk, R.** (2005). Multiple functions of the vacuolar sorting protein Ccz1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329, 197-204. doi:10.1016/j.bbrc.2005.01.107
- 97 **Hoover, K. L., Glynn, N. M., Burnside, J., Coppock, D. L., y Thorpe, a. C.** (1999). Homology between Egg White Sulphydryl Oxidase and Quiescin Q6 Defines a New Class of Flavin-linked Sulphydryl Oxidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 31759-31762.
- 98 **Hoshen, M. B., NA-Bangchang, K., Stein, W. D., y Ginsburg, H.** (2000). Mathematical modelling of the chemotherapy of *Plasmodium falciparum* malaria with artesunate: postulation of 'dormancy', a partial cytostatic effect of the drug, and its implication for treatment regimens. *Parasitology*, 121, 237-246.

- 99 **Hussien, H. H., Eissa, F. H., y Awadalla, K. E.** (2017). Statistical Methods for Predicting Malaria Incidences Using Data from Sudan. *Malaria Research and Treatment*, 2017, 1-9. doi:10.1155/2017/4205957
- 100 **Hyde, J. E.** (2005). Exploring the folate pathway in *Plasmodium falciparum*. *Acta Tropica*, 94(3), 191-206. doi:10.1016/j.actatropica.2005.04.002
- 101 **InterPro.** (2020a). AMP-dependent synthetase/ligase. Extraído de: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR000873/>
- 102 **InterPro.** (2020b). G-patch domain. Extraído de: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR000467/>
- 103 **InterPro.** (2020c). Golgi to ER traffic protein 4 Extraído de: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR007317/>
- 104 **InterPro.** (2020d). WD40/YVTN repeat-like-containing domain superfamily. Extraído de: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR015943/>
- 105 **Irwin, J. J., y Shoichet, B. K.** (2005). ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(1), 177-182.
- 106 **Ismail, H. M., Barton, V., Phanchana, M., Charoensutthivarakul, S., Wong, M. H. L., Hemingway, J., Biagina, G. A., O'Neill, P. M., y Warda, S. A.** (2016). Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), 2080-2085.
- 107 **Iuchi, S.** (2001). Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *CMLS Cell. Mol. Life Sci*, 58, 625-635.
- 108 **Jacot, D., Waller, R. F., Soldati-Favre, D., MacPherson, D. A., y MacRae, J. I.** (2016). Apicomplexan Energy Metabolism: Carbon Source Promiscuity and the Quiescence Hyperbole. *Trends in Parasitology*, 32(1), 56-70. doi:10.1016/j.pt.2015.09.001
- 109 **Jain, B. P., y Pandey, S.** (2018). WD40 Repeat Proteins: Signalling Scaffold with Diverse Functions. *Protein Journal*, 37(5), 391-406. doi:10.1007/s10930-018-9785-7
- 110 **Jaramillo-Ochoa, R., Farrell, D. F., Sippy, R., Cueva-Aponte, C., Beltrán-Ayala, E., Gonzaga, J. L., Ordoñez-León, T., Quintana, F. A., Sadie J. Ryan, y Stewart-Ibarra, A. M.** (2019). Effects of Political Instability in Venezuela on Malaria Resurgence at Ecuador–Peru Border, 2018. *Emerging Infectious Diseases*, 25(4), 3. doi:https://doi.org/10.3201/eid2504.181355
- 111 **Jensen, M., Conley, M., y Helstowski, L.** (1983). Culture of *Plasmodium falciparum*: the role of pH, glucose, and lactate. *Journal of Parasitology*, 69, 1060-1067.
- 112 **Jentsch, S., Seufert, W., y Hauser, H.-P.** (1991). Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1089, 127-139.
- 113 **Johnson, S. A., y Hunter, T.** (2005). Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature Methods*, 2(1), 17-25. doi:10.1038/nmeth731
- 114 **Kafsack, B. F., y Llinas, M.** (2010). Eating at the table of another: metabolomics of host-parasite interactions. *Cell Host Microbe*, 7(2), 90-99. doi:10.1016/j.chom.2010.01.008
- 115 **Kaisho, T., y Akira, S.** (2006). Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(5), 979-987; quiz 988. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.023
- 116 **Katoh, K., y Standley, D. M.** (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. doi:10.1093/molbev/mst010
- 117 **Ke, H., Ganesan, S. M., Dass, S., Morrissey, J. M., Pou, S., Nilsen, A., Riscoe, M. K., Mather, M. W., y Vaidya, A. B.** (2019). Mitochondrial type II NADH dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* (PfNDH2) is dispensable in the asexual blood stages. *PLoS One*, 14(4), e0214023. doi:10.1371/journal.pone.0214023
- 118 **Ke, H., Lewis, I. A., Morrissey, J. M., McLean, K. J., Ganesan, S. M., Painter, H. J., Mather, M. W., Jacobs-Lorena, M., Llinas, M., y Vaidya, A. B.** (2015). Genetic investigation of tricarboxylic acid metabolism during the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Cell Rep*, 11(1), 164-174. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.011
- 119 **Keeren, K., Friedrich, M., Gebuhr, I., Philipp, S., Sabat, R., Sterry, W., Brandt, C., Meisel, C., Grutz, G., Volk, H. D., y Sawitzki, B.** (2009). Expression of tolerance associated gene-1, a mitochondrial protein inhibiting T cell activation, can be used to predict response to immune modulating therapies. *Journal of Immunology*, 183(6), 4077-4087. doi:10.4049/jimmunol.0804351
- 120 **Keley, W. L.** (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6), 222-227.
- 121 **Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., y Sternberg, M. J. E.** (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10(6), 845-858. doi:10.1038/nprot.2015.053
- 122 **Kimura, M.** (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217(129), 624-626.
- 123 **Kirk, K., y Lehane, A. M.** (2014). Membrane transport in the malaria parasite and its host erythrocyte. *Biochemical Journal*, 457(1), 1-18. doi:10.1042/BJ20131007
- 124 **Klonis, N., Crespo-Ortiz, M. P., Bottova, I., Abu-Bakar, N., Kenny, S., Rosenthal, P. J., y Tilley, L.** (2011). Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11405-11410. doi:10.1073/pnas.1104063108/-DCSupplemental
- 125 **Kofler, M. M., y Freund, C.** (2006). The GYF domain. *FEBS Journal*, 273(2), 245-256. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05078.x
- 126 **Krafts, K., Hempelmann, E., y Skorska-Stania, A.** (2012). From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology Research*, 111(1), 1-6. doi:10.1007/s00436-012-2886-x
- 127 **Krishna, S., Pulcin, S., Fatih, F., y Staines, H.** (2010). Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. *Cell*, 126(11), 517-523. doi:10.1016/j.pt.2010.06.014
- 128 **Krishna, S., Uhlemann, A. C., y Haynes, R. K.** (2004). Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist Updat*, 7(4-5), 233-244. doi:10.1016/j.drug.2004.07.001
- 129 **Krungkrai, S. R., y Krungkrai, J.** (2016). Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Asian Pac J Trop Med*, 9(6), 525-534. doi:10.1016/j.apjtm.2016.04.012
- 130 **Kugelschadt, D., Winter, D., Pluckhahn, K., Lehmann, W. D., y Kappes, B.** (2007). Raf kinase inhibitor protein affects activity of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 151(1), 111-117. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.10.012

- 131 Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- 132 Kunji, E. R., y Crichton, P. G. (2010). Mitochondrial carriers function as monomers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7), 817-831. doi:10.1016/j.bbabo.2010.03.023
- 133 Kyle, D. E., y Webster, H. K. (1996). Postantibiotic effect of quinine and dihydroartemisin on *Plasmodium falciparum* in vitro: implications for a mechanism of recrudescence. Paper presented at the XIVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria,.
- 134 LaCount, D. J., Vignali, M., Chettier, R., Phansalkar, A., Bell, R., Hesselberth, J. R., Schoenfeld, L. W., Ota, I., Sahasrabudhe, S., Kurschner, C., Fields, S., y Hughes, R. E. (2005). A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 438(7064), 103-107. doi:10.1038/nature04104
- 135 Lad, L., Friedman, J., Huying Li, B. B., Montellano, P. R. O. d., y Poulos, T. L. (2004). Crystal Structure of Human Heme Oxygenase-1 in a Complex with Biliverdin. *Biochemistry*, 43(13), 3793-3801.
- 136 Landfear, S. M. (2010). Glucose transporters in parasitic protozoa. *Methods Mol Biol*, 637, 245-262. doi:10.1007/978-1-60761-700-6_13
- 137 Lee, A. H., Symington, L. S., y Fidock, D. A. (2014). DNA Repair Mechanisms and Their Biological Roles in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Microbiology and molecular biology review*, 78, 469-486. doi:10.1128/MMBR.00059-13
- 138 Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C., Swanson, R. N., Bouet, F., Riva, M., y Sentenac, A. (1992). TFC3 Gene encoding the B-block binding subunit of the yeast transcription factor IIIC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 10512-10516.
- 139 Letunic, I., y Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W256-W259. doi:10.1093/nar/gkz239
- 140 Levenson, J. D., Huang, H. K., Forsburg, S. L., y Hunter, T. (2002). The Schizosaccharomyces pombe aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 13(4), 1132-1143. doi:10.1091/mbc.01-07-0330
- 141 Li, J.-L., Targett, G. A. T., y Baker, D. A. (2001). Primary structure and sexual stage-specific expression of a LAMMER protein kinase of *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 387-392.
- 142 Li, Y., Chen, Z. Y., Wang, W., Baker, C. C., y Krug, R. M. (2001). The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo. *RNA*, 7(6), 920-931. doi:10.1017/s1355838201010226
- 143 Lim, L., y McFadden, G. I. (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1541), 749-763. doi:10.1098/rstb.2009.0273
- 144 Loy, D. E., Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., Sharp, P. M., y Hahn, B. H. (2017). Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *International Journal for Parasitology*, 47(2-3), 87-97. doi:10.1016/j.ijpara.2016.05.008
- 145 Lucet, I. S., Tobin, A., Drewry, D., Wilks, A. F., y Doerig, C. (2012). *Plasmodium* kinases as targets for new-generation antimalarials. *Future Med. Chem*, 4(18), 2295-2310.
- 146 Maki, M., Kitaura, Y., Satoh, H., Ohkouchi, S., y Shibata, H. (2002). Structures, functions and molecular evolution of the penta-EF-hand Ca²⁺-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1600, 51-60.
- 147 MalariaSite. (2015, 9 Mar 2019). Saga of Malaria Treatment. Extraído de: <https://www.malariasite.com/history-treatment/>
- 148 Mandel, C. R., Kaneko, S., Zhang, H., Damara Gebauer, Vethantham, V., Manley, J. L., y Tong, L. (2006). Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease. *Nature*, 444, 953-956. doi:10.1038/nature05363
- 149 Martin, R. E., Henry, R. I., Abbey, J. L., Clements, J. D., y Kirk, K. (2005). The 'permeome' of the malaria parasite: an overview of the membrane transport proteins of *Plasmodium falciparum*. *Genome Biol*, 6(2), 22.
- 150 Martin, R. E., y Kirk, K. (2007). Transport of the essential nutrient isoleucine in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood*, 109(5), 2217-2224. doi:10.1182/blood-2005-11026963
- 151 Matesanz, F., Téllez, M. I.-d.-M., y Alcina, A. (2003). The *Plasmodium falciparum* fatty acyl-CoA synthetase family (PfACS) and differential stage-specific expression in infected erythrocytes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 126, 109-112.
- 152 Mathieu, L. C., Cox, H., Early, A. M., Mok, S., Lazrek, Y., Paquet, J. C., Ade, M. P., Lucchi, N. W., Grant, Q., Udhayakumar, V., Alexandre, J. S., Demar, M., Ringwald, P., Neafsey, D. E., Fidock, D. A., y Musset, L. (2020). Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance. *Elife*, 9. doi:10.7554/eLife.51015
- 153 Matthews, J. M., y Sunde, M. (2002). Zinc Fingers—Folds for Many Occasions. *Life*, 54, 351-355. doi:10.1080/15216540290114711
- 154 Mazza, C., Ohno, M., Segref, A., Mattaj, I. W., y Cusack, a. S. (2001). Crystal Structure of the Human Nuclear Cap Binding Complex. *Molecular Cell*, 8, 383-396.
- 155 Mbengue, A., Bhattacharjee, S., Pandharkar, T., Liu, H., Estiu, G., Stahelin, R. V., Rizk, S. S., Njimoh, D. L., Ryan, Y., Chotivanich, K., Nguon, C., Ghorbal, M., Lopez-Rubio, J. J., Pfrender, M., Emrich, S., Mohandas, N., Dondorp, A. M., Wiest, O., y Haldar, K. (2015). A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 520(7549), 683-687. doi:10.1038/nature14412
- 156 McDonough, K. A., y Rodriguez, A. (2011). The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword. *Nature Reviews: Microbiology*, 10(1), 27-38. doi:10.1038/nrmicro2688
- 157 McLean, K. J., y Jacobs-Lorena, M. (2020). The response of *Plasmodium falciparum* to isoleucine withdrawal is dependent on the stage of progression through the intraerythrocytic cell cycle. *Malar J*, 19(1), 147. doi:10.1186/s12936-020-03220-w
- 158 Meierjohann, S., Walter, R. D., y Muller, S. (2002). Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Journal*, 368, 761-768.
- 159 Ménard, D., Khim, N., Beghain, J., Adegnika, A. A., Shafiul-Alam, M., O. Amodu, Rahim-Awab, G., Barnadas, C., Berry, A., Boum, Y., Bustos, M. D., Cao, J., J.-H. Chen, Collet, L., Cui, L., Thakur, G.-D., Dieye, A., Djallé, D., M.A. Dorkenoo,

- Eboumbou-Moukoko, C. E., Espino, F.-E.-C. J., Fandeur, T., M.-F. Ferreira-da-Cruz, Fola, A. A., Fuehrer, H.-P., Hassan, A. M., Herrera, S., Hongvanthong, B., S. Houzé, Ibrahim, M. L., Jahirul-Karim, M., Jiang, L., Kano, S., Ali-Khan, W., M. Khanthavong, Kremsner, P. G., Lacerda, M., Leang, R., Leelawong, M., Li, M., Lin, K., J.-B. Mazarati, Ménard, S., Morlais, I., Muhindo-Mavoko, H., Musset, L., K. Na-Bangchang, Nambozi, M., Niaré, K., Noedl, H., Ouédraogo, J.-B., Pillai, D. R., Pradines, B., Quang-Phuc, B., Ramharter, M., Randrianarivelosia, M., J. Sattabongkot, Sheikh-Omar, A., Silué, K. D., Sirima, S. B., Sutherland, C., Syafruddin, D., R. Tahar, Tang, L.-H., Touré, O. A., Tshibangu-wa-Tshibangu, P., I. Vigan-Womas, Warsame, M., Wini, L., Zakeri, S., Kim, S., Eam, R., Berne, L., Khean, C., S. Chy, Ken, M., Loch, K., Canier, L., Duru, V., Legrand, E., Barale, J.-C., Stokes, B., J. Strainer, Witkowski, B., Fidock, D. A., Rogier, C., Ringwald, P., F. Arie, y Mercereau-Puijalon, O. (2016). A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *The New England Journal of Medicine*, 374, 2453-2464. doi:10.1056/NEJMoa1513137
- 160 Milkereit, P., Gadal, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E., y Tschochner, H. (2001). Maturation and Intranuclear Transport of Pre-Ribosomes Requires Noc Proteins. *Cell*, 105, 499-509.
- 161 Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S. D., Chang, H. Y., El-Gebali, S., Fraser, M. I., Gough, J., Haft, D. R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C., Pandurangan, A. P., Paysan-Lafosse, T., Pesce, S., Potter, S. C., Qureshi, M. A., Rawlings, N. D., Redaschi, N., Richardson, L. J., Rivoire, C., Salazar, G. A., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C. J. A., Sillitoe, I., Sutton, G. G., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S. C. E., Yong, S. Y., y Finn, R. D. (2019). InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D351-D360. doi:10.1093/nar/gky1100
- 162 Mok, S., Ashley, E. A., Ferreira, P. E., Zhu, L., Lin, Z., Yeo, T., Chotivanich, K., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Dhorda, M., Nguon, C., Lim, P., Amaratunga, C., Suon, S., Hien, T. T., Htut, Y., Faiz, M. A., Onyamboko, M. A., Mayxay, M., Newton, P. N., Tripura, R., Woodrow, C. J., Miotto, O., Kwiatkowski, D. P., Nosten, F., Day, N. P., Preiser, P. R., White, N. J., Dondorp, A. M., Fairhurst, R. M., y Bozdech, Z. (2015). Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*, 347(6220), 431-435.
- 163 Mok, S., Imwong, M., Mackinnon, M. J., Sim, J., Ramadoss, R., Yi, P., Mayxay, M., Chotivanich, K., Liong, K. Y., Russell, B., Socheat, D., Newton, P. N., Day, N. P., White, N. J., Preiser, P. R., Nosten, F., Dondorp, A. M., y Bozdech, Z. (2011). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* is associated with an altered temporal pattern of transcription. *BMC Genomics*, 12, 391. doi:10.1186/1471-2164-12-391
- 164 Mok, S., Stokes, B. H., Gnädig, N. F., Ross, L. S., Yeo, T., Amaratunga, C., Allman, E., Solyakov, L., Bottrill, A. R., Tripathi, J., Fairhurst, R. M., Llinas, M., Bozdech, Z., Tobin, A. B., y Fidock, D. A. (2021). Artemisinin-resistant K13 mutations rewire *Plasmodium falciparum*'s intra-erythrocytic metabolic program to enhance survival. *Nat Commun*, 12(1), 530. doi:10.1038/s41467-020-20805-w
- 165 Moraes, F., y Goes, A. (2016). A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochem Mol Biol Educ*, 44(3), 215-223. doi:10.1002/bmb.20952
- 166 Mukherjee, A., Bopp, S., Magistrado, P., Wong, W., Daniels, R., Demas, A., Schaffner, S., Amaratunga, C., Lim, P., Dhorda, M., Miotto, O., Woodrow, C., Ashley, E. A., Dondorp, A. M., White, N. J., Wirth, D., Fairhurst, R., y Volkman, S. K. (2017). Artemisinin resistance without pfkelch13 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Cambodia. *Malar J*, 16(1), 195. doi:10.1186/s12936-017-1845-5
- 167 Muller, I. B., Knockel, J., Eschbach, M. L., Bergmann, B., Walter, R. D., y Wrenger, C. (2010). Secretion of an acid phosphatase provides a possible mechanism to acquire host nutrients by *Plasmodium falciparum*. *Cellular Microbiology*, 12(5), 677-691. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01426.x
- 168 Musto, H., Cacciò, S., Rodríguez-Maseda, H., y Bernardi, G. (1997). Compositional Constraints in the Extremely GC-poor Genome of *Plasmodium falciparum*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 7.
- 169 Nagamune, K., Moreno, S. N., y Sibley, L. D. (2007). Artemisinin-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* have altered calcium homeostasis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 51(11), 3816-3823. doi:10.1128/AAC.00582-07
- 170 Nardella, F., Halby, L., Hammam, E., Erdmann, D., Cadet-Daniel, V., Peronet, R., Menard, D., Witkowski, B., Mecheri, S., Scherf, A., y Arimondo, P. B. (2020). DNA Methylation Bisubstrate Inhibitors Are Fast-Acting Drugs Active against Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Parasites. *ACS Cent Sci*, 6(1), 16-21. doi:10.1021/acscentsci.9b00874
- 171 NCBI, N. C. f. B. I. (1988). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Extraído de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 172 Nei, M., y Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269-5273.
- 173 Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., y Koonin, E. V. (1999). AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Research*, 9, 27-43.
- 174 Niekerk, D. D. v., Penkler, G. P., Toit, F. d., y Snoep, J. L. (2016). Targeting glycolysis in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The FEBS Journal*, 283, 634-646. doi:10.1111/febs.13615
- 175 NobelPrize. (2015). Tu Youyou. Extraído de: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/tu/facts/>
- 176 Noedl, H., Se, Y., Schaefer, K., Smith, B. L., Socheat, D., y Fukuda, M. M. (2008). Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *The New England Journal of Medicine*, 359(24), 2619-2620. doi:10.1056/nejmc0805011
- 177 Nozawa, A., Fujimoto, R., Matsuoka, H., Tsuboi, T., y Tozawa, Y. (2011). Cell-free synthesis, reconstitution, and characterization of a mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carrier of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(3), 612-617. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.130
- 178 Nozawa, A., Ito, D., Ibrahim, M., Santos, H. J., Tsuboi, T., y Tozawa, Y. (2020). Characterization of mitochondrial carrier proteins of malaria parasite *Plasmodium falciparum* based on in vitro translation and reconstitution. *Parasitology International*, 79, 102160. doi:10.1016/j.parint.2020.102160
- 179 Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolov, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschuere, K. H. G., y Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. 5(3), 197-211.

- 180 Olszewski, K. L., y Llinas, M. (2011). Central carbon metabolism of *Plasmodium* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 175(2), 95-103. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.09.001
- 181 OMS. (2016). *Situación de la Malaria en la Región de las Américas, 2000-2016*. Extraído de: <https://www.paho.org/sites/default/files/2016-cha-situacion-malaria-americas.pdf>
- 182 OMS, y OPS. (2018). *Actualización Epidemiológica Aumento de malaria en las Américas*. Extraído de:
- 183 Page, L. J., Sowerby, P. J., Lui, W. W. Y., y Robinson, M. S. (1999). γ -Synergins: An EH Domain-containing Protein that Interacts with γ -Adaptin. *Journal of Cell Biology*, 145(5), 993-1004.
- 184 Pagni, M., Ioannidis, V., Cerutti, L., Zahn-Zabal, M., Jongeneel, C. V., Hau, J., Martin, O., Kuznetsov, D., y Falquet, L. (2007). MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W433-437. doi:10.1093/nar/gkm352
- 185 Painter, H. J., Morrissey, J. M., Mather, M. W., y Vaidya, A. B. (2007). Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 446(7131), 88-91. doi:10.1038/nature05572
- 186 Paloque, L., Ramadani, A. P., Mercereau-Puijalon, O., Augereau, J. M., y Benoit-Vical, F. (2016). *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. *Malar J*, 15, 149. doi:10.1186/s12936-016-1206-9
- 187 Pandey, K., Ferreira, P. E., Ishikawa, T., Nagai, T., Kaneko, O., y Yahata, K. (2016). Ca(2+) monitoring in *Plasmodium falciparum* using the yellowameleon-Nano biosensor. *Sci Rep*, 6, 23454. doi:10.1038/srep23454
- 188 Pao, S. S., Paulsen, I. T., y Jr., M. H. S. (1998). Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62.
- 189 Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., y Petrosillo, G. (2019). Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells*, 8(7). doi:10.3390/cells8070728
- 190 Pascual, J., Martinez-Yamout, M., Dyson, H. J., y Wright, P. E. (2000). Structure of the PHD Zinc Finger from Human Williams-Beuren Syndrome Transcription Factor. *JMB*, 304, 723-729.
- 191 Paton, D. G., Childs, L. M., Itoe, M. A., Holmdahl, I. E., Buckee, C. O., y Catteruccia, F. (2019). Exposing Anopheles mosquitoes to antimalarials blocks *Plasmodium* parasite transmission. *Nature*, 567(7747), 239-243. doi:10.1038/s41586-019-0973-1
- 192 Patzewitz, E.-M., Wong, E. H., y Müller, S. (2011). Dissecting the role of glutathione biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, 83(2). doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07933.x
- 193 Payne, S. H., y Loomis, W. F. (2006). Retention and Loss of Amino Acid Biosynthetic Pathways Based on Analysis of Whole-Genome Sequences. *Eukaryotic Cell*, 5(2), 272-276. doi:10.1128/EC.5.2.272-276.2006
- 194 Peatey, C. L., Chavchich, M., Chen, N., Gresty, K. J., Gray, K. A., Gatton, M. L., Waters, N. C., y Cheng, Q. (2015). Mitochondrial Membrane Potential in a Small Subset of Artemisinin-Induced Dormant *Plasmodium falciparum* Parasites In Vitro. *Journal of Infectious Diseases*, 212(3), 426-434. doi:10.1093/infdis/jiv048
- 195 Penkler, G., du Toit, F., Adams, W., Rautenbach, M., Palm, D. C., van Niekerk, D. D., y Snoep, J. L. (2015). Construction and validation of a detailed kinetic model of glycolysis in *Plasmodium falciparum*. *The FEBS Journal*, 282(8), 1481-1511. doi:10.1111/febs.13237
- 196 Pereira, L. B., Thomas, S. J., Silva, A. L. A., Bartlett, P. J., Thomas, A. P., y Garcia, C. R. S. (2020). The genetic Ca²⁺ sensor GCaMP3 reveals multiple Ca²⁺ stores differentially coupled to Ca²⁺ entry in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.RA120.014906
- 197 Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., y Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084
- 198 Philip, N., y Haystead, T. A. (2007). Characterization of a UBC13 kinase in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(19), 7845-7850. doi:10.1073/pnas.0611601104
- 199 Phong, N. C., Chavchich, M., Quang, H. H., San, N. N., Birrell, G. W., Chuang, I., Martin, N. J., Manh, N. D., y Edstein, M. D. (2019). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins and *Plasmodium vivax* to chloroquine in Phuoc Chien Commune, Ninh Thuan Province, south-central Vietnam. *Malar J*, 18(1), 10. doi:10.1186/s12936-019-2640-2
- 200 Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., Tata, V. D., y Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1499-1503. doi:10.1016/s0006-2952(03)00504-5
- 201 Ponting, C. P. (1997). Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Science*, 6, 467-468.
- 202 Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E., y Blake, D. J. (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays*, 19, 469-479.
- 203 Quashie, N. B., Ranford-Cartwright, L. C., y Koning, H. P. d. (2010). Uptake of purines in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes is mostly mediated by the human equilibrative nucleoside transporter and the human facilitative nucleobase transporter. *Malar J*, 9(36), 10.
- 204 Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., y Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1), 95-99. doi:10.1016/s0022-2836(63)80023-6
- 205 Ranjit Kumar, S. R. P., Utpal Tatu. (2007). Three-dimensional structure of heat shock protein 90 from *Plasmodium falciparum*: molecular modelling approach to rational drug design against malaria. *J. Biosci.*, 32(3), 6.
- 206 Recht, J., Siqueira, A. M., Monteiro, W. M., Herrera, S. M., Herrera, S., y Lacerda, M. V. G. (2017). Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*, 16(1), 273. doi:10.1186/s12936-017-1925-6
- 207 Reininger, L., Billker, O., Tewari, R., Mukhopadhyay, A., Fennell, C., Dorin-Semblat, D., Doerig, C., Goldring, D., Harmse, L., Ranford-Cartwright, L., Packer, J., y Doerig, C. (2005). A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31957-31964. doi:10.1074/jbc.M504523200

- 208 **Rempola, B., Karkusiewicz, I., Piekarska, I., y Rytka, J.** (2006). Fcf1p and Fcf2p are novel nucleolar *Saccharomyces cerevisiae* proteins involved in pre-rRNA processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(2), 546-554. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.140
- 209 **Requena, T., Cabrera, S., Martin-Sierra, C., Price, S. D., Lysakowski, A., y Lopez-Escamez, J. A.** (2015). Identification of two novel mutations in FAM136A and DTNA genes in autosomal-dominant familial Meniere's disease. *Human Molecular Genetics*, 24(4), 1119-1126. doi:10.1093/hmg/ddu524
- 210 **Robinson, A. J., y Kunji, E. R. S.** (2006). Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2617-2622. doi:10.1073/pnas.0509994103
- 211 **Robinson, A. J., Overy, C., y Kunji, E. R.** (2008). The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(46), 17766-17771. doi:10.1073/pnas.0809580105
- 212 **Rocamora, F., Zhu, L., Liong, K. Y., Dondorp, A., Miotto, O., Mok, S., y Bozdech, Z.** (2018). Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. *PLoS Pathog*, 14(3), e1006930. doi:10.1371/journal.ppat.1006930
- 213 **Roch, K. G. L., Johnson, J. R., Florens, L., Zhou, Y., Santosyan, A., Grainger, M., Yan, F., Williamson, K. C., Holder, A. A., Carucci, D. J., III, J. R. Y., y Winzeler, E. A.** (2004). Global analysis of transcript and protein levels across the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Genome Research*, 14, 12. doi:10.1101/
- 214 **Roth, E.** (1990). *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells*, 16, 453-461.
- 215 **Rudzinska, M. A.** (1969). The Fine Structure of Malaria Parasites. 25, 161-199. doi:10.1016/s0074-7696(08)60203-x
- 216 **Ruprecht, J. J., King, M. S., Zogg, T., Aleksandrova, A. A., Pardon, E., Crichton, P. G., Steyaert, J., y Kunji, E. R. S.** (2019). The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. *Cell*, 176(3), 435-447 e415. doi:10.1016/j.cell.2018.11.025
- 217 **Ruprecht, J. J., y Kunji, E. R.** (2019a). The SLC25 Mitochondrial Carrier Family Structure and Mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(3), 244-258. doi:10.1016/j.tibs.2019.11.001
- 218 **Ruprecht, J. J., y Kunji, E. R.** (2019b). Structural changes in the transport cycle of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Current Opinion in Structural Biology*, 57, 135-144. doi:10.1016/j.sbi.2019.03.029
- 219 **Sahni, S. K., Saxena, N., Pun, S. K., Dutta, G. P., y Pandey, V. C.** (1992). NADP-Specific isocitrate dehydrogenase from the simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*: partial purification and characterization. *The Journal of Protozoology*, 39(2), 338-342.
- 220 **Salcedo-Sora, J. E., Ochong, E., Beveridge, S., Johnson, D., Nzila, A., Biagini, G. A., Stocks, P. A., O'Neill, P. M., Krishna, S., Bray, P. G., y Ward, S. A.** (2011). The molecular basis of folate salvage in *Plasmodium falciparum*: characterization of two folate transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 286(52), 44659-44668. doi:10.1074/jbc.M111.286054
- 221 **Saliba, K. J., Horner, H. A., y Kirk, K.** (1998). Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10190-10195.
- 222 **Saralamba, S., Pan-Ngum, W., Maude, R. J., Lee, S. J., Tarning, J., Lindegårdh, N., Chotivanich, K., Nosten, F., Day, N. P. J., Socheat, D., White, N. J., Dondorp, A. M., y White, L. J.** (2010). Intrahost modeling of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 397-402. doi:10.1073/pnas.1006113108
- 223 **Scheibel, L. W., y Pflaum, W. P.** (1970). Carbohydrate Metabolism in *Plasmodium knowlesi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 37(4), 543-555.
- 224 **Schlame, M., y Ren, M.** (2009). The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1788(10), 2080-2083. doi:10.1016/j.bbamem.2009.04.019
- 225 **Schneider, M. V., y Orchard, S.** (2011). Omics technologies, data and bioinformatics principles. *Methods Mol Biol*, 719, 3-30. doi:10.1007/978-1-61779-027-0_1
- 226 **Schubert, H. L., Blumenthal, R. M., y Cheng, X.** (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), 329-335. doi:10.1016/s0968-0004(03)00090-2
- 227 **Seidi, A., Muellner-Wong, L. S., Rajendran, E., Tjhin, E. T., Dagley, L. F., Aw, V. Y., Faou, P., Webb, A. I., Tonkin, C. J., y Dooren, G. G. v.** (2018). Elucidating the mitochondrial proteome of *Toxoplasma gondii* reveals the presence of a divergent cytochrome c oxidase. *eLife*, 7(e38131), 36. doi:10.7554/eLife.38131.001
- 228 **Shandilya, A., Chacko, S., Jayaram, B., y Ghosh, I.** (2013). A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. *Sci Rep*, 3, 2513. doi:10.1038/srep02513
- 229 **Shears, M. J., Botte, C. Y., y McFadden, G. I.** (2015). Fatty acid metabolism in the *Plasmodium* apicoplast: Drugs, doubts and knockouts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 199(1-2), 34-50. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.03.004
- 230 **Shin, J. J. H., Gillingham, A. K., Begum, F., Chadwick, J., y Munro, S.** (2017). TBC1D23 is a bridging factor for endosomal vesicle capture by golgins at the trans-Golgi. *Nature Cell Biology*, 19(12), 1424-1432. doi:10.1038/ncb3627
- 231 **Shivapurkar, R., Hingamire, T., Kulkarni, A. S., Rajamohan, P. R., Reddy, D. S., y Shanmugam, D.** (2018). Evaluating antimalarial efficacy by tracking glycolysis in *Plasmodium falciparum* using NMR spectroscopy. *Sci Rep*, 8(1), 18076. doi:10.1038/s41598-018-36197-3
- 232 **Siddiqui, G., Srivastava, A., Russell, A. S., y Creek, D. J.** (2017). Multi-omics Based Identification of Specific Biochemical Changes Associated With Pfkfb3-Mutant Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Infectious Diseases*, 215, 1435-1444. doi:10.1093/infdis/jix156
- 233 **Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C. M., emingway, J., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Kabaria, C. W., Burkot, T. R., Harbach, R. E., y Hay, S. I.** (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors*, 5, 11.

- 234 Slavic, K., Straschil, U., Reininger, L., Doerig, C., Morin, C., Tewari, R., y Krishna, S. (2010). Life cycle studies of the hexose transporter of *Plasmodium* species and genetic validation of their essentiality. *Molecular Microbiology*, 75(6), 1402-1413. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07060.x
- 235 Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M. M., Semblat, J.-P., Dorin-Semblat, D., Reininger, L., Bottrill, A. R., Mistry, S., Abdi, A., Fennell, C., Holland, Z., Demarta, C., Bouza, Y., Sicard, A., Nivez, M.-P., Eschenlauer, S., Lama, T., Thomas, D. C., Sharma, P., Agarwal, S., Kern, S., Pradel, G., Gracioti, M., Tobin, A. B., y Doerig, C. (2011). Global kinomic and phosphoproteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*, 2(1). doi:10.1038/ncomms1558
- 236 Srivastava, A., Philip, N., Hughes, K. R., Georgiou, K., MacRae, J. I., Barrett, M. P., Creek, D. J., McConville, M. J., y Waters, A. P. (2016). Stage-Specific Changes in *Plasmodium* Metabolism Required for Differentiation and Adaptation to Different Host and Vector Environments. *PLoS Pathog*, 12(12), e1006094. doi:10.1371/journal.ppat.1006094
- 237 Storm, J., Sethia, S., Blackburn, G. J., Chokkathukalam, A., Watson, D. G., Breitling, R., Coombs, G. H., y Muller, S. (2014). Phosphoenolpyruvate carboxylase identified as a key enzyme in erythrocytic *Plasmodium falciparum* carbon metabolism. *PLoS Pathog*, 10(1), e1003876. doi:10.1371/journal.ppat.1003876
- 238 Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- 239 Tanaka, Y., Yamagata, S., Kitago, Y., Yamada, Y., Chimnaronk, S., Yao, M., y Tanaka, I. (2009). Deduced RNA binding mechanism of Thil based on structural and binding analyses of a minimal RNA ligand. *RNA*, 15, 1498-1506. doi:10.1261/rna.1614709
- 240 Tawk, L., Chicanne, G., Dubremetz, J. F., Richard, V., Payrastre, B., Vial, H. J., Roy, C., y Wengelnik, K. (2010). Phosphatidylinositol 3-phosphate, an essential lipid in *Plasmodium*, localizes to the food vacuole membrane and the apicoplast. *Eukaryotic Cell*, 9(10), 1519-1530. doi:10.1128/EC.00124-10
- 241 Taylor, E. B. (2017). Functional Properties of the Mitochondrial Carrier System. *Trends in Cell Biology*, 27(9), 633-644. doi:10.1016/j.tcb.2017.04.004
- 242 Teuscher, F., Gattón, Michelle L., Chen, N., Peters, J., Kyle, Dennis E., y Cheng, Q. (2010). Artemisinin-Induced Dormancy in *Plasmodium falciparum*: Duration, Recovery Rates, and Implications in Treatment Failure. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(9), 1362-1368. doi:10.1086/656476
- 243 Tewari, S. G., Swift, R. P., Reifman, J., Prigge, S. T., y Wallqvist, A. (2020). Metabolic alterations in the erythrocyte during blood-stage development of the malaria parasite. *Malar J*, 19(1), 94. doi:10.1186/s12936-020-03174-z
- 244 Tong, J. C., y Ng, L. F. (2011). Understanding infectious agents from an in silico perspective. *Drug Discovery Today*, 16(1-2), 42-49. doi:10.1016/j.drudis.2010.10.007
- 245 Uhlemann, A. C., Cameron, A., Eckstein-Ludwig, U., Fischbarg, J., Iserovich, P., Zuniga, F. A., East, M., Lee, A., Brady, L., Haynes, R. K., y Krishna, S. (2005). A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(7), 628-629. doi:10.1038/nsmb947
- 246 Vaid, A., Ranjan, R., Smythe, W. A., Hoppe, H. C., y Sharma, P. (2010). PIP3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from *Plasmodium falciparum*, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. *Blood*, 115(12), 9. doi:10.1182/blood.2009-08-238972
- 247 Vaites, L. P., Paulo, J. A., Huttlin, E. L., y Harper, J. W. (2018). Systematic Analysis of Human Cells Lacking ATG8 Proteins Uncovers Roles for GABARAPs and the CCZ1/MON1 Regulator C18orf8/RMC1 in Macroautophagic and Selective Autophagic Flux. *Molecular and Cellular Biology*, 38(1), 21. doi:10.1128/mcb
- 248 Vaughan, A. M., O'Neill, M. T., Tarun, A. S., Camargo, N., Phuong, T. M., Aly, A. S. I., Cowman, A. F., y Kappe, S. H. I. (2009). Type II fatty acid synthesis is essential only for malaria parasite late liver stage development. *Cellular Microbiology*, 11(3), 506-520. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01270.x
- 249 Vetter, I. R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J. r., y Wittinghofer, A. (1999). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature*, 398, 39-46.
- 250 Vial, H. J., y Mamoun, C. B. (2005). Chapter 17 *Plasmodium* Lipids Metabolism and Function. In I. W. Sherman (Ed.), *Molecular Approaches to Malaria*.
- 251 Voet, D., y Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*.
- 252 Vreden, S. G., Jitan, J. K., Bansie, R. D., y Adhin, M. R. (2013). Evidence of an increased incidence of day 3 parasitaemia in Suriname: an indicator of the emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemether. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(8), 968-973. doi:10.1590/0074-0276130167
- 253 Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G. K., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S., y Mcfadden, G. I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12352-12357.
- 254 Wang, J., Xu, C., Lun, Z. R., y Meshnick, S. R. (2017). Unpacking 'Artemisinin Resistance'. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(6), 506-511. doi:10.1016/j.tips.2017.03.007
- 255 Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumieny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., y Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303. doi:10.1093/nar/gky427
- 256 Wein, S., Ghezal, S., Bure, C., Maynadier, M., Perigaud, C., Vial, H. J., Lefebvre-Tournier, I., Wengelnik, K., y Cerdan, R. (2018). Contribution of the precursors and interplay of the pathways in the phospholipid metabolism of the malaria parasite. *Journal of Lipid Research*, 59(8), 1461-1471. doi:10.1194/jlr.M085589
- 257 Wezena, C. A., Alisch, R., Golzmann, A., Liedgens, L., Staudacher, V., Pradel, G., y Deponte, M. (2017). The cytosolic glyoxalases of *Plasmodium falciparum* are dispensable during asexual blood-stage development. *Microb Cell*, 5(1), 32-41. doi:10.15698/mic2018.01.608
- 258 White, N. J. (2011). Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal*, 10(297), 35.

- 259 **WHO.** (2010). *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.* Extraído de: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500470/en/>
- 260 **WHO.** (2011). *Global plan for artemisinin resistance containment (GPARC).* Extraído de: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500838/en/>
- 261 **WHO.** (2013). *Larval source management – a supplementary measure for malaria vector control.* Extraído de: Geneva: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241505604/en/>
- 262 **WHO.** (2014). *Status report on artemisinin resistance* Extraído de: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/update-artemisinin-resistance-jan2014/en/>
- 263 **WHO.** (2015). *Indoor residual spraying: An operational manual for IRS for malaria transmission, control and elimination.* Second edition. Extraído de: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241508940/en/>
- 264 **WHO.** (2018a). *Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy.* Extraído de: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274362>
- 265 **WHO.** (2018b). *WORLD MALARIA REPORT.* Extraído de: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>
- 266 **Wikipedia.** (2020a). Greater Mekong Subregion. Extraído de: https://en.wikipedia.org/wiki/Greater_Mekong_Subregion
- 267 **Wikipedia.** (2020b). Río Mekong. Extraído de: https://es.wikipedia.org/wiki/Río_Mekong
- 268 **Wilairat, P., Kumpornsin, K., y Chookajorn, T.** (2016). *Plasmodium falciparum* malaria: Convergent evolutionary trajectories towards delayed clearance following artemisinin treatment. *Med Hypotheses*, 90, 19-22. doi:10.1016/j.mehy.2016.02.022
- 269 **Winterberg, M., Rajendran, E., Baumeister, S., Bietz, S., Kirk, K., y Lingelbach, K.** (2012). Chemical activation of a high-affinity glutamate transporter in human erythrocytes and its implications for malaria-parasite-induced glutamate uptake. *Blood*, 119(15), 3604-3612. doi:10.1182/blood-2011-10-386003
- 270 **Wong, M. W., Henry, R. W., Ma, B., Kobayashi, R., Klages, N., Matthias, P., Strubin, M., y Hernandez, N.** (1998). The Large Subunit of Basal Transcription Factor SNAPc Is a Myb Domain Protein That Interacts with Oct-1. *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 368-377.
- 271 **Woodrow, C. J., Penny, J. I., y Krishna, S.** (1999). Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* Expresses a High Affinity Facilitative Hexose Transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 7272-7277.
- 272 **Wrenger, C., Müller, I. B., Silber, A. M., Jordanova, R., Lamzin, V. S., y Groves, M. R.** (2012). Aspartate Aminotransferase - Bridging Carbohydrate and Energy Metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Current Drug Metabolism*, 13, 332-336.
- 273 **Wrenger, C., y Muller, S.** (2003). Isocitrate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *European Journal of Biochemistry*, 270(8), 1775-1783. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03536.x
- 274 **Xiao, J., Chen, X. W., Davies, B. A., Saltiel, A. R., Katzmann, D. J., y Xu, Z.** (2009). Structural basis of Ist1 function and Ist1-Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 20(15), 3514-3524. doi:10.1091/mbc.E09-05-0403
- 275 **Xie, S. C., Dogovski, C., Hanssen, E., Chiu, F., Yang, T., Crespo, M. P., Stafford, C., Batinovic, S., Teguh, S., Charman, S., Klonis, N., y Tilley, L.** (2016). Haemoglobin degradation underpins the sensitivity of early ring stage *Plasmodium falciparum* to artemisinins. *Journal of Cell Science*, 129(2), 406-416. doi:10.1242/jcs.178830
- 276 **Xu, D., Joglekar, A. P., Williams, A. L., y Hay, J. C.** (2000). Subunit structure of a mammalian ER/Golgi SNARE complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39631-39639. doi:10.1074/jbc.M007684200
- 277 **Yang, T., Yeoh, L. M., Tutor, M. V., Dixon, M. W., McMillan, P. J., Xie, S. C., Bridgford, J. L., Gillett, D. L., Duffy, M. F., Ralph, S. A., McConville, M. J., Tilley, L., y Cobbold, S. A.** (2019). Decreased K13 Abundance Reduces Hemoglobin Catabolism and Proteotoxic Stress, Underpinning Artemisinin Resistance. *Cell Rep*, 29(9), 2917-2928 e2915. doi:10.1016/j.celrep.2019.10.095
- 278 **Yu, B. P.** (1994). Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139-162.
- 279 **Zanghi, G., Vembar, S. S., Baumgarten, S., Ding, S., Guizzetti, J., Bryant, J. M., Mattei, D., Jensen, A. T. R., Renia, L., Goh, Y. S., Sauerwein, R., Hermsen, C. C., Franetich, J. F., Bordessoulles, M., Silvie, O., Soulard, V., Scatton, O., Chen, P., Mecheri, S., Mazier, D., y Scherf, A.** (2018). A Specific PfEMP1 Is Expressed in *P. falciparum* Sporozoites and Plays a Role in Hepatocyte Infection. *Cell Rep*, 22(11), 2951-2963. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.075
- 280 **Zhang, M., Gallego-Delgado, J., Fernandez-Arias, C., Waters, N. C., Rodriguez, A., Tsuji, M., Wek, R. C., Nussenzweig, V., y Sullivan, W. J., Jr.** (2017). Inhibiting the *Plasmodium* eIF2alpha Kinase PK4 Prevents Artemisinin-Induced Latency. *Cell Host Microbe*, 22(6), 766-776 e764. doi:10.1016/j.chom.2017.11.005
- 281 **Zolg, J. W., Macleod, A. J., Scaife, J. G., y Beaudoin, R. L.** (1984). The accumulation of lactic acid and its influence on the growth of *Plasmodium falciparum* in synchronized cultures. *In Vitro*, 20(3), 205-215.

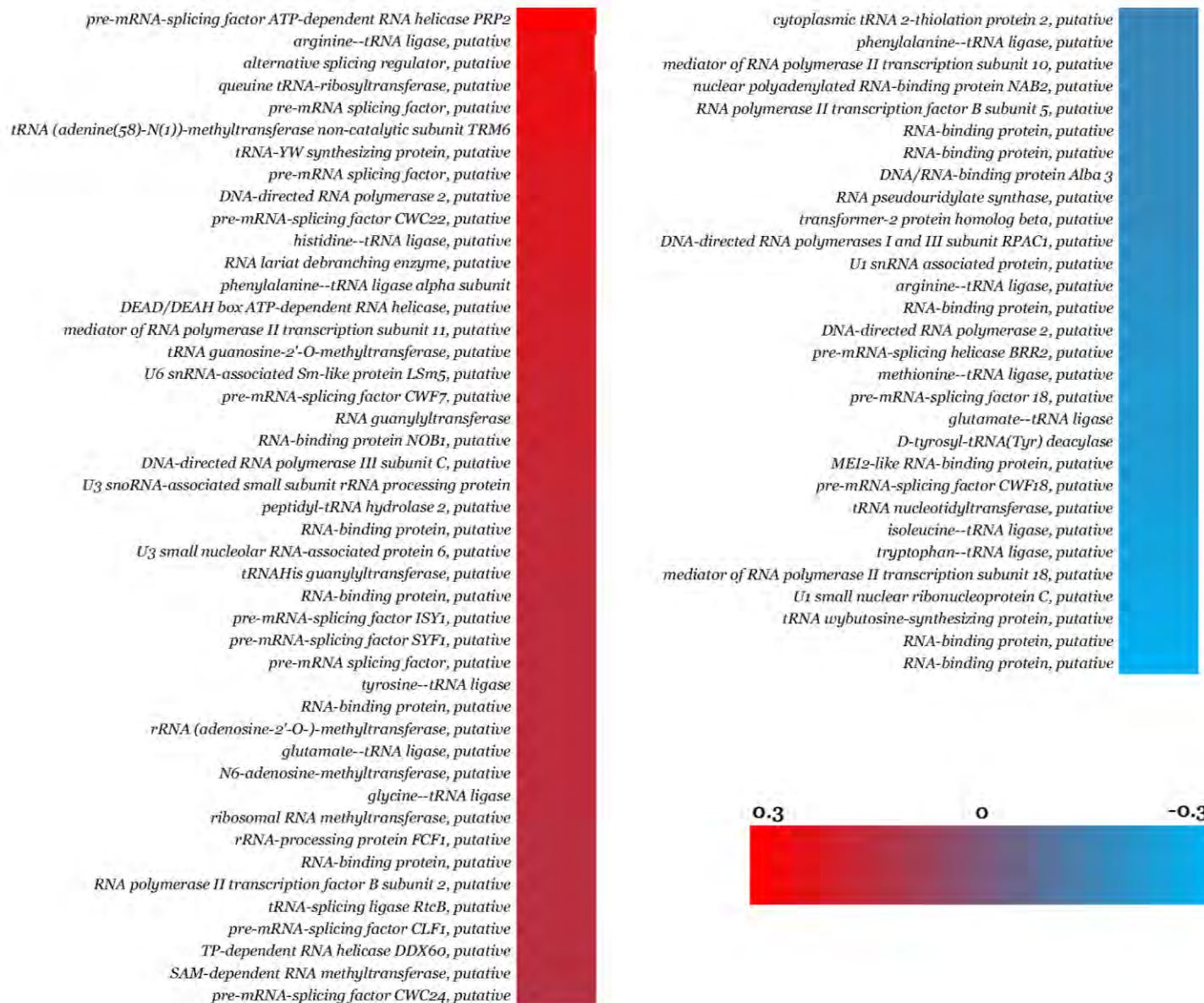
11 ANEXOS

Tabla 4 Valores de diferencia en la energía libre de Gibbs (ΔG) para los acoplamientos moleculares mostrados en la **Figura 14** para la conformación C y M, con los sustratos α -Cetoglutarato y citrato

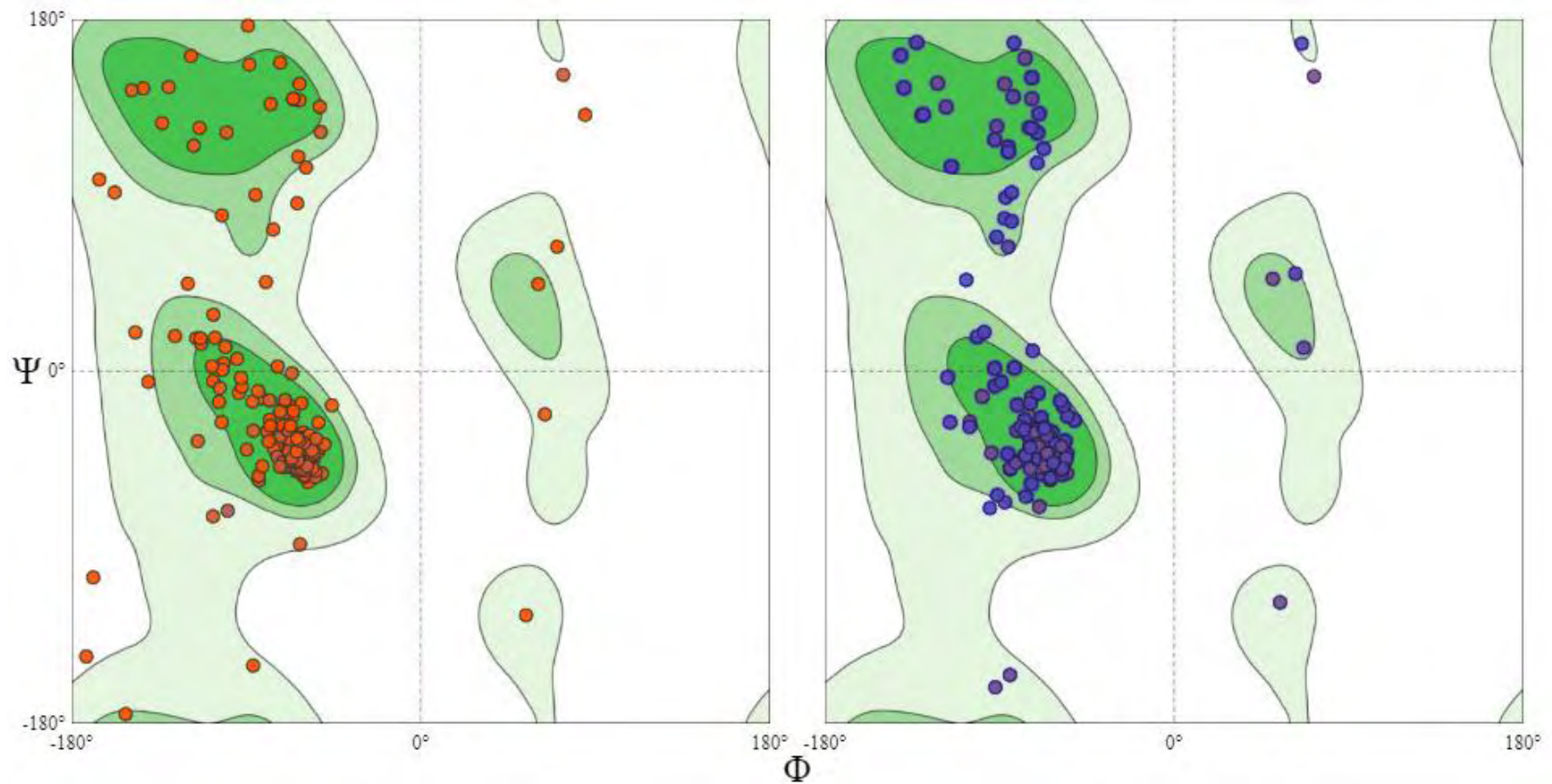
		Sustrato	
		α -Cetoglutarato	Citrato
Conformación	C	-24.8484	-18.3743
	M	-31.0671	-21.3305

Tabla 5 Valores de Fullfitness (ΔG) para los acoplamientos moleculares mostrados en la **Figura 14** para la conformación C y M, con los sustratos α -Cetoglutarato y citrato

		Sustrato	
		α -Cetoglutarato	Citrato
Conformación	C	-1819.8691	-1853.3181
	M	-1415.8552	-1461.271



Anexo 1 Genes implicados en el procesamiento del material genético con función conocida (extraído de Mok et al. (2015))



Anexo 2 Diagramas de Ramachandran para el modelo de la proteína PfCOCP en la conformación *M* obtenida del servidor SwissDock (puntos en color naranja) y refinamiento en el servidor GalaxyWEB (color azul). Los diagramas fueron obtenidos con el servidor SwissDock.

H1

H2

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100															
<i>P. falciparum</i> (PF3D7_1223800)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PF7G8_120028500)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFDD2_120028200)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFGA01_120028500)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFGB4_120028400)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFHB3_120028600)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFKE01_120028800)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFKH02_120028800)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFML01_120029000)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFSN01_120029400)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFIT_120028900)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFKH01_120030200)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. falciparum</i> (PFCD01_120028700)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. praefalciparum</i> (PFRFG01_1231)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. reichenowi</i> (PRCDC_1223100)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. reichenowi</i> (PRG01_1227100)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. gaboni</i> (PGABG01_1222600)	MS	-----	NDL	INGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFKNI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLI	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDMN				
<i>P. yoelii</i> (PY17X_1441200)	NE	EKN	EGV	IKNG	-AY	KNL	ISGS	FLHCL	TGTL	GLPL	EWVK	TRMC	IYRN	ENTINS	FINI	YNKGV	GHFY	GGFY	AKLV	ESST	KGAV	LLSKE	QIK	KVL	NDLN	
<i>P. berghei</i> (PBANKA_1438700)	NE	EKN	EGV	IKNG	-AY	KNL	ISGS	VLHCL	TGTL	GLPL	EWVK	TRMC	IYRN	ENTITS	FINI	YNKGV	GHFY	GGFY	AKLV	ESST	KGAV	LLSKE	QIK	KVL	NDLN	
<i>P. chabaudi</i> (PCHAS_1440700)	NE	EKN	EGV	IKSG	AA	YRNL	ISGS	FLHCL	TATL	GLPL	EWVK	TRMC	IYRN	ENTISS	FANI	YNKGV	GHFY	GGFY	AKLV	ESST	KGAV	LLSKE	QIK	KVL	NDLN	
<i>P. vivax</i> (PVP01_1442000)	MS	-----	KDL	VNGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFASI	YSKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. vivax</i> (VUZ98943)	MS	-----	KDL	VNGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFASI	YSKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. vivax</i> (PVX_123820)	MS	-----	KDL	VNGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFASI	YSKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. vivax</i> (PVX_254300)	MS	-----	KDL	VNGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFASI	YSKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. vivax</i> (EDL42584)	MS	-----	KDL	VNGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFASI	YSKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. vivax</i> (EDL47599)	MS	-----	KDL	VNGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFASI	YSKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. cynomolgi</i> (PCYB_144950)	MS	-----	KDL	MNGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFTNI	YNKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. cynomolgi</i> (PcyM_1444200)	MS	-----	KDL	MNGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFTNI	YNKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. knowlesi</i> (PKNH_1443000)	MS	-----	KDL	VSGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFCTI	YNKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. knowlesi</i> (PKNOH_S140261000)	MS	-----	KDL	VSGS	ILHCL	ETAS	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIK	SFCTI	YNKGV	GQFY	AGFY	AKLV	ESSS	KGAV	LLSKE	HMIN	LCN	NLNF				
<i>P. malariae</i> (SBT80915)	MS	-----	KDL	INGS	ILHCL	ETAT	LGMP	LEWVK	TRMC	IYRN	ENTIV	KSF	FINI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLV	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDLN			
<i>P. malariae</i> (PmUG01_14058100)	MS	-----	KDL	INGS	ILHCL	ETAT	LGMP	LEWVK	TRMC	IYRN	ENTIV	KSF	FINI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLV	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDLN			
<i>P. malariae</i> (XP_028864474)	MS	-----	KDL	INGS	ILHCL	ETAT	LGMP	LEWVK	TRMC	IYRN	ENTIV	KSF	FINI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLV	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDLN			
<i>P. ovale</i> (PocGH01_14049500)	NE	ER	-EGG	KKRE	KVSK	NLL	NGS	ILHCL	ETAT	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIV	KSF	FINI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLV	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDLN
<i>P. ovale</i> (SCQ17050)	NE	ER	-EGG	KKRE	KVSK	NLL	NGS	ILHCL	ETAT	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIV	KSF	FINI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLV	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDLN
<i>P. ovale</i> (SBT82568)	NE	ER	-EGG	KKRE	KVSK	NLL	NGS	ILHCL	ETAT	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIV	KSF	FINI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLV	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDLN
<i>P. ovale</i> (SBS88545)	NE	ER	-EGG	KKRE	KVSK	NLL	NGS	ILHCL	ETAT	LGMP	LEWVK	TRMC	VYRN	ENTIV	KSF	FINI	YNKGL	GQFY	AGFY	AKLV	ESGS	KGAV	LLSKE	QIK	KVC	NDLN

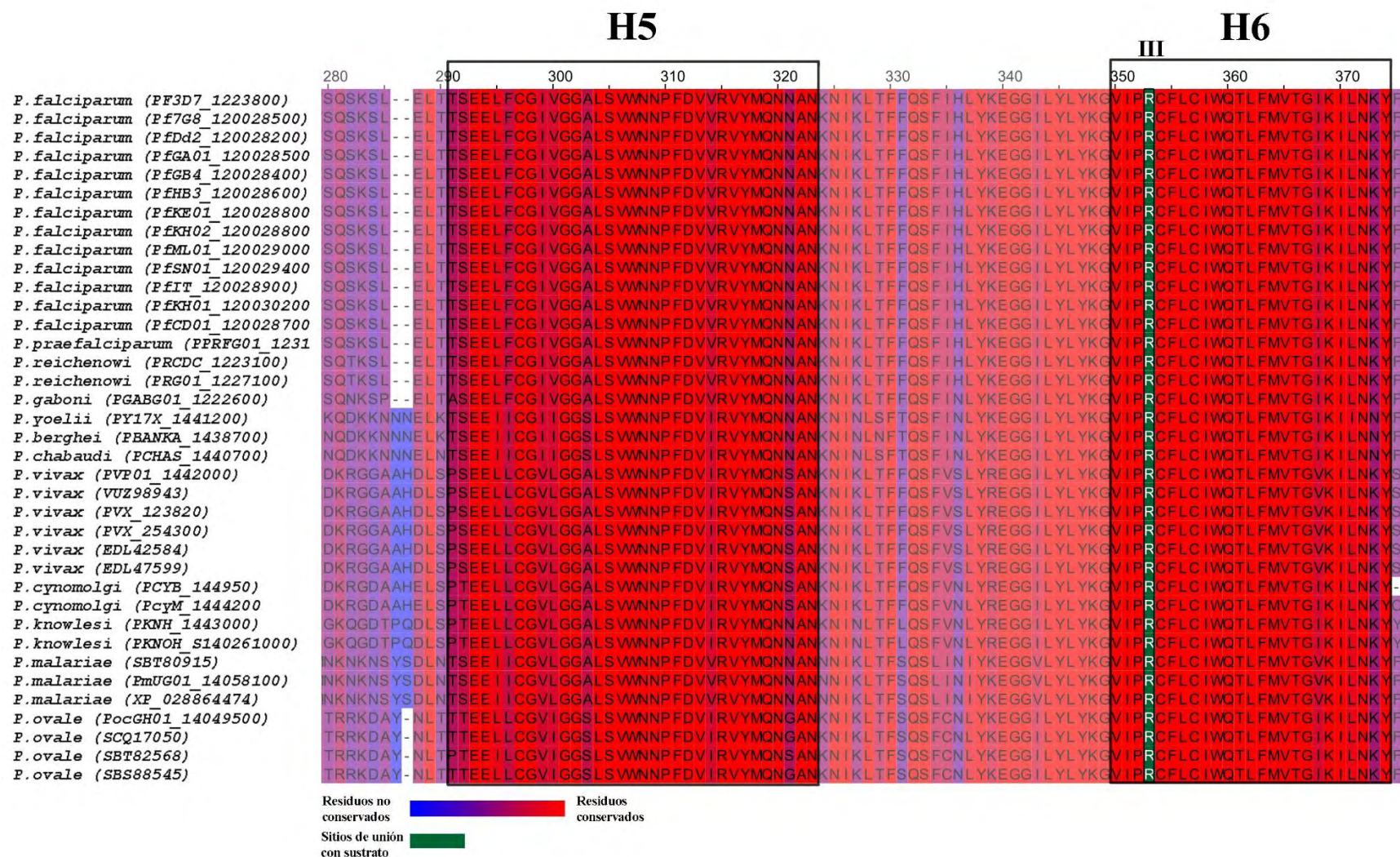
H3

H4

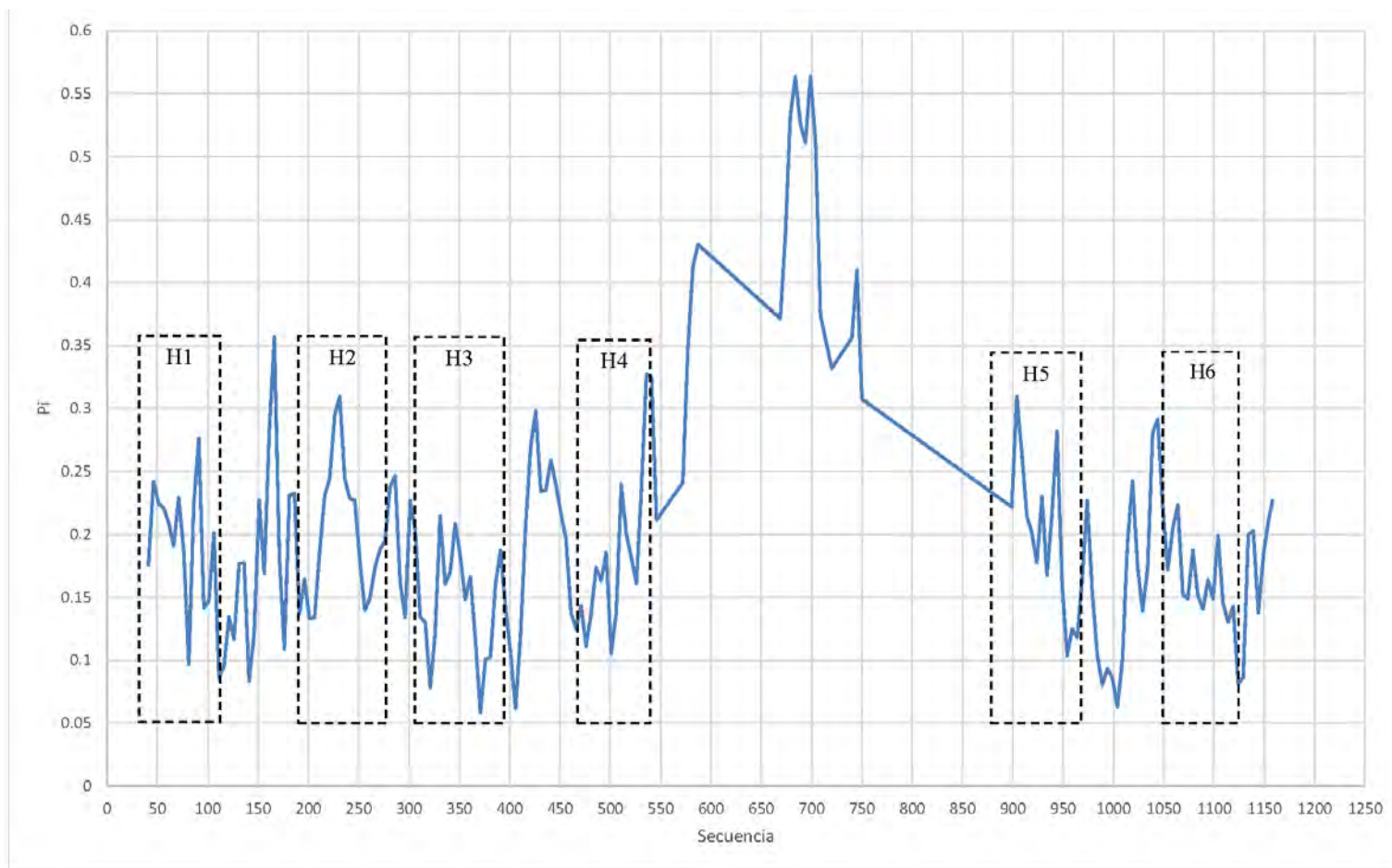
II

	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																							
<i>P. falciparum</i> (PF3D7_1223800)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PF7G8_120028500)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFDD2_120028200)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFGA01_120028500)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFGB4_120028400)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFHB3_120028600)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFKE01_120028800)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFKH02_120028800)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFML01_120029000)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFsn01_120029400)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFIT_120028900)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFKH01_120030200)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. falciparum</i> (PFCD01_120028700)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. praefalciparum</i> (PFRFG01_1231)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. reichenowi</i> (PRCDC_1223100)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. reichenowi</i> (PRG01_1227100)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. gaboni</i> (PGABG01_1222600)	NKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	IHF	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IRN	I	V	M	E	R	K	K	N	R	K	N	K	N	----		
<i>P. yoelii</i> (PY17X_1441200)	VNNTIS	SGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKN	INYKDKL	IS	FKHSG	ISTLY	KGNS	AMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	VRN	IY	IS	K	K	Q	K	K	N	E	R	N	----			
<i>P. berghei</i> (PBANKA_1438700)	VNNTIS	SGFVGG	ACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKN	INYKEKL	IY	FKHSG	ISTLY	KGNS	AMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	VRN	IY	IS	R	K	Q	K	K	N	E	----					
<i>P. chabaudi</i> (PCHAS_1440700)	VNSTIS	SGFVGG	ACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKN	INYKEKL	IS	FKHSG	ISTLY	KGNS	AMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	VRN	MY	IN	R	K	Q	K	K	M	E	----					
<i>P. vivax</i> (PVP01_1442000)	FNKTTSGF	IGGATGG	CQSFVMT	PCTFF	ITAS	DRK	INYKKKL	VD	FRNKG	FTTL	YKGN	SAMCL	RQG	TN	WAS	RQGL	TEW	VR	HLF	I	E	R	K	R	K	V	G	G	----					
<i>P. vivax</i> (VUZ98943)	FNKTTSGF	IGGATGG	CQSFVMT	PCTFF	ITAS	DRK	INYKKKL	VD	FRNKG	FTTL	YKGN	SAMCL	RQG	TN	WAS	RQGL	TEW	VR	HLF	I	E	R	K	R	K	V	G	G	----					
<i>P. vivax</i> (PVX_123820)	FNKTTSGF	IGGATGG	CQSFVMT	PCTFF	ITAS	DRK	INYKKKL	VD	FRNKG	FTTL	YKGN	SAMCL	RQG	TN	WAS	RQGL	TEW	VR	HLF	I	E	R	K	R	K	V	G	G	----					
<i>P. vivax</i> (PVX_254300)	FNKTTSGF	IGGATGG	CQSFVMT	PCTFF	ITAS	DRK	INYKKKL	VD	FRNKG	FTTL	YKGN	SAMCL	RQG	TN	WAS	RQGL	TEW	VR	HLF	I	E	R	K	R	K	V	G	G	----					
<i>P. vivax</i> (EDL42584)	FNKTTSGF	IGGATGG	CQSFVMT	PCTFF	ITAS	DRK	INYKKKL	VD	FRNKG	FTTL	YKGN	SAMCL	RQG	TN	WAS	RQGL	TEW	VR	HLF	I	E	R	K	R	K	V	G	G	----					
<i>P. vivax</i> (EDL47599)	FNKTTSGF	IGGATGG	CQSFVMT	PCTFF	ITAS	DRK	INYKKKL	VD	FRNKG	FTTL	YKGN	SAMCL	RQG	TN	WAS	RQGL	TEW	VR	HLF	I	E	R	K	R	K	V	G	G	----					
<i>P. cynomolgi</i> (PCYB_144950)	INQTTSGF	IGGATGG	CQSFVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKKKL	VD	FRNTG	FTTL	YKGN	SAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	VRN	LF	I	E	R	K	R	K	A	G	G	S	R	A	G	G	S
<i>P. cynomolgi</i> (PcyM_1444200)	INQTTSGF	IGGATGG	CQSFVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKKKL	VD	FRNTG	FTTL	YKGN	SAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	VRN	LF	I	E	R	K	R	K	A	G	G	S	R	A	G	G	S
<i>P. knowlesi</i> (PKNH_1443000)	INQTTSGF	IGGAVGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYREKL	AD	IKNGG	FTTL	YKGN	CAMCL	RQG	TN	WAS	RQGL	TEW	VRN	LF	I	E	R	K	R	K	A	E	R	L	R	Q	T	E	G
<i>P. knowlesi</i> (PKNH_S140261000)	INQTTSGF	IGGAVGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYREKL	AD	IKNGG	FTTL	YKGN	CAMCL	RQG	TN	WAS	RQGL	TEW	VRN	LF	I	E	R	K	R	K	A	E	R	L	R	Q	T	E	G
<i>P. malariae</i> (SBT80915)	INKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	LY	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEF	IRN	VF	I	Q	C	K	D	K	T	A	K	R	N	S	N	N	
<i>P. malariae</i> (PmUG01_14058100)	INKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	LY	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEF	IRN	VF	I	Q	C	K	D	K	T	A	K	R	N	S	N	N	
<i>P. malariae</i> (XP_028864474)	INKTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	DKK	INYKEKL	LY	FKNTG	ITTL	YKGN	TAMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEF	IRN	VF	I	Q	C	K	D	K	T	A	K	R	N	S	N	N	
<i>P. ovale</i> (PocGH01_14049500)	INSTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	VENK	INYREK	IFS	FQNGG	ICTLY	KGNT	AMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IR	SMF	I	E	R	K	K	K	R	M	E	R	----				
<i>P. ovale</i> (SCQ17050)	INSTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	VENK	INYREK	IFS	FQNGG	ICTLY	KGNT	AMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IR	SMF	I	E	R	K	K	K	R	M	E	R	----				
<i>P. ovale</i> (SBT82568)	INSTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	VENK	INYRDK	IFS	FQNGG	ICTLY	KGNT	AMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IR	SMF	I	E	R	K	K	K	K	M	E	K	E	----			
<i>P. ovale</i> (SBS88545)	INSTTSGF	IGGACGG	CQSLVMT	PCTFF	ITAS	VENK	INYREK	IFS	FQNGG	ICTLY	KGNT	AMCL	RQG	TN	WAS	RQG	TEW	IR	SMF	I	E	R	K	K	K	R	M	E	R	----				

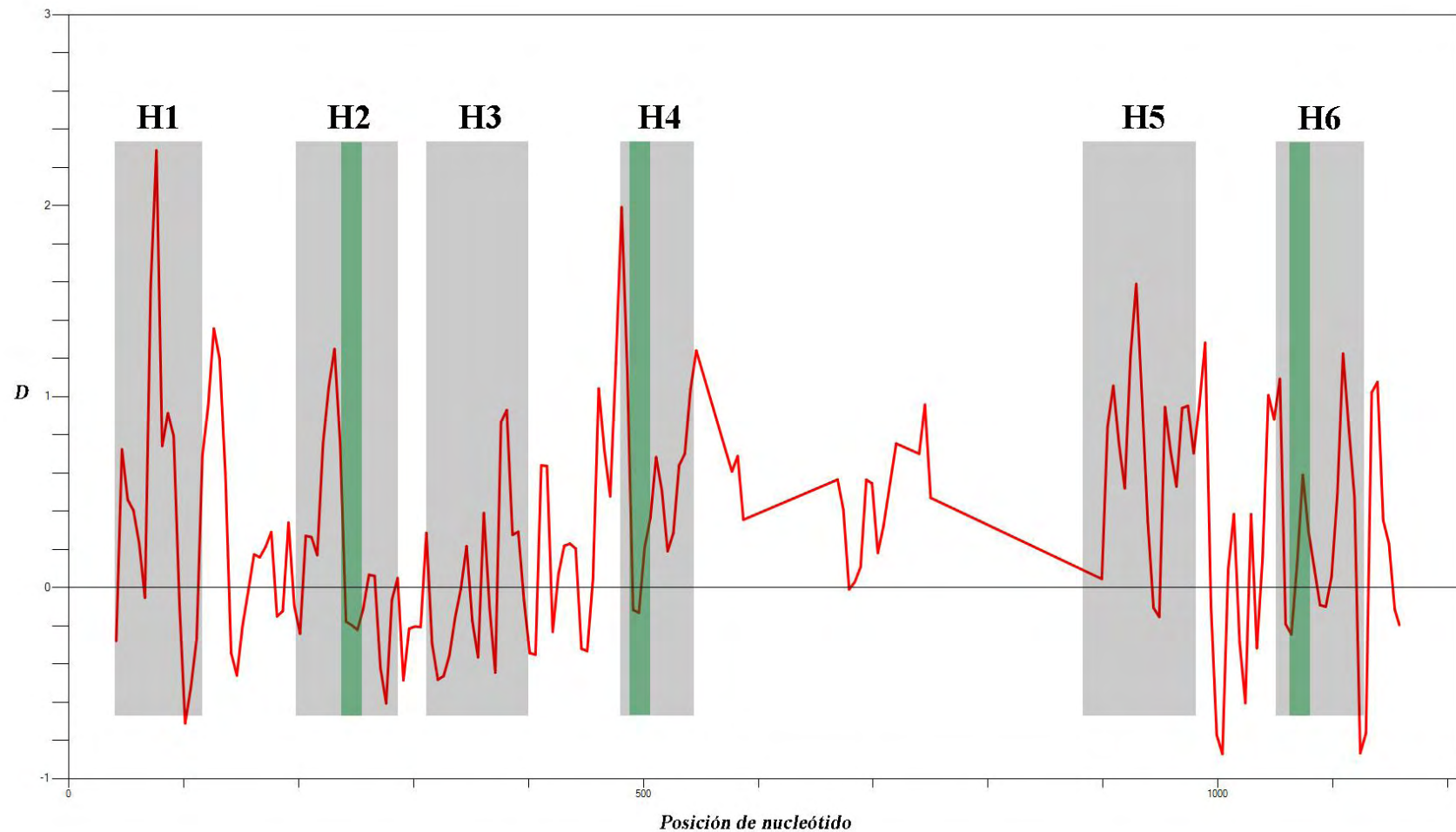
	200	210	220	230	240	250	260	270	280
<i>P. falciparum</i> (PF3D7_1223800)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (Pf7G8_120028500)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PFDd2_120028200)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PFGA01_120028500)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PFGB4_120028400)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PFHB3_120028600)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PfKE01_120028800)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PfKH02_120028800)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PFML01_120029000)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PFSN01_120029400)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PfIT_120028900)	DDINN	VKG-	MI	FSGNY	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PfKH01_120030200)	DDINN	VKG-	MI	FSGNY	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. falciparum</i> (PfCD01_120028700)	DDINN	VKG-	MI	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. praefalciparum</i> (PPRFG01_1231)	DDINN	VKG-	I	FSGND	IT	TDK	IKH-	NNNNNNNNNN	TS
<i>P. reichenowi</i> (PRCDC_1223100)	DDINN	VKG-	V	FSGND	IT	TNK	IKH-	NNNNNN	TS
<i>P. reichenowi</i> (PRG01_1227100)	DDINN	VKG-	V	FSGND	IT	TNK	IKH-	NNNNNN	TS
<i>P. gaboni</i> (PGABG01_1222600)	QDINN	IKG-	V	FSGNE	IT	RNK	IG-	NNNNNN	TS
<i>P. yoelii</i> (PY17X_1441200)	EIKEI	-	-	KESE	QRPND	VKI	-	CDISNPNK	FK
<i>P. berghei</i> (PBANKA_1438700)	KEY-	-	-	DNGK	IPDN	IKI	-	CDISNPNK	FN
<i>P. chabaudi</i> (PCHAS_1440700)	KEYNNVEN	-	-	VIKGSGKTPGS	IKI	-	-	CDISNPNK	LN
<i>P. vivax</i> (PVP01_1442000)	-	-	-	AGVE	VGKNE	VT	DKRGHV	FQPTPAKD	TNP
<i>P. vivax</i> (VUZ98943)	-	-	-	AGVE	VGKNE	VT	DKRGHV	FQPTPAKD	TNP
<i>P. vivax</i> (PVX_123820)	-	-	-	AGVE	VGKNE	VT	DKRGHV	FQPTPAKD	THP
<i>P. vivax</i> (PVX_254300)	-	-	-	AGVE	VGKNE	VT	DKRGHV	FQPTPAKD	THP
<i>P. vivax</i> (EDL42584)	-	-	-	AGVE	VGKNE	VT	DKRGHV	FQPTPAKD	THP
<i>P. vivax</i> (EDL47599)	-	-	-	AGVE	VGKNE	VT	DKRGHV	FQPTPAKD	THP
<i>P. cynomolgi</i> (PCYB_144950)	SDRQSDRQAD	HQANRQTL	FKND	AMDKRGQV	HQS	TP	TKD	THS	LD
<i>P. cynomolgi</i> (PcyM_1444200)	SDRQSDRQAD	HQANRQTL	FKND	AMDKRGQV	HQS	TP	TKD	THS	LD
<i>P. knowlesi</i> (PKNH_1443000)	-	-	-	QVGLKNE	VMHKGNN	FHQ	STPKD	THS	IG
<i>P. knowlesi</i> (PKNH_S140261000)	-	-	-	QVGLKNE	VMHKGNN	FHQ	STPKD	THS	IG
<i>P. malariae</i> (SBT80915)	ENNNDANN	ISNSVN	ISYNSN	NNNNNNKNDNNK	YNNN	YNGEHNNY	YDKNKCNNKNA	INKSGH	INKVQTEMDASKVHL
<i>P. malariae</i> (PmUG01_14058100)	ENNNDANN	ISNSVN	ISYNSN	NNNNNNKNDNNK	YNNN	YNGEHNNY	YDKNKCNNKNA	INKSGH	INKVQTEMDASKVHL
<i>P. malariae</i> (XP_028864474)	ENNNDANN	ISNSVN	ISYNSN	NNNNNNKNDNNK	YNNN	YNGEHNNY	YDKNKCNNKNA	INKSGH	INKVQTEMDASKVHL
<i>P. ovale</i> (PocGH01_14049500)	GHEED	I	-	-	RRNV	DGQE	YK	I	KENYTNNAH
<i>P. ovale</i> (SCQ17050)	GHEED	I	-	-	RRNV	DGQE	YK	I	KENYTNNAH
<i>P. ovale</i> (SBT82568)	GHEED	I	-	-	RKND	DGQVYK	I	-	KENYTNNSH
<i>P. ovale</i> (SBS88545)	GHEED	I	-	-	RRNV	DGQE	YK	I	KENYTNNAH



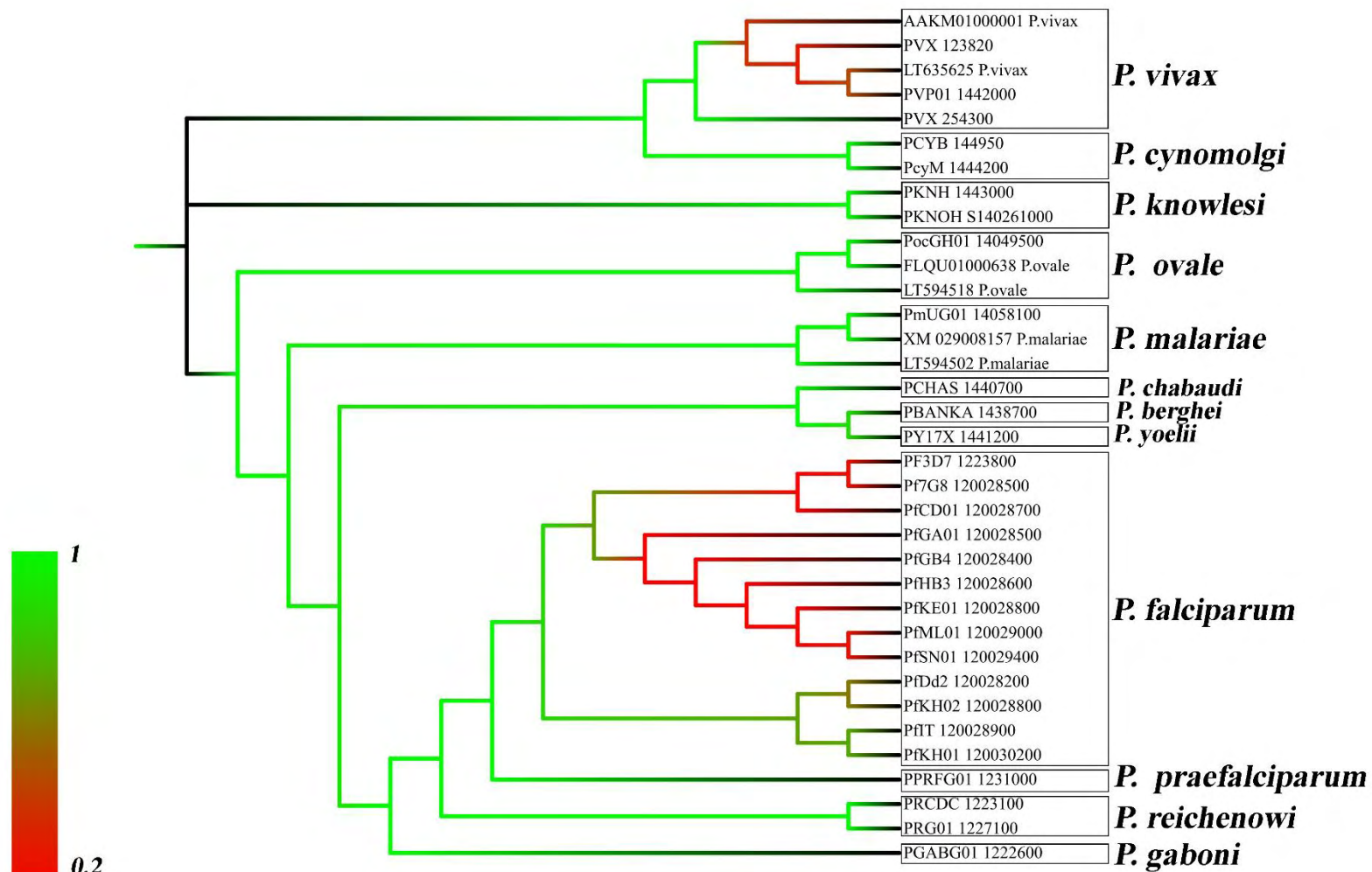
Anexo 3 Alineamiento de la proteína PfCOCP con sus homólogos en otras especies de *Plasmodium*, las regiones más conservadas se resaltan en rojo y las menos conservadas en azul, se delimitan los 6 segmentos transmembranales que componen el transportador (H1,2,3,4,5 y 6) y en verde se resaltan los sitios de unión al sustrato en los segmentos pares H2, H4 y H6.



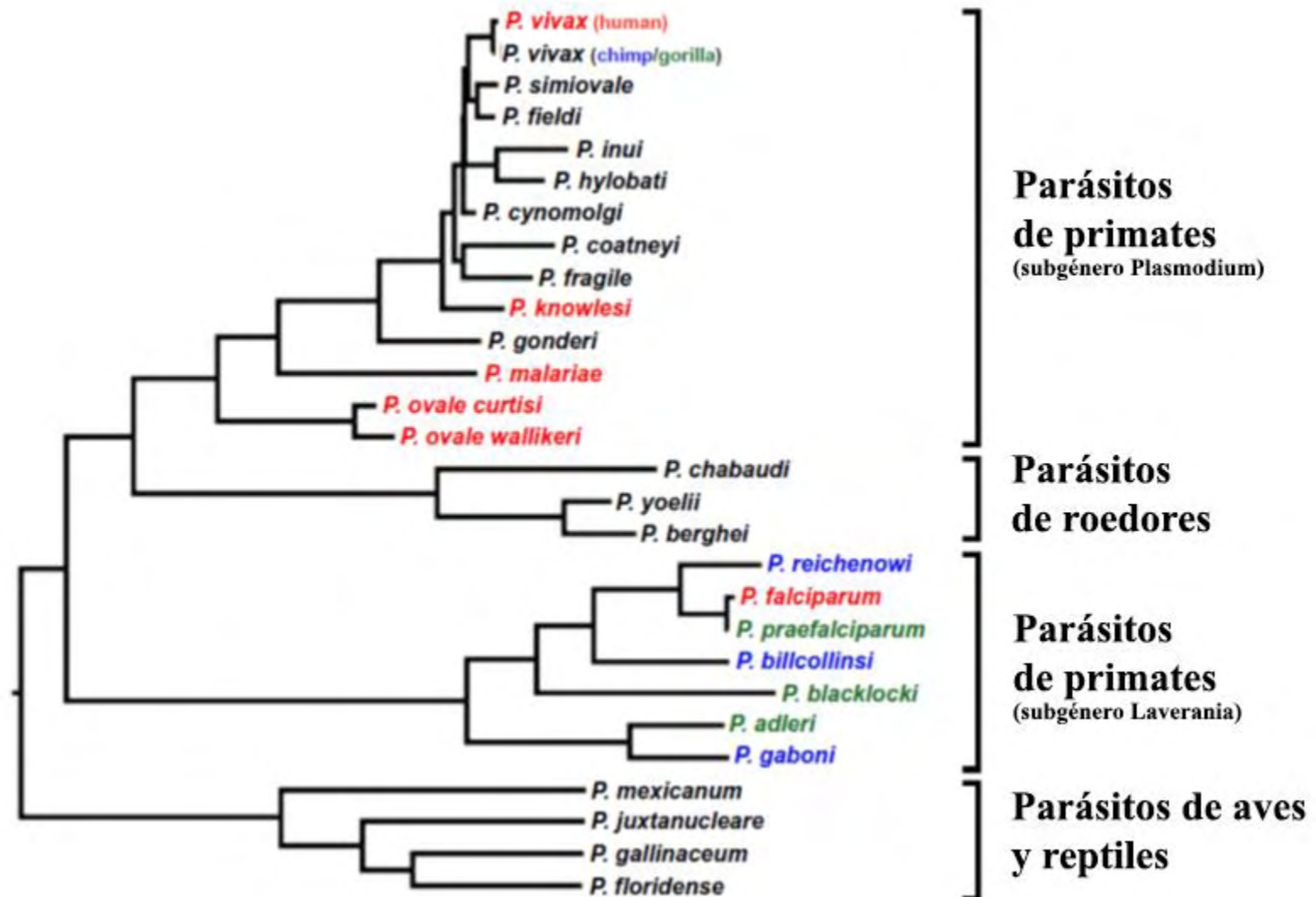
Anexo 4 Diversidad nucleotídica P_i (π) para las proteínas homólogas de PfCOCP en varias especies de Plasmodium, se delimitan las regiones que componen los 6 segmentos transmembranales del transportador



Anexo 5 *D* de Tajima en el alineamiento de los homólogos de PfCOCP para varias especies de *Plasmodium*, se resalta la ubicación de los segmentos transmembranales (H1, 2, 3, 4, 5 y 6) en gris, y los sitios de unión con el sustrato en verde.



Anexo 6 Árbol filogenético realizado en base a los homólogos del gen *PfCOCP* de diferentes especies de *Plasmodium* usando el método de máxima verosimilitud con el modelo de Tamura-Nei, distribución Gamma de 2,6 y 36,28% de sitios invariables. La certeza de las ramas se colorea de verde (1) a rojo (0.2) en base a 1000 réplicas realizadas con el método de Bootstrap. Árbol realizado obtenido usando MEGA X y graficado usando ItoI (Letunic y Bork, 2019).



Anexo 7 Árbol filogenético de diferentes de *Plasmodium* spp. realizado en base a 2.4kb del genoma mitocondrial. Extraído de Loy et al. (2017)