

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**PROTEÓMICA REDOX DE MEMBRANA DE
ERITROCITO HUMANO EN MALARIA Y
POLIMORFISMOS DE GRUPOS SANGUÍNEOS Y
G6PD.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Darío Manuel Méndez Cuadro

Bajo la dirección de los doctores

José Manuel Bautista Santa Cruz
Antonio Puyet Catalina

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-3402-4

© Darío Manuel Méndez Cuadro, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

**PROTEÓMICA REDOX DE MEMBRANA
DE ERITROCITO HUMANO EN
MALARIA Y POLIMORFISMOS DE
GRUPOS SANGUÍNEOS Y G6PD**

TESIS DOCTORAL



Darío Manuel Méndez Cuadro
Madrid, 2010

Memoria presentada por Darío Manuel Méndez Cuadro
para optar al grado de doctor en Bioquímica y Biología Molecular
por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, Septiembre de 2010



José Manuel Bautista Santa Cruz, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Universidad adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y **Antonio Puyet Catalina** Doctor en Biología y Profesor Titular de Universidad adscrito al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: “Proteómica redox de membrana del eritrocito humano en malaria y polimorfismos de grupos sanguíneos y G6PD” que presenta el licenciado en Farmacia D. Darío Manuel Méndez Cuadro ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo su supervisión y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada tesis doctoral.

En Madrid, a 1 de septiembre de dos mil diez.

Fdo. Prof. Dr. José Manuel Bautista Santa Cruz Fdo. Prof. Dr. Antonio Puyet Catalina

A mis padres y hermanos.

A mis hijos Jorge Darío, María Alejandra y Andrea Carolina.

A ti Erika, mi amor

Agradecimientos

Durante estos casi cuatro años he contado con el apoyo, la confianza y la amistad de muchas personas sin las cuales no hubiera sido posible alcanzar esta meta.

A mis tutores Chema y Antonio por haberme recibido en su laboratorio, brindarme su apoyo y confianza durante la toma de decisiones a lo largo de los trabajos de investigación que aquí se presentan y abrir las puertas para la colaboración con grupos de investigación de la Universidad de Cartagena.

A la profesora Amalia por sus valiosos consejos durante las reuniones científicas del grupo. De igual manera a los profesores del departamento Mila y Amando por su calidez humana.

Especial agradecimiento para María Luisa, Lola y Nacho de la unidad de proteómica de la UCM por su paciencia y valiosa colaboración en la obtención de los resultados. De la misma forma que Marisol, Silvia y Sergio de la Unidad de proteómica del CNB. A Cristina, por el aporte de sus valiosas muestras de sangre.

A mis compañeros de laboratorio, con los que he compartido el día a día en el laboratorio y de los que por supuesto he aprendido. Azar por su paciencia a la hora de instruirnos en el cultivo. María, Carlos, Ali, “la profe” Patricia, Isabel, Alejandra, Elena y Susi por su valiosa amistad, el empeño y la pasión que ponen en cada experimento.

A los nuevos amigos de fuera del laboratorio, Alberto, Kelly, Melissa, Ruddy y Pamela que hicieron más fácil la experiencia de ser inmigrante, tanto para mí como para mi familia.

A la Universidad de Cartagena, el programa de Becas Alban, Colfuturo y la Universidad Complutense por apoyo económico.

Finalmente, agradezco a Erika, Jorge Darío, María Alejandra y Andrea Carolina por su amor incondicional.

LISTA DE PUBLICACIONES ORIGINALES

Esta tesis doctoral se ha presentado según el formato de publicaciones y ha dado lugar a un conjunto de publicaciones originales enumeradas a continuación. En todas las publicaciones el autor de esta tesis doctoral es el primer autor, con la salvedad de la publicación I, siendo el responsable del diseño de los experimentos, el análisis de los resultados y la elaboración de los manuscritos.

- I. Azar Radfar, **Darío Méndez**, Carlos Moneriz, María Linares, Patricia Marín-García, Antonio Puyet, Amalia Diez & José M Bautista. SYNCHRONOUS CULTURE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* AT HIGH PARASITEMIA LEVELS. Nature protocols (2009) Vol. 4. Nº 12. Pág. 1899-1915.
- II. **Méndez, D**; Linares, M; Diez, A; Puyet, Antonio and Bautista J.M. Stress response and cytoskeletal proteins involved in erythrocyte membrane remodeling upon *Plasmodium falciparum* invasion are differentially carbonylated in G6PD A-deficiency. Free Radic. Biol. Med. (2011), doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.024
- III. **Darío Méndez**, Ma. Luisa Hernáez, Amalia Diez, Antonio Puyet and José M. Bautista. COMBINED PROTEOMIC APPROACHES FOR THE IDENTIFICATION OF SPECIFIC AMINO ACID RESIDUES MODIFIED BY 4-HYDROXY-2-NONENAL UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS. Journal of Proteome Research 2010, 9, 5770–5781.
- IV. **Darío Méndez**, M^a. Luisa Hernáez, Ali Naghi Kamalia, Amalia Diez, José M. Bautista and Antonio Puyet. DIFFERENTIAL HNE-CARBONYLATION OF BLOOD GROUP O ERYTHROCYTES CYTOSKELETAL PROTEINS: POSSIBLE ROLE IN PROTECTION AGAINST SEVERE MALARIA. Paper submitted to evaluation for publication.

Índice

	Pág.
Lista de Abreviaturas	XIII
Resumen	1
CAPÍTULO I.	
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	7
1 LA MALARIA	9
1.1 El ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i>.	9
1.2 <i>Plasmodium falciparum</i> remodela la membrana del eritrocito infectado.	14
1.2.1 Proteínas de membrana de los eritrocitos humanos	15
1.2.2 Proteínas de exportación de <i>Plasmodium falciparum</i> que remodelan la membrana plasmática del eritrocito infectado.	22
1.3 Estrés oxidativo en malaria.	26
1.3.1 Estrés oxidativo en eritrocitos humanos	27
1.3.2 Estrés oxidativo en eritrocitos infectados con <i>Plasmodium falciparum</i>	30
1.3.3 Mecanismos de acción de drogas antimaláricas que afectan el metabolismo redox del eritrocito.	32
2. POLIMORFISMOS ERITROCÍTARIOS PROTECTORES FRENTE A MALARIA GRAVE	35
2.1 Déficit de glucosa-6-fostato deshidrogenasa y su relación con malaria.	35
2.2 Polimorfismo de grupos sanguíneos ABO y su relación con la malaria	41
3. OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS: MECANISMOS DE OXIDACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL ESQUELETO CARBONADO DE UNA PROTEÍNA	47
3.1 Proteínas carboniladas: Mecanismos de oxidación que conducen a la carbonilación de las cadenas laterales de los aminoácidos	49
3.1.1 Carbonilación de proteínas mediada por aldehídos bio-activos.	51
3.2 Carbonilación de proteínas: disfunción celular y enfermedades.	54

3.3 Métodos generales de identificación y caracterización de proteínas carboniladas.	57
3.4 Métodos basados en espectrometría de masas para la caracterización molecular de proteínas carboniladas.	60
3.4.1 Métodos de ionización: ESI y MALDI.	62
3.4.2 Analizadores de masas: Trampa iónica y TOF.	66
3.4.3. Análisis de los fragmentos iónicos peptídicos.	70
4. JUSTIFICACIÓN.	73
5. HIPÓTESIS.	75
6. OBJETIVOS.	76
Capítulo VI.	
Discusión general.	243
Capítulo VII.	
Conclusiones.	261
Bibliografía.	265

Listado de abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
α 1-2FucTs:	Alfa-1,2-fucosil-transferasas
AQ:	Acuaporina
ARN:	Ácido ribonucleico
BHT:	Di- <i>tert</i> -4-butilhidroxitoluene
BSA:	Seroalbúmina bovina
CBB:	Azul brillante de Coomassie
CD55:	Factor acelerante de decaimiento del complemento
CID:	Disociación inducida por colisión
CPDA:	Citrato-fosfato-dextrosa-adenina
CR 1:	Receptor 1 de complemento
DAF:	Factor acelerante de decaimiento
DNPH:	Dinitrofenil hidrazina
2D-Gel:	Electroforesis bidimensional
2D-oxyblots:	Western blot oxidativo en dos dimensiones
EBA:	Proteína de eritrocito enlazante de antígenos
ESI:	Ionización electrospray
fL:	Femtolitro
FP:	ferri/ferroprotoporfirina IX
FT-ICS:	Analizador de masas de transformada de Fourier ión ciclotrón resonancia
G3PDH:	Gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa
G6PD:	Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa
Grx:	Glutarredoxina
GSH:	Glutación reducido
4-HNE:	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
HSP:	Proteínas de choque térmico
ICAM:	Molécula de adhesión intercelular

iRBC:	Eritrocitos parasitados por <i>P. falciparum</i>
KAHRP:	Asociaciones knob-proteínas ricas en histidina
KDa:	Kilodalton
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LTQ:	Trampa iónica lineal
MALDI:	Ionización/desorción en matriz asistida por láser
mARN:	Ácido ribonucleico mensajero
MS:	Espectrometría de masas
MS ⁿ :	Espectrometría de masas en tándem
NADP:	Nicotinadeninucleotido fosfato oxidado
NADPH:	Nicotinadeninucleotido fosfato reducido
p55:	Proteína de membrana de eritrocito de 55 KDa
<i>PfEMP-1</i> :	<i>P. falciparum</i> proteína 1 de membrana de eritrocito
PVM:	Membrana de la vacuola parasitófora
PVDF:	Poliviniliden-difluoruro
RBC:	Eritrocitos/glóbulos rojos
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
SBP-1:	Proteína 1 de enlace a citoesqueleto
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil-sulfato
SOD:	Superóxido dismutasa
TCP1:	T-complex protein 1
TOF:	Analizador de masa de tiempo de vuelo
TQ:	Analizador de masas de triple cuádruplo
UniHI:	Interactoma Humano Unificado
µm:	Micrómetros
µM:	Micromolar

RESUMEN

Anualmente cerca de un millón de muertes se producen en el planeta por causa de la malaria y las principales víctimas son niños menores de 5 años de la región subsahariana de África. Hasta la fecha se reconocen cinco especies de Plasmodium como las causantes de la malaria humana, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*; de las cuales *P. falciparum* es la especie más letal para el ser humano y la responsable de casi el 90% de las muertes reportadas.

Las formas graves de la enfermedad como la malaria cerebral, pulmonar y durante el embarazo se atribuyen a las alteraciones que causa *P. falciparum* a nivel de las proteínas de membrana del eritrocito parasitado. Como respuesta adaptativa del hospedador humano, en las zonas geográficas endémicas de malaria se han seleccionado diversos polimorfismos eritrocitarios que confieren cierto grado de resistencia a las manifestaciones clínicas más graves. Dentro de los cuales destacan, por su alta prevalencia, la anemia falciforme, las talasemias, la esferocitosis hereditaria, el déficit de G6PD y el predominio del grupo sanguíneo O entre otros.

La alta prevalencia de estos polimorfismos eritrocitarios en las regiones con alto índice o con historial de malaria sugiere que la relación entre el estado redox de los parásitos y su célula huésped resulta importante tanto para la supervivencia del patógeno, como para combatir su patología por el hombre. Así, se ha propuesto que *Plasmodium falciparum* incrementa el estrés oxidativo en el eritrocito infectado y que éste contribuye a la manifestación de síntomas graves de la enfermedad. Sin embargo, parece que un incremento adicional del estrés oxidativo, como en el déficit de G6PD, se reduce significativamente la virulencia de la infección.

La eliminación temprana de los eritrocitos infectados por fagocitosis se ha propuesto como mecanismo protector en los casos de anemia falciforme, talasemia y déficit de G6PD. La formación de complejos de alto peso molecular de agregados de banda-3, hemicromos, IgG y fragmentos C3b en la superficie del eritrocito parasitado está asociado a este mecanismo protector. Sin embargo, esta explicación no contempla los cambios moleculares globales que sufren las proteínas de membrana del eritrocito y que pudieran contribuir al mecanismo protector.

Por ello, con el fin de profundizar en el conocimiento de los potenciales cambios oxidativos que ocurren en las proteínas de membrana del eritrocito parasitado y la manera en que estos pueden afectar la relación parásito-huésped en dos de los polimorfismos eritrocitarios protectores como son el déficit de G6PD y los grupos sanguíneos del sistema ABO, se propuso llevar a cabo los estudios definidos en la presente tesis doctoral.

Para alcanzar este objetivo, desde el punto de vista experimental, fue necesaria la estandarización de dos procedimientos. El primero, consistió en la optimización de un protocolo de cultivo de alta densidad de parásitos sincronizados. Y el segundo, considerando que la carbonilación de las proteínas es una modificación irreversible y heterogénea que se utiliza como marcador de daño oxidativo, consistió en la puesta a punto de una metodología proteómica basada en espectrometría de masas, dirigida a la identificación de residuos de aminoácidos modificados por 4-Hidroxi-2-nonenal.

Las modificaciones de algunos de los parámetros del método de cultivo continuo propuesto originalmente por Trager y Jensen en 1976 se realizaron para producir cultivos con características deseables para subsiguientes análisis proteómicos. Así, ajustes relacionados con la calidad de los eritrocitos, valores de hematocrito, métodos de sincronización, características de los inóculos, condiciones de incubación y métodos de tinción permitieron cultivos de *P. falciparum* con una estrecha ventana de sincronización de 4 a 6 horas y parasitemias de hasta 60% de los diferentes estadios intraeritrocitarios del parásito.

De esta forma, mediante tratamiento de los cultivos cosechados con soluciones tamponadas de sorbitol se logró la obtención de fracciones ricas en proteínas de membrana de eritrocitos parasitados que han permitido a su vez el estudio de las modificaciones oxidativas que ocurren bajo condiciones normales de actividad y de déficit de G6PD y de polimorfismos de grupos sanguíneos ABO.

El déficit de G6PD es la eritroenzimopatía humana hereditaria más frecuente y se caracteriza en el eritrocito por una disminución en la capacidad de producción de potencial reductor en forma de NADPH. Esta condición convierte al eritrocito

deficitario en G6PD en una célula susceptible a estrés oxidativo y a ruptura, capaz de producir anemia hemolítica por exposición a agentes externos como drogas, alimentos o infecciones.

En eritrocitos no infectados y con la variante A- de déficit de G6PD, se identificaron dos proteínas del citoesqueleto de membrana (ankirina y proteína banda 4.1) diferencialmente carboniladas en comparación con eritrocitos no deficitarios. Por otra parte, en muestras de cultivos parasitarios sobre eritrocitos con déficit de G6PD A- cosechados durante la fase de trofozoitos maduros se identificaron 15 proteínas carboniladas exclusivas de esta condición.

El análisis comparativo de estos resultados frente a los obtenidos de proteínas de membrana oxidadas por el parásito en muestras de eritrocitos no deficitarios, señala que la carbonilación puede tener dos efectos biológicos opuestos.

En el primero, bajo condiciones normales de actividad eritrocitaria de G6PD, se produce un aumento del estrés oxidativo en el eritrocito infectado pero controlado por los sistemas de defensa antioxidante del parásito. Así, se propone que la carbonilación de las proteínas del citoesqueleto: espectrinas, ankirinas, banda 4.2 y actina resultaría necesaria para el ensamblaje de las proteínas del parásito exportadas hacia la superficie del eritrocito infectado. En el segundo, bajo condiciones de déficit de G6PD se produce un extenso daño oxidativo parcialmente controlado por el parásito y que promueve la acumulación de hemicromos en la membrana del eritrocito parasitado. En consecuencia, se propone que estarían afectadas tres rutas metabólicas de la relación parásito-hospedador implicadas en (i) el tráfico y ensamblaje de proteínas del parásito exportadas al citoesqueleto y superficie de membrana del eritrocito, (ii) la respuesta al estrés oxidativo y (iii) la respuesta general al estrés.

En el estudio del estrés oxidativo de las proteínas de membrana del eritrocito en los polimorfismos de grupos sanguíneos ABO, se ha observado que el grupo O presenta menor cantidad de proteínas carboniladas que los otros grupos. Sin embargo, en la infección por malaria esta diferencia desapareció a las 24h de ser parasitado el eritrocito.

Debido a la naturaleza química heterogénea de la carbonilación de las proteínas y los antecedentes de acumulación de proteínas carboniladas por 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) en la membrana del eritrocito parasitado, se realizó la puesta punto de un método de análisis proteómico dirigido a la identificación y localización de los residuos de aminoácidos modificados por este aldehído marcador de peroxidación lipídica. De esta forma, se logró la identificación de aductos de Michael de 4-HNE sobre residuos de lisina e histidina de dos péptidos de la β -espectrina convirtiéndose en la primera identificación de residuos de aminoácidos modificados por 4-HNE bajo condiciones fisiológicas.

La utilización de este método permitió identificar que la carbonilación por 4-HNE de la ankirina, EPB 4.1 y EPB 4.2 de eritrocito humano tanto en condiciones normales como en eritrocitos infectados por *P. falciparum* participaría del mecanismo parcialmente protector frente a malaria grave que se atribuye al grupo O.

Los resultados obtenidos profundizan en el daño oxidativo que sufren las proteínas de membrana del eritrocito huésped durante la infección por *P. falciparum* y los posibles mecanismos protectores que operan tanto en el déficit de G6PD como en el del grupo sanguíneo O.

Capítulo I

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1. LA MALARIA

La malaria es la enfermedad parasitaria más prevalente y perniciosa de la especie humana y se estima que produce la muerte de aproximadamente 1 millón de personas y afecta a casi 500 millones cada año, principalmente niños menores de 5 años (WHO/OMS 2009). La carencia de una vacuna eficaz hace que el tratamiento farmacológico sea la principal estrategia de tratamiento y prevención de la enfermedad (Daily 2006). Sin embargo, la resistencia de los parásitos de las diferentes especies de *Plasmodium* ha emergido a casi todas las drogas antimaláricas en uso (White 2004; Daily 2006; Patarroyo 2008). Así por ejemplo, la eficacia de la artemisina y derivados, que pertenecen a los antimaláricos más recientes está siendo comprometida por la aparición de cepas de *Plasmodium falciparum* con reducida respuesta clínica a los tratamientos con medicamentos que las contienen (Andriantsoanirina et al. 2009; Bonnet et al. 2009).

Ante esta situación, la Organización Mundial de las Salud (OMS) y la comunidad internacional se han propuesto aumentar la cobertura de intervenciones eficaces en los países donde el paludismo es endémico, con el fin de hacer retroceder el paludismo hasta lograr una reducción de 75% para el año 2015 del número registrado de casos y fallecimientos por paludismo, tomando como referencia los niveles de 2000 (World Health Organization. et al. 2009).

Esta tarea ha resultado extremadamente difícil debido en parte al complejo ciclo de vida del parásito y porque requiere del diseño de políticas y estrategias geosociales dirigidas al control de la enfermedad tanto en el huésped vertebrado como invertebrado.

1.1 El ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*.

Los organismos responsables de esta enfermedad son protozoos del grupo de los apicomplejos pertenecientes al género *Plasmodium* que se transmiten gracias a distintos géneros de dípteros, como *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* (Ferguson 2002). Los

mosquitos que se conoce que actúan como vectores de la malaria humana (más de 100 especies), pertenecen todos al género *Anopheles* (Sherman 1998).

Aunque existen más de cien especies dentro del género *Plasmodium* capaces de parasitar mamíferos –mayoritariamente roedores y primates–, reptiles y pájaros, cuatro producen la enfermedad en humanos: *P.vivax*, *P.malariae*, *P.ovale* y *P.falciparum*. Estas especies presentan una larga asociación con el hombre y son parásitos exclusivos del mismo, exceptuando el caso de *P.malariae*, que se ha encontrado también en monos africanos. Recientemente se ha establecido a *P.Knowlesi* como la quinta especie que afecta a los humanos (Luchavez et al. 2008; White 2008; Figtree et al. 2010)

Estos parásitos presentan un ciclo biológico complejo con diferentes estados de desarrollo y de multiplicación. Para completar el ciclo *Plasmodium* necesita dos hospedadores: el hospedador definitivo (mosquito anofelino, que es vector de transmisión para los vertebrado) donde se produce la reproducción sexual y el hospedador intermediario (mamífero o ave) donde se produce la reproducción asexual del parásito (Figura 1) (Sherman 1998).

En el vertebrado, las formas transmitidas a través de la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* son los esporozoítos (estadio invasivo con forma fusiforme). Estos pasan al torrente sanguíneo, directamente o mediante vía linfática, y se dirigen al hígado, donde cada esporozoíto invade una célula hepática. En su interior, se forma una vacuola parasitófora que separa al parásito del citoplasma de la célula hospedadora (Gilles 2002). Allí divide su núcleo miles de veces, formando una célula (esquizonte) que contiene de 10.000 a 50.000 células hijas en su interior. Esta fase, denominada ciclo exo-eritrocítico (Figura 1A), oscila entre 5 y 15 días (Gilles 2002). Los esquizontes maduros se escinden junto a la célula que parasitan y liberan células hijas, merozoítos, al torrente sanguíneo donde invaden eritrocitos (Gilles 2002).

Una vez que el parásito invade los eritrocitos comienza una nueva fase, denominada ciclo eritrocítico (Figura 1B). La invasión es extremadamente rápida (~30 segundos) y continua con la formación de una vacuola parasitófora donde se localiza el

parásito (Cowman 2006) que en esta fase se denomina anillo. A partir de 15 horas post-invasión existe un progresivo incremento en la actividad metabólica y biosintética dentro de la célula infectada y el parásito pasa al estadio de trofozoito que se caracteriza al microscopio por presentar un pigmento característico denominado hemozoina (Cowman 2006).

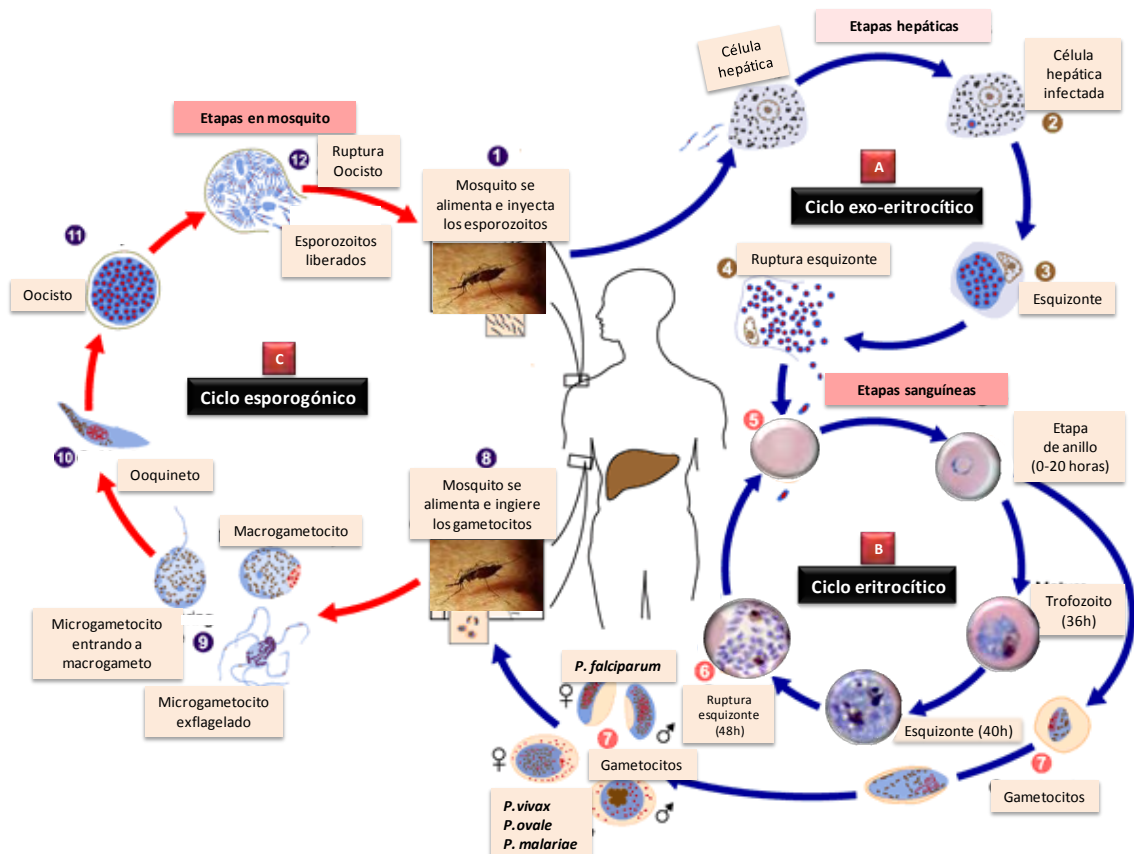


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. En su hospedador mamífero: A.-Ciclo exoeritrocítico. Un mosquito anofelino inocula los esporozoítos (1) que se dirigen al hígado donde invaden las células hepáticas (2) y producen su primera esquizogonia pre-eritrocítica (3). B.- Ciclo eritrocítico. La ruptura del esquizonte (4) libera los merozoítos al torrente sanguíneo donde invaden glóbulos rojos (5) formándose un trofozoito que madura a esquizonte, cuya ruptura libera de nuevo merozoítos al torrente (6). Algunos trofozoítos pueden madurar a gametocitos (7) que son ingeridos por el mosquito (8). C.-Ciclo esporogónico. Los gametocitos maduran a macrogametos y microgametos flagelados (9) que, tras la fecundación, producen un ooquinetto móvil (10) que atraviesa la pared gástrica para formar un oocisto (11) que liberará miles de esporozoítos infectivos (12).
 Adaptado de http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm

El parásito de la malaria aunque tiene una mitocondria, carece de un ciclo de ácido cítrico funcional por lo que se piensa que es totalmente dependiente de la glucólisis para su abastecimiento energético (Roth 1990). A medida que el parásito madura, la tasa de utilización de glucosa y la producción de ácido láctico se incrementa

hasta 100 veces en el eritrocito infectado (Roth 1990). Mediante endocitosis el parásito retiene porciones del citoplasma del eritrocito dentro de vesículas que se fusionan con la membrana digestiva interna o la vacuola alimenticia. Aquí las proteínas de la célula huésped, principalmente hemoglobina, son digeridas a pequeños péptidos que se utilizan como fuente de aminoácidos para el parásito (Kolakovich et al. 1997). Al mismo tiempo, existe una elevada actividad de síntesis *de novo* de ARN y ADN dibujando una situación que contrasta marcadamente con la incapacidad del eritrocito normal para sintetizar macromoléculas. Una plétora de proteínas sintetizadas por el parásito se exporta a la vacuola parasitófora, a su membrana, de allí al citosol eritrocitario, a su citoesqueleto y membrana e incluso más allá, hacia el medio extracelular (Craig 2001; Cooke et al. 2004; Ginsburg 2004).

Concomitante con este dramático incremento en la actividad metabólica y biosintética, el parásito aumenta progresivamente de tamaño hasta las ~ 36 horas post-invasión, llegando a ocupar un tercio del volumen de la célula huésped (Saliba et al. 1998). Durante este periodo de crecimiento, se observa en el citosol del eritrocito una variedad de estructuras membranosas tubulares y vesiculares que se cree se extienden a partir de la membrana externa de la vacuola parasitófora, recibiendo su conjunto el nombre de membrana tubo-vesicular o red tubo-vacuolar (Elford et al. 1995).

En este punto del ciclo eritrocítico, se presentan cambios pronunciados en la morfología del eritrocito infectado que van desde la pérdida de la forma de disco bicóncavo hasta la aparición en la superficie del eritrocito de un elevado número de protrusiones electro-densas conocidas como knobs (Deitsch 1996) y que participan en el proceso de anclaje de antígenos de virulencia producidos por el parásito. De igual manera, se presenta una marcada alteración de la composición y organización de los lípidos de membrana, así como algunos rearrreglos y modificaciones de las proteínas de membrana del eritrocito. Por ejemplo, la proteína banda-3 sufre una pérdida de movilidad lateral y una porción de la proteína es truncada por digestión proteolítica (Murphy et al. 2007).

Aproximadamente a las 40h post-invasión se puede observar en el parásito el comienzo de la división esquizogónica. El esquizonte dará lugar a 20-30 merozoítos que son liberados cuando la célula huésped finalmente se escinde a 48 post-invasión. Cada uno de los merozoítos liberados es capaz de invadir otro eritrocito y por tanto repetir el ciclo (Sherman 1998).

Tras varias esquizogonias, las divisiones en los eritrocitos se sincronizan, por lo que el hospedador sufre de ataques febriles periódicos. Los fragmentos celulares y los cuerpos residuales que no se han digerido por el parásito se liberan a la circulación durante la lisis de los eritrocitos y son los responsables de los ataques de fiebre ya que desencadenan una liberación de citoquinas por parte del hospedador (Kwiatkowski 1990; Chen et al. 2000). La duración del ciclo asexual en el hombre varía dependiendo de la especie: 48-50 horas en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum* y 72 horas en *P. malariae*, resultando en el patrón de fiebres tercianas o cuartanas observado en los distintos tipos de malaria humana (Kwiatkowski 1990; Chen et al. 2000).

A pesar de que la mayoría de los merozoítos que invaden los eritrocitos desarrollan el ciclo asexual, una pequeña fracción puede dar lugar a células sexuales masculinas y femeninas que se denominan gametocitos. Cuando un mosquito vuelve a picar al individuo, los gametocitos que ingieren con la sangre, debido a la menor temperatura y a la presencia de ácido xanturénico en el estómago del insecto, se desarrollan en gametos (Figura 1C). El gametocito femenino abandona el eritrocito y se transforma en un macrogameto sin sufrir ninguna división, mientras que el microgametocito masculino sufre tres divisiones mitóticas y libera microgametos flagelados, que se mueven a través de la sangre ingerida en busca de un macrogameto (Ramasamy et al. 1997).

La fecundación, que se produce en el estómago del mosquito, genera un cigoto diploide, que habrá de sufrir un proceso de meiosis. En unas 12-48 horas el cigoto se transforma en un ooquinetto que, tras atravesar las paredes del estómago, se localiza en la lámina basal y segrega una cubierta ooquistica. Este ooquiste crece y experimenta una esporogonia que rinde un gran número de esporozoítos, por ello a

esta fase del ciclo en el interior del mosquito se la conoce como ciclo esporogónico (Beier 1998).

Cuando el ooquiste madura se va debilitando, lo que desencadena la liberación de los esporozoítos entre la pared quística y la lámina basal, por lo que la mayoría pasan al hemocele y se dirigen al interior de las glándulas salivales, desde donde se inyectarán a un nuevo hospedador vertebrado a través de una nueva picadura e iniciando nuevamente el ciclo (Beier et al. 1992; Beier 1998).

1.2 *Plasmodium falciparum* remodela la membrana del eritrocito infectado.

Una importante diferencia de *P. falciparum* frente a otras especies de *Plasmodium* se relaciona con las alteraciones que se producen a nivel de las proteínas de membrana del eritrocito huésped. Estas alteraciones se relacionan con los síntomas más graves de la enfermedad y al mismo tiempo están condicionadas en el parásito a resolver dos problemas básicos de la subsistencia.

El primero está relacionado con el transporte de nutrientes y productos de desecho entre el parásito y el eritrocito. Esta función requiere el transporte de sustancias a través de tres membranas: la membrana plasmática del eritrocito huésped, la membrana de la vacuola parasitófora y la propia membrana plasmática del parásito (Kirk 2001; Haldar 2007).

El segundo está centrado en evitar la acción del sistema inmune del huésped. Para ello los eritrocitos infectados con parásitos maduros presentan una superficie adhesiva que evita su depuración en el bazo, al tiempo, mediante control genético, varían los antígenos expuestos en la superficie de la célula infectada. La adhesividad del eritrocito infectado se traduce en su retención o secuestro en órganos como el cerebro, riñones, tejido subcutáneo y placenta, presentándose como consecuencia malaria grave en forma de malaria cerebral o placentaria (Florens et al. 2004; Tripathi et al. 2007).

Para comprender la naturaleza de las modificaciones sufridas por la membrana plasmática de los eritrocitos humanos durante la fase asexual de la malaria, es útil revisar primero las características de esta en condiciones normales.

1.2.1 Proteínas de membrana de los eritrocitos humanos.

En los últimos años, el estudio de proteínas de membrana se ha visto favorecido con los avances en genómica funcional acompañada de métodos proteómicos y de microarrays de expresión de ARN, lo que permite un enfoque global de la identificación de proteínas y el control de su expresión. Sin embargo, la ausencia de núcleo en el eritrocito maduro sitúa al análisis proteómico como fundamental para el estudio global de este tipo de células (Cristea et al. 2004; Steen 2004). Así usando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), se han identificado hasta 314 proteínas de membrana del eritrocito (Pasini et al. 2006) mediante un procedimiento bioquímico optimizado para la preparación de la muestra junto con SDS-PAGE y LC-MS/MS. Mientras que a partir del digerido tróptico del extracto total de proteínas de membrana analizado por trampa iónica, fueron identificadas un total de 91 (Kakhniashvili et al. 2004).

La membrana externa de los eritrocitos contiene numerosas proteínas que atraviesan la bicapa lipídica una o más veces o están ancladas a ésta mediante una cola de lípidos. Las funciones de algunas de estas proteínas son conocidas, pero sin embargo muchas otras su función solo puede ser deducida a partir de la homología de estructura, de secuenciación o bien contando con evidencias experimentales limitadas (Figura 2).

Con relación a su función, las proteínas de membrana pueden ser divididas en 4 grandes grupos: (I) transportadores de membrana, (II) moléculas de adhesión y receptores, (III) enzimas y, (IV) proteínas estructurales que ligan la membrana con el citoesqueleto (Daniels 2007).

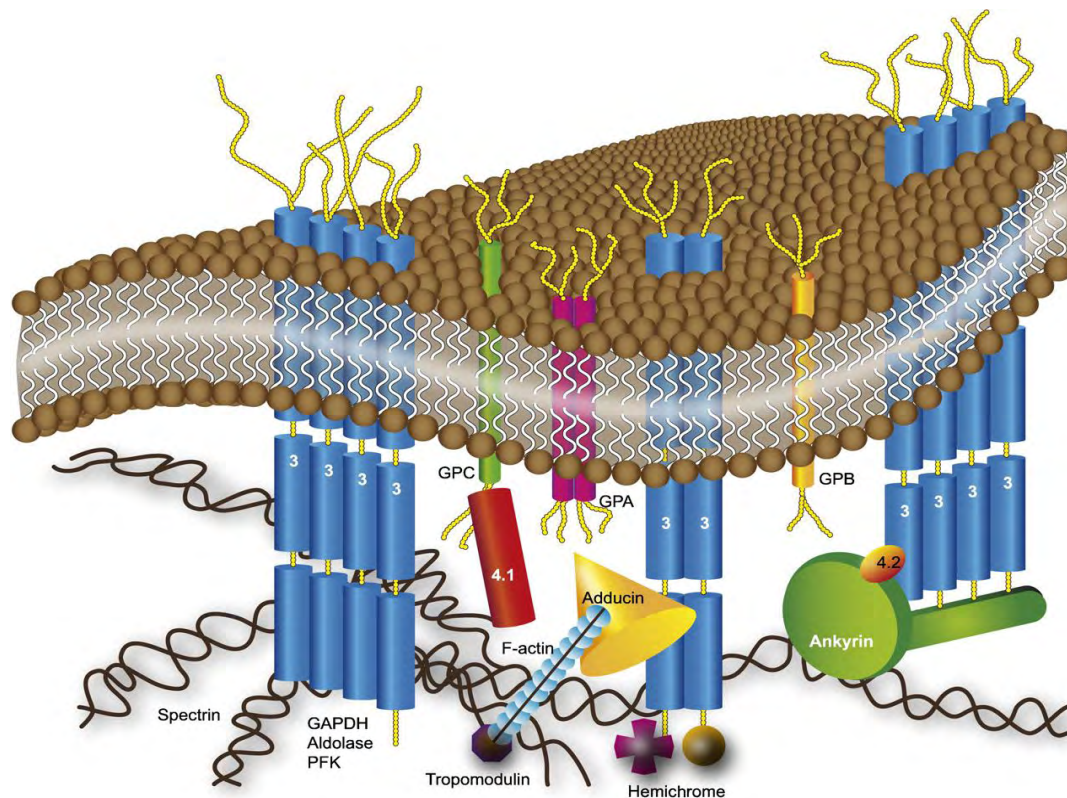


Figura 2. Modelo ilustrativo de la membrana del eritrocito humano y su citoesqueleto subyacente. Proteínas estructurales de la membrana del eritrocito se subdividen en: a) integrales (p. e banda 3 y glicoforinas); b) de citoesqueleto, (p.e espectrinas y actinas) y; c) de anclaje (p.e ankyrinas y banda 4.2) Imagen tomada de (Pasini et al. 2010).

Del grupo I forman parte las proteínas transportadoras y canales, que se caracterizan porque atraviesan la membrana varias veces, tienen forma de serpentina con ambos extremos citosólicos y con un N-glicano sobre uno de los lazos externos. Dentro de este grupo se encuentran el macrocomplejo banda 3/ proteína Rh, las acuaporinas AQ-1 y AQ-3 y los transportadores de glucosa, entre muchos otros que se han identificados por estudios proteómicos de la membrana del eritrocito humano (Figura 3). El más importante dentro de este grupo es sin duda la banda 3 que actúa como un intercambiador aniónico rápido para los aniones cloruro y bicarbonato, mientras que para aniones de mayor tamaño (ej. sulfatos, fosfatos, fosfoenolpiruvato y superóxidos) es un intercambiador lento (Tanner 1993; Fujinaga et al. 1999). El bicarbonato es producido por la anhidrasa carbónica, mientras que el protón liberado como sub-producto se une a la hemoglobina y facilita la liberación del oxígeno a los tejidos (Vince 1998).

Por su parte las acuaporinas forman canales específicos que permiten el movimiento del agua a través de la membrana a favor del gradiente osmótico. Mientras que los transportadores de glucosa son responsables de la captación y el mantenimiento de los niveles la glucosa basal y del transporte de un amplio rango de aldopentosas y aldohexosas (Diamond 1993). Una característica de la membrana del eritrocito es su permeabilidad controlada de agua y aniones, al tiempo que es extremadamente impermeable a cationes, requiriendo por tanto sistemas de transporte específicos para estos últimos. El adecuado funcionamiento de estos sistemas en última instancia contribuye al mantenimiento de la homeostasis y volumen del eritrocito (Kaestner 2002; Benga 2003).

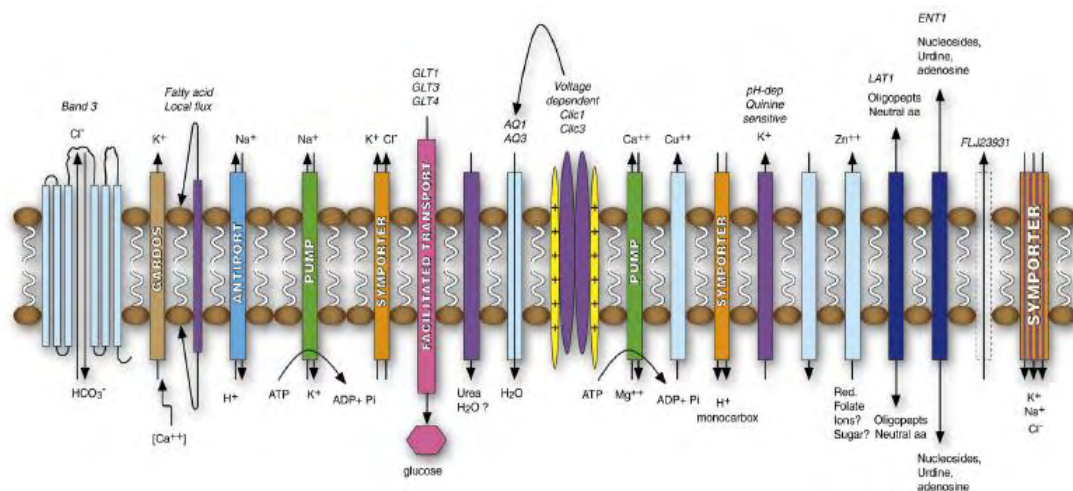


Figura 3. Representación ilustrativa de las principales proteínas transportadoras del eritrocito humano identificadas por estudios proteómicos (Pasini et al. 2010). Muchas de las proteínas de membrana del eritrocito están involucradas en el transporte de nutrientes, iones y agua. En violeta se representan los transportadores con baja expresión. Los canales de voltaje (Clic 1 y Clic 3) se cree que regulan los canales de acuaporinas. Los transportadores simport están en naranja, antiport en azul, de transporte facilitado en rosa y las bombas en verde. Transportadores bidimensionales en azul oscuro, los canales activados por estímulo interno en marrón y el resto en azul pálido. Transportadores hipotéticos solo aparecen esbozados (por ejemplo, canales de iones cobre y cinc).

En el grupo II de receptores y moléculas de adhesión se encuentra las proteínas que participan en los procesos de interacción con otras células sanguíneas, proteínas del plasma y células endoteliales. A este grupo pertenecen la glicoproteína Duffy (o DARC) que es un antígeno receptor de quimiocinas acoplado a proteínas G y los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas de los glóbulos rojos como ICAM 4, glicoproteínas del grupo sanguíneo Lutheran y diversas proteínas de control del

complemento como DAF, CD55, CR 1 y CD 35 (Daniels 2007). Los estudios de la relación de estas proteínas con la función global del eritrocito (Krych-Goldberg et al. 2002; Lublin 2005) demuestran el creciente interés en la comprensión de las redes de interacción de las proteínas de membrana en esta célula tanto en condiciones normales como patológicas. Como resultado, se ha propuesto recientemente una primera aproximación al interactoma para el eritrocito humano a partir de datos depositados en la base del Interactoma Humano Unificado (UniHI, del inglés Unified Human Intercatome). En esta propuesta, de un total de 326 proteínas de membrana de acuerdo a su función se hace la siguiente reclasificación: 115 enlazantes, 47 transportadores, 29 involucradas en la transducción de señales, 8 en la glicolisis, 98 catalíticas, 24 estructurales y 5 antioxidantes (Goodman et al. 2007). Adicionalmente, se identifican tres grupos de proteínas de membrana susceptibles a daño oxidativo en condiciones homocigotas de anemia de células falciformes, dentro de la que destacan proteínas reparadoras (isoformas de hsp-70, chaperoninas TCP1), componentes del proteasoma (proteasoma 26S, sub-unidad 6 de ATPasa, sub-unidades α y β del proteasoma) y neutralizadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) como catalasa y peroxiredoxinas (Kakhniashvili et al. 2005; Goodman et al. 2007).

Merece ser destacado que dos grupos de proteínas, los transportadores y los receptores, son también importantes en la biología del ciclo asexual de Plasmodium porque están involucradas en el flujo de nutrientes (Kirk 2001; Ginsburg 2004) y en el fenómeno de secuestro de eritrocitos parasitados (Tripathi et al. 2007).

En el grupo III de proteínas de membrana se ubican las enzimas de la glicolisis fructosa-bifosfato aldolasa A, α -enolasa, ALDOC, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato kinasa y piruvato kinasa. El elevado número de enzimas de esta ruta metabólica, que se asocia a las membranas, se debe a que el eritrocito carece de mitocondrias y por tanto la producción de energía se realiza casi exclusivamente por la glicolisis (Pasini et al. 2010). Adicionalmente, tres glicoproteínas de la superficie del eritrocito tienen estructuras que sugieren una actividad enzimática. Dos de ellas son activas, la acetilcolinesterasa y la glicoproteína kell. Ambas se han

identificado como antígenos proteicos de los grupos sanguíneos Yt y Kell, respectivamente. Mientras la primera es un neurotransmisor con función desconocida en el eritrocito, la segunda es una endopeptidasa dependiente de zinc que se cree procesa una variedad de péptidos biológicamente activos (Daniels 2007).

Finalmente, en el grupo IV aparecen las proteínas estructurales. Estas interaccionan con los lípidos de la membrana para mantener la fluidez y deformabilidad de la membrana plasmática del eritrocito. Este grupo de proteínas de membrana puede también ser subdivido en tres categorías: (a) proteínas del esqueleto, (b) integrales y (c) de anclaje (Yawata 2003).

En el subgrupo (a), se ubican las proteínas del esqueleto de membrana que subyacen justo bajo la bícapa lipídica y se asocian entre sí en una red dinámica de proteínas responsable del mantenimiento de la integridad del eritrocito a su paso por estrechos capilares sanguíneos, como por ejemplo espectrinas, actina y proteína banda 4.1 (Figura 2). En la segunda categoría, subgrupo (b), están las proteínas integrales que se caracterizan por estar fuertemente embebidas en la bícapa lipídica, como por ejemplo la banda 3 y glicoforinas (Figura 2). La tercera categoría, subgrupo (c), corresponde a las proteínas de anclaje cuya función es conectar el citoesqueleto con las proteínas integrales, como por ejemplo las ankirinas y la proteína banda 4.2 (Figura 2). Esta categorización rigurosa de las proteínas estructurales de membrana es frecuentemente reducida a dos (proteínas integrales de membrana y citoesqueleto) e igualmente aceptada por la comunidad científica.

Mutaciones en los genes que transcriben para algunas de estas proteínas, como por ejemplo las espectrinas, ankirina, banda 3 y proteína banda 4.2 producen lesiones que afectan la deformabilidad y viabilidad del eritrocito (An 2008). Tal es el caso de la esferocitosis hereditaria que se caracteriza por una disminución de la elasticidad y deformabilidad del glóbulo rojo (Perrotta et al. 2008). Esta es una condición prevalente en zonas endémicas de malaria y en las poblaciones con ascendencia del norte de Europa y América donde afecta a 1 de cada 2000 personas (Perrotta et al. 2008).

Desde el punto de vista de abundancia, la banda 3, las espectrinas, ankirina, actina y proteína banda 4.1 forman parte de los componentes mayoritarios; mientras que proteína banda 4.2, dematina, adduccinas, tropomodulina y tropomiosina están entre los componentes minoritarios. En la Tabla 1 se resumen algunas de las características de las principales proteínas estructurales.

Tabla 1. Características moleculares de las principales proteínas estructurales de membrana de eritrocitos humanos.

Banda en SDS gel	Proteína	Tamaño (KDa) en		Número de copias ($\times 10^3$ /cell)	Abundancia relativa (%)	Localización
		SDS-gel	Calculado			
1	α -Espectrina	240	280	242 ± 20	14	Citoesqueleto
2	β - Espectrina	220	246	242 ± 20	13	Citoesqueleto
2.1	Ankirina	210	206	124 ± 11	5	Anclaje
2.9	α -Adducina	103	81	30	1	Citoesqueleto
	β -Adducina	97	80	30	1	Citoesqueleto
3	Proteína Banda 3	90 -100	102	1200	26	Integral
4.1	Poteína 4.1	80, 78	66	200	5	Citoesqueleto
4.2	Proteína 4.2	72	77	250	5	Anclaje
4.9	Dematin	48-52	43-46	140	1	Citoesqueleto
	p55	55	53	80	1	Citoesqueleto
5	β -Actina	43	42	500	6	Citoesqueleto
	Tropomodulina	43	41	30		Citoesqueleto
6	G3PDH	35	36	500	5	Citoesqueleto
7	Estomatina	31	32		4	Integral
	Tropomiosina	27-29	28	70	1	Citoesqueleto
8	Proteína 8	23	22	200	1	Citoesqueleto
	Glicoforina A	36	14	1000	1.6	Integral
	Glicoforina C	32	14	150	0.1	Integral
	Glycophorin B	20	8	150	0.2	Integral
	Glycophorin D	23	11	82	0.02	Integral

Fairbanks (Fairbanks et al. 1971) y Laemmli (Laemmli 1970) demostraron que después de la extracción con tampones de baja fuerza iónica las proteínas de membrana de eritrocitos (ghost) se solubilizan completamente en tampones suplementados con dodecil-sulfato de sodio (SDS) y permitía su separación electroforética y posterior visualización con Coomassie. De esta forma, los nombres de las proteínas fueron dados de acuerdo a un orden decreciente de tamaño, como se muestra en la columna 1. Las glicoforinas solo se visualizan cuando los electroforogramas son tratados con ácido peryódico (PAS) y por ello no son numeradas.

Muchas de estas proteínas no solo interactúan entre sí, sino que también lo hacen con otros tipos de proteínas y lípidos de la membrana. Mientras que las interacciones proteína-proteína se han estudiado extensivamente, muy poco es lo que se conoce acerca de las interacciones lípido-proteína.

Se ha propuesto que las interacciones en la red del citoesqueleto están funcionalmente reguladas por el tipo y la extensión de modificaciones pos-traduccionales como fosforilación, metilación, miristilación, palmitilación o

farnesilación (Cohen 1992). No obstante, aunque los componentes mayoritarios y minoritarios del citoesqueleto se han identificado en diversos estudios proteómicos es poco lo que se conoce acerca de las modificaciones de cada uno. Actualmente, se carece de un estudio detallado de las modificaciones post-traduccionales de estas proteínas, el cual podría aclarar importantes aspectos de estos mecanismos reguladores (Pasini et al. 2010).

El conjunto de interacciones moleculares que ocurren en la membrana del eritrocito humano le confieren a éste una singular característica elástica. Los eritrocitos humanos poseen diámetro discoidal de 6 a 8 μm , un espesor de 2 μm , un volumen aproximado de 90 fL y un área de superficie de $\sim 136 \mu\text{m}^2$. Estos parámetros presentan valores menores que los correspondientes a la mayoría de las otras células humanas. No obstante, por sus propiedades elásticas puede hincharse hasta adquirir una forma de esfera de 150 fL, sin deterioro de su membrana (Dean 2005).

Esto es posible gracias al desplazamiento dinámico entre las conformaciones extendidas y comprimidas de sus proteínas del citoesqueleto de membrana (Liu 1992). Por ejemplo, la espectrina es una proteína heterodimérica compuesta de 2 subunidades asociadas de manera antiparalela, la cadena α (~ 280 KDa) y la β (~ 246 KDa). Estos heterodímeros se asocian entre sí en una orientación cabeza-cabeza para formar tetrámeros $(\alpha\beta)_2$ que se organizan en un estado altamente espiral-helicoidal que le confiere una elevada flexibilidad, y con una forma alargada que le otorga propiedades de resorte y capacidad para extenderse y retraerse (Figura 4) (Waller et al. 2007).

El acoplamiento de la red del citoesqueleto a la membrana es mediado por la interacciones espectrina-ankirina-banda-3 y espectrina-banda 4.1-glicoforina C (Mohandas 2008). Mientras que la interacción de espectrina con la membrana por la vía de la ankirina es regulada por la proteína banda 4.1, la interacción de banda 4.1-glicoforina C es regulada por p55. La presencia de actina en los sitios de interacción con otras proteínas del citoesqueleto es importante para controlar la relación polimerización-despolimerización de la espectrina y mantener la flexibilidad. Este fuerte control es ejercido con la ayuda de cuatro proteínas minoritarias:

tropomodulina, tropomiosina α,β -adducinas y dematin que en conjunto protegen y mejoran la unión de la actina a los sitios de interacción (Pasini et al. 2010).

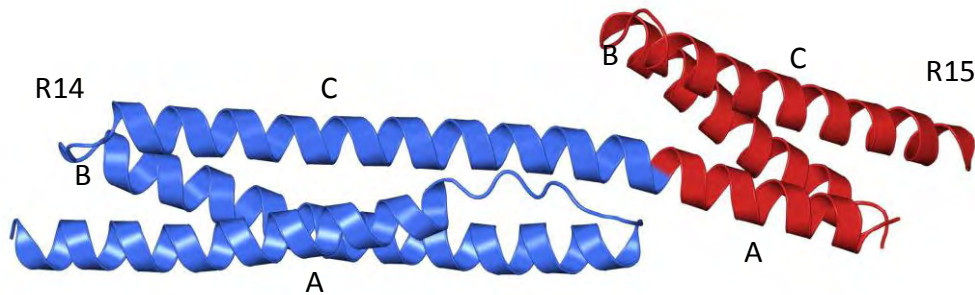


Figura 4. Estructura de las repeticiones 14 y 15 de la β -espectrina de eritrocitos humanos (dominio de unión a la anquirina) (Ipsaro et al. 2009). Las repeticiones de espectrina están presentes en varias proteínas de la red del citoesqueleto. Las repeticiones 14 (R14 en azul) y 15 (R15 en rojo) consisten de triples hélices (A, B y C) conectadas por secuencias enlazadoras helicoidales y actúan como unidades independientes de plegamiento. De esta forma, otorgan a la espectrina un papel central en el control de la organización, estabilidad y forma de la membrana celular y unen la membrana a los transportadores y al sistema de filamentos.

1.2.2 Proteínas de exportación de *Plasmodium falciparum* que remodelan la membrana plasmática del eritrocito infectado.

Los cambios que sufre la membrana de la célula huésped del parásito de la malaria comienzan con el proceso de invasión del eritrocito (Figura 5). En este, el parásito induce un proceso controlado y transitorio de ruptura de la organización de la membrana del glóbulo rojo. Para ello, los merozoitos se unen a ligandos presentes en la superficie del eritrocito. Por ejemplo, las proteínas EBA 175 y EBA 140 de la superficie del merozoito se unen a las glicoforinas A y C de la superficie del eritrocito (Sim et al. 1994; Duraisingh et al. 2003; Gilberger et al. 2003). A continuación, se establece una estrecha unión entre el parásito y el eritrocito, seguida de la activación de un motor actina-miosina que impulsa la entrada del parásito. Estas acciones coinciden con la secreción de lípidos y proteínas (incluido proteasas) desde tres organelas denominadas roptrias, mononemas y micronemas (Cowman 2006).

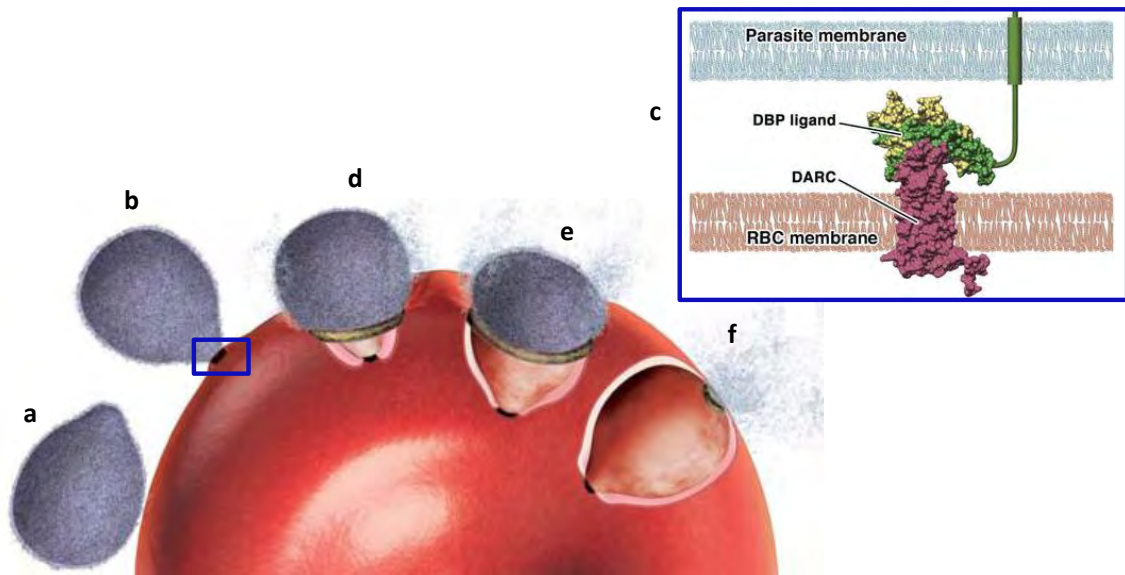


Figura 5. Ilustración de proceso de invasión del eritrocito por el merozoito. **a.** Interacción inicial mediada por ligandos. **b.** Reorientación y formación de salida **c.** En la ampliación se detalla la fuerte unión al eritrocito. **d** Entrada y formación de vacuola parasitófora. **e.** Movimiento de ingreso dirigido por el motor de actina-miosina **f.** Invaginación y re-sellamiento de la membrana del eritrocito y la vacuola parasitófora. Tomado de (Cowman 2006).

De esta forma, se ha propuesto que el merozoito produce la ruptura proteolítica de la proteína banda-3 y la conexión de las proteínas integrales de membrana con la red del citoesqueleto (Cowman 2006; Li et al. 2008). Finalmente, el ingreso del parásito produce la invaginación de la membrana del eritrocito dando origen a la vacuola parasitófora, que es delimitada por una membrana rica en colesterol y algunas proteínas componentes de las balsas de lípidos como las flotilinas 1 y 2 (Murphy et al. 2004).

Durante y a continuación de la invasión, las proteínas de las roptrias y gránulos densos son secretados a la vacuola parasitófora. Posteriormente, son transportadas junto con las proteínas de la etapa de anillo al citoplasma del eritrocito huésped para iniciar la cascada de eventos requeridos para el remodelado de la célula huésped (Maier et al. 2009).

La forma de anillos es prácticamente la única que se observa en los frotis de sangre periférica de las personas infectadas con *Plasmodium falciparum*, dado que los eritrocitos que albergan las formas maduras son secuestrados en diferentes órganos y no circulan (Gilles 2002). El fenotipo adhesivo de las especies de *P. falciparum* está asociado con los knobs, los cuales se componen principalmente de las asociaciones

knob-proteínas ricas en histidina (KAHRP, del inglés *knob-associated histidine rich protein*). Estos knobs actúan como plataformas para la presentación de proteínas de citoadherencia exportadas por el parásito y que terminan embebidas en la membrana; como por ejemplo, la proteína 1 de *P. falciparum* presente en la membrana de eritrocito (*PfEMP-1*, del inglés *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*) (Maier et al. 2008). *PfEMP-1* se considera la principal responsable de la adhesión a las células endoteliales y a otras células vasculares del huésped. De esta forma se evade la depuración fagocítica del eritrocito parasitado en el bazo. Adicional a *PfEMP-1*, hay un elevado número de proteínas del parásito que son exportadas al citoplasma y a la membrana de la célula huésped, dejando en evidencia la existencia de un eficiente sistema secretorio (van Ooij 2007; Black et al. 2008; Waller et al. 2010).

Un resumen con algunas de las principales proteínas exportadas por el parásito a la membrana del eritrocito junto con sus características se presenta en la Tabla 2. Muchas de las proteínas exportadas contienen secuencias señal canónicas en el extremo N-terminal, mientras que otras contienen una región hidrofoba que asemeja a una secuencia señal que se oculta hasta en 80 aminoácidos (Cooke et al. 2004). Esta secuencia señal hidrofóbica es suficiente para orientar a las proteínas en la vacuola parasitófora, pero se necesitan señales adicionales para el tráfico hasta el eritrocito huésped. Un motivo de secuencia señal corta se ha identificado como necesaria para el transporte más allá de la PVM.

El elemento de exportación de *Plasmodium* al eritrocito huésped (PEXEL/HT, del inglés *Plasmodium export element/host targeting*) se identifica por una secuencia de 35 aminoácidos corriente abajo de la secuencia señal hidrofóbica y contiene el consenso RxLxE/Q (Hiller et al. 2004; Marti et al. 2004).

Tanto las proteínas solubles como la embebidas en la membrana pueden contener un motivo PEXEL/HT, indicando que el sistema secretor puede exportar ambas clases de proteínas.

Tabla 2. Características de algunas de las principales proteínas exportadas por *P. falciparum*.
Tomado de (Maier et al. 2009)

Proteína (Sigla, Mr en KDa)	Localización	Señal de exportación predicha	Características notables
<i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1, 200–250)	Hendidura de Maurer (HM), membrana y superficie de eritrocito	Motivo tipo PEXEL	Ligando de Citoadherencia. Involucrado en variación antigénica. Interactúa con KAHRP
Knob-associated histidine rich protein (KAHRP, 71)	Citoesqueleto de eritrocito	RXLXQ	Se une a espectrina-actina y PfEMP1. Esencial para la formación de Knobs. Deleción disminuye rigidez y adhesión bajo condiciones de flujo
Ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA/Pf155 127)	Citoesqueleto de eritrocito	RXLXGE	Se une a espectrina. Deleción aumenta vesiculación de membrana inducida por calor. Quizás estabiliza membrana eritrocito y previene invasión de eritrocito parasitado
<i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3, 274)	HM y citoesqueleto de eritrocito	RXLXQ	Se une a espectrina. Interrumpe interacción espectrina-actina-4.1R. Parece estar involucrada en el tráfico de PfEMP1. Contiene regiones repetidas
Mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA/PfEMP2 168)	Citoesqueleto de eritrocito	Motivo tipo PEXEL	Se une a protein 4.R. Quizás interrumpe interacción p55-4.1R
Membrane-associated Histidine rich protein 1. (MAHRP1, 29)	HM	Ninguna	Participa en estabilización de HM y el tráfico de PfEMP1. Su Supresión disminuye citoadhesión
<i>P. falciparum</i> skeleton binding protein 1. (PfsBP1, 36)	HM y citoesqueleto de eritrocito	Ninguna	Contribuye a la morfología de HM y el tráfico de PfEMP1. Su Supresión disminuye citoadhesión
Repetitive interspersed family protein /subtelomeric variable open reading frame proteins (RIFIN/STEVOR, ~37)	Citoplasma y superficie de eritrocito	RXLXE/D, RXLXQ	Quizás se expone en superficie de eritrocito en anillos maduros. Posiblemente involucrados en la variación antigénica
<i>P. falciparum</i> antigen 332. (Pf332/Ag332, 689)	HM y citoesqueleto de eritrocito	Ninguna	Contribuye a la morfología de HM y el tráfico de PfEMP1. La Supresión aumenta la rigidez de eritrocitos y disminuye citoadhesión
PFB0106c (34)	HM y citoesqueleto de eritrocito	RXLXE	Tráfico de PfEMP1
PF14_0758 (144)	Citoplasma de eritrocito	RXLXE	Tráfico de PfEMP1. Deleción incrementa rigidez del eritrocito. Contiene regiones repetidas
PF13_0076 (37)	Desconocida	RXLXE	Tráfico de PfEMP1
PFD0225w (490)	Desconocida	Ninguna	Deleción disminuye rigidez del eritrocito
<i>P. falciparum</i> two transmembrane Maurer's cleft protein family (PfMC-2TM, ~35)	HM	RXLXQ	Subfamilia de Stevor
Cys repeat modular proteins (PCRMPs)	HM	Ninguna	Quizás media en las interacciones huésped-parásito en diferentes del ciclo de vida
Early TRAnscribed Membrane Proteins/Small Exported Proteins (ETRAMP/SEP, ~11)	HM, membranas vacuola parasitofora y red tubovesicular	Ninguna	Desconocida
Ring exported protein 2. (REX2, 13)	HM	Ninguna	Desconocida
Erythrocyte Vesicle Protein (EVP1/ PFD0495c 101)	Membranas red tubovesicular	RXIXE	Promueve importación de lípidos mediados por red tubovesicular. Contiene regiones repetidas

Cerca del 8% de los productos génicos de *Plasmodium falciparum* contienen un motivo PEXEL/HT que hacen al “*exportoma*”, de esta especie 5 a 10 veces más grande que otros Plasmodium. No obstante, algunas proteínas exportadas, como la SBP-1 (*skeleton binding protein-1*), que no contiene ninguna de estas secuencias señal podrían ser transportadas por proteínas chaperonas que si poseen las secuencias apropiadas (Cheetham 1998; Spycher et al. 2008).

Toda esta evidencia reunida, se ha utilizado para proponer que el papel fisiológico de estas proteínas exportadas sería la transformación de una célula inerte y altamente diferenciada como es el eritrocito en una maquinaria adhesiva que actúa como incubadora para la eficiente replicación del parásito, mediante un proceso coordinado de remodelamiento de la membrana y citoesqueleto de la célula huésped (Figura 6).

Finalmente, a pesar de estos significativos avances en el estudio del “*exportoma*”; el tráfico y la exportación de proteínas del parásito hasta el citoplasma y la membrana del eritrocito sigue siendo un proceso complejo que no está totalmente elucidado. Menos conocida aún es la situación presente en casos de polimorfismos eritrocitarios seleccionados en áreas endémicas de malaria como el déficit de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), donde el elevado nivel de estrés oxidativo de la célula huésped quizás puede interferir con el tráfico, exportación y/o ensamblaje de las proteínas movilizadas.

1.3 Estrés oxidativo en malaria.

La relación entre el estado redox de los parásitos de la malaria y su célula huésped es compleja. Por una parte, las alteraciones redox contribuyen a la manifestación de síntomas como secuestro de eritrocito infectado, patología cerebral, anemia, trastorno respiratorio y malaria placentar (Becker et al. 2004; Ferreira et al. 2008). De otro lado, el estudio de las hemoglobinopatías (ej. talasemias y anemia falciforme) y otras enfermedades congénitas como el déficit de G6PD, que se caracterizan porque el eritrocito presenta un estatus oxidativo alterado, y confieren

resistencia natural frente a la malaria más grave (Bienzle et al. 1972; Ruwende et al. 1995; Guindo et al. 2007; Clark et al. 2009). Estas observaciones sugieren que Plasmodium es susceptible a las alteraciones en el equilibrio redox de su célula huésped (Becker et al. 2004) y por tanto el conocimiento de los efectos que se producen a este nivel podría tener implicaciones terapéuticas.

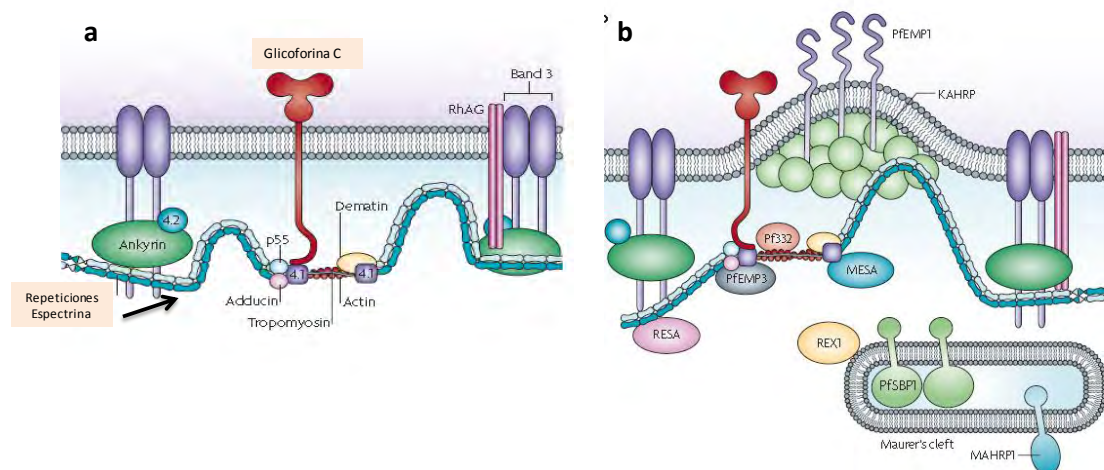


Figura 6. Citoesqueleto de membrana de eritrocitos humanos no-infectados e infectados por *P. falciparum*. **a.** En los eritrocitos no infectados los heterodímeros de espectrina conforman unidades de repetición enlazadas por bisagras flexibles que les permiten desplegarse en respuesta a tensiones de deformación. Las colas de los dímeros de espectrina son estabilizados por complejos de unión que comprende oligómeros de actina estabilizados por proteína 4.1R y otras moléculas. Destacan las interacciones verticales que conectan de manera adecuada el esqueleto subyacente a la membrana. Estas incluyen el enlace banda 3-ankyrina-espectrina y el complejo ternario entre la proteína 4.1R, p55 y glicoforina C. **b.** En los eritrocitos infectados, durante el estado de anillo, el antígeno RESA se asocia con la espectrina y estabiliza el esqueleto de membrana. Cuando se alcanzan las formas maduras, moléculas de KAHRP se autoasocian para formar estructuras cónicas que interactúan con la espectrina. Los antígenos Pf332 y MESA se enlazan a los complejos de unión mientras que PfEMP-3 se une a la espectrina comprometiendo aún más la deformabilidad de la membrana del eritrocito. La proteína mediadora de citoadherencia, PfEMP1 se concentra en la región de los knobs por interacción de su dominio citoplasmático con KAHRP. El dominio amino-terminal de PfEMP1 es presentado a la superficie extracelular desde donde puede interactuar con receptores de la célula huésped para mediar la citoadherencia. Proteínas del parásito asociadas a la membrana de las hendiduras de Maurer están involucradas en el tráfico de PfEMP1. La formación y arquitectura de esta organela es controlada por algunas de sus proteínas residentes como por ejemplo REX1, MAHRP1 y PfSBP1. Figura tomada de (Maier et al. 2009)

1.3.1 Estrés oxidativo en eritrocitos humanos.

Durante su corto periodo de vida de 120 días, el eritrocito está sometido al daño oxidativo en condiciones fisiológicas: 193 Kilómetros de tránsito y 1.7×10^5 ciclos circulatorios, el paso a través de capilares estrechos, periodos de alta turbulencia, roturas de vasos y condiciones extremadamente hipertónicas (Arese et al. 2005). El

estudio del daño oxidativo de los glóbulos rojos ha llamado la atención de los investigadores en diversas áreas de la biomedicina. Como por ejemplo, la senescencia celular (Berlett 1997), las lesiones oxidativas que puede sufrir el eritrocito durante su almacenamiento en los bancos de sangre (lesiones de almacenamiento) (D'Amici et al. 2007), los casos de hemoglobinopatías y de desequilibrio redox como el presente en el déficit de G6PD (Kakhniashvili et al. 2005) y su posibles mecanismos protectores frente a los síntomas graves de la malaria (Min-Oo 2005).

Estudios en eritrocitos humanos senescentes y ratones modificados genéticamente, han demostrado que el daño oxidativo puede afectar la vida media de los glóbulos rojos (Friedman et al. 2004; Arese et al. 2005). Así, en los eritrocitos humanos se ha observado que la senescencia va acompañada del daño oxidativo en la banda 3 (Arese et al. 2005; Karnchanaphanurach et al. 2009). Más aún que en condiciones fisiológicas normales esta proteína va acumulando gradualmente lesiones oxidativas durante el periodo de vida útil del eritrocito al tiempo que incrementa la afinidad de la membrana del eritrocito por anticuerpos naturales anti banda 3 (Pantaleo et al. 2008). De esta forma, componentes del complemento como los fragmentos C-3 se unen a los agregados anticuerpo-banda 3 para formar opsoninas que son reconocidas por el receptor CR1 de los fagocitos, resultando finalmente en la eliminación del eritrocito senescente (Arese et al. 2005; Pantaleo et al. 2008; Karnchanaphanurach et al. 2009).

Por otra parte, se ha propuesto que el daño oxidativo en condiciones patológicas tiene un impacto masivo sobre la banda-3 y que esto resulta en el acortamiento del periodo de vida útil mediante este mecanismo de fagocitosis temprana (Arese et al. 2005). Más recientemente, para estudiar el efecto del daño oxidativo sobre el periodo medio de vida del eritrocito se han utilizado ratones deficientes en el factor de transcripción FOXO3 (Marinkovic et al. 2007). Este factor es requerido para la expresión de catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peróxidasa, que son enzimas encargadas de las defensas antioxidantes. Estos ratones cuando están sometidos a un elevado estrés oxidativo mueren en un periodo de tres días. Sin embargo, bajo condiciones normales, la vida media de sus eritrocitos solo

alcanza hasta la mitad de la que tienen los ratones normales. Más aún, el tratamiento con antioxidantes como la N-acetil-cisteína incrementa la vida media de los eritrocitos hasta valores cercanos a los eritrocitos normales (Marinkovic et al. 2007).

También se ha descrito, que algunas de las reacciones adversas y complicaciones de la transfusión de glóbulos rojos están asociadas con un conjunto de cambios moleculares que ocurren a las células durante su almacenamiento (lesiones de almacenamiento). Dentro de ellos el daño oxidativo afecta tanto a lípidos como proteínas, como consecuencia de la liberación del O₂ y la formación de radical superóxido y metahemoglobina. Aunque el eritrocito normal contiene SOD y metahemoglobina reductasa, estas controlan de manera eficiente el desequilibrio oxidativo durante el periodo inicial de almacenaje. Sin embargo, la eficiencia de este control va disminuyendo a medida que progresa el tiempo de almacenamiento, debido a una disminución en el flujo metabólico de la glicolisis que favorece a su vez la formación de radicales hidroxilo por medio de la reacción de Fenton (Hess 2010).

En base a esta observación, se ha propuesto que la carbonilación de las proteínas banda 3 y de citoesqueleto de membrana debe producirse por diversas rutas. De hecho en el día 7 de almacenamiento, se ha descrito que el daño oxidativo prevalece en la proteína banda 4.2 seguido en menor extensión por la banda 4.1, banda 3 y espectrina (Kriebardis et al. 2006; D'Amici et al. 2007). Más aún, en el día 14 de almacenamiento el daño oxidativo sobre estas proteínas se muestra exacerbado (D'Amici et al. 2007).

La susceptibilidad de las proteínas de membrana del eritrocito se ha documentado también en el caso de las hemoglobinopatías. Este es un conjunto de alteraciones que afectan la estructura, función o la producción de hemoglobina y se caracterizan por mutaciones en las cadenas globina (Destro Bisol 1999; Fowkes et al. 2008). Dentro de las hemoglobinopatías estructurales destaca la anemia falciforme, no sola por ser la primera enfermedad hereditaria en la cual su base molecular fue elucidada, sino por su alta prevalencia en zonas endémicas de malaria (Pauling et al. 1949; Allison 1954; Ingram 1956).

El análisis cuantitativo por electroforesis bidimensional de las proteínas de membrana de pacientes con esta enfermedad congénita demuestra un incremento de la expresión de proteínas neutralizadoras de ROS (peroxirredoxinas y catalasas), componentes del proteasoma y proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *heat shock proteins*) en comparación con individuos controles (Kakhniashvili et al. 2005), probablemente para combatir las condiciones pro-oxidativas de la anemia de células falciformes. Por el contrario, proteínas de las balsas de lípidos (lipid rafts) como flotilina y estomatina están en menor proporción que en células normales, sugiriendo una liberación preferencial por vesiculación (Kakhniashvili et al. 2005).

Estas alteraciones parecen tener efectos compensatorios beneficiosos y como tal no son responsables de manifestaciones clínicas relevantes en pacientes con esta enfermedad (Kakhniashvili et al. 2005). Además, la fagocitosis temprana de eritrocitos infectados por el parásito de la malaria (*Plasmodium falciparum*), se ha propuesto como mecanismo protector frente a los síntomas severos del paludismo en individuos con anemia falciforme (Ayi et al. 2004).

El mecanismo propuesto involucra la deposición de hemicromos (derivados de hemoglobina) sobre el extremo amino terminal de la proteína banda-3, conduciendo a la formación de agregados banda-3, IgG anti banda 3 y fragmentos C3c que promoverían la fagocitación del eritrocito infectado (Ayi et al. 2004). Otros polimorfismos del eritrocito humano, como el déficit de G6PD y el tipo de grupo sanguíneo ABO, se han relacionado con la protección frente a los síntomas graves de la malaria, pero estos serán revisados más adelante.

1.3.2 Estrés oxidativo en eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum*.

En el eritrocito infectado se produce una elevada tasa metabólica por causa del rápido crecimiento y multiplicación del parásito. Esta actividad genera grandes cantidades de sub-productos tóxicos con actividad oxidante. Por ejemplo, la degradación de hemoglobina produce hemo libre (ferri/ferroprotoporfirina IX; FP) y ROS, como el peróxido de hidrógeno, provocando un desequilibrio redox en el

eritrocito que puede conducir a la carbonilación de proteínas (Wright et al. 2001). Sin embargo, el parásito cuenta con eficientes defensas antioxidantes representadas en la cristalización del hemo en hemozoina (Hempelmann 2002) y un sistema enzimático en cascada que incluye moléculas antioxidantes como tiorredoxina y glutatión y enzimas como superóxido dismutasas (SOD) y peróxidasas (Muller 2004; Nogueira et al. 2010) (Figura 7). Aunque la mayoría de FP es cristalizada como hemozoina, una pequeña fracción (~ 0.5%) no cristaliza, por lo que sus efectos nocivos son controlados por los sistemas enzimáticos mencionados (Egan et al. 2002).

La formación de hemozoina va acompañada de un incremento en la formación de aductos de proteína con el aldehído 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) en la superficie del eritrocito infectado, alcanzando su máximo en la fase de esquizontes (Skorokhod et al. 2007). La formación de estos aductos se ha asociado con una disminución en la deformabilidad del eritrocito infectado en una manera dependiente de la cantidad de aductos producidos. La reducida deformabilidad de los eritrocitos circulantes con aductos 4-HNE-proteína en su superficie quizás resulta en un marcaje que incrementa su fagocitosis por monocitos y macrófagos (Skorokhod et al. 2007). La descontrolada formación de 4-HNE tal vez afecta a otros eritrocitos circulantes no parasitados, induciendo su fagocitosis y contribuyendo a agravarse la anemia que podría provocar una malaria grave de tipo sanguíneo (Giribaldi et al. 2004).

Otro tipo de malaria grave está asociada al secuestro de los eritrocitos parasitados en lo profundo de la microvasculatura y que también se ven favorecidos por las alteraciones redox (Chen et al. 2000). El incremento de ROS aumenta la expresión de algunos de los receptores de eritrocitos infectados en la superficie del endotelio vascular (Sherman et al. 2003). De esta forma, se incrementa la interacción entre la principal adhesina del parásito, PEMP-1, con los receptores endoteliales CD36, CSA, ICAM-1 y P-selectina (Ockenhouse et al. 1992; Treutiger et al. 1997; Udomsangpetch et al. 1997; Sherman et al. 2003). La obstrucción de la microvasculatura, causada por aumento de la rigidez del eritrocito infectado, en presencia de anemia quizás exacerba la acidosis láctica mediante un incremento de la

glicolisis anaeróbica. De esta forma se asociaría el estrés oxidativo con la aparición de los trastornos respiratorios típicos en malaria grave (Becker et al. 2004).

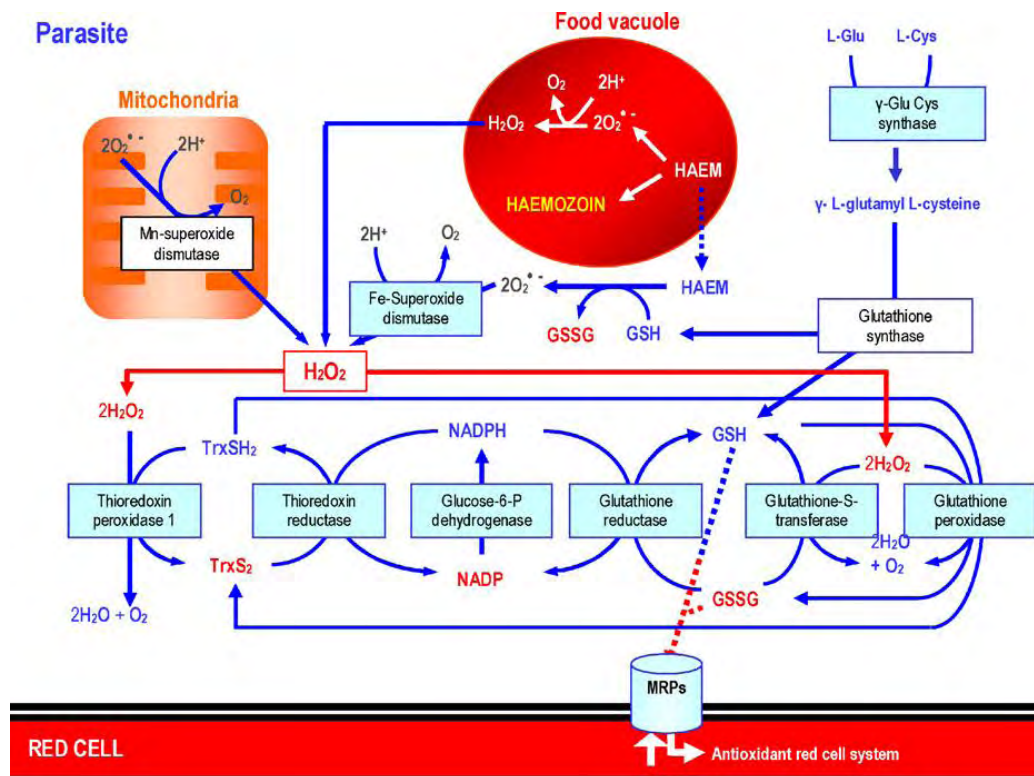


Figura 7. Sistema endógeno de defensa antioxidante en *Plasmodium falciparum*. Durante el ciclo intraeritrocitario de *P. falciparum* la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) es la digestión de la hemoglobina en la vacuola digestiva. Parte del hemo es liberado al citoplasma, donde genera aniones superóxido, los cuales son detoxificados por principalmente por Fe-superóxido dismutasas citosólicas para producir H_2O_2 . Dado que *P. falciparum* carece de catalasas, la reducción del H_2O_2 se realiza mediante los ciclos redox de tiorredoxina o glutatión. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa suministra equivalentes reductores NADPH para ambos ciclos redox, los cuales incluyen proteínas que transfieren estos equivalentes a sus respectivas moléculasceptoras. El glutatión *de novo* es suministrado por la γ -Glu-Cys sintasa. En *Plasmodium*, los ciclos de redox de tiorredoxina y glutatión se enlazan por vía de la glutatión peroxidasa, que también utiliza como sustrato a la tiorredoxina, creando una condición de relevancia fisiológica en el estrés oxidativo elevado. El glutatión reducido (GSH) también toma parte en la detoxificación del hemo. Como sustrato de glutatión S-transferasa, GSSG se conjuga a compuestos no degradables, incluidos los medicamentos antimaláricos. Al igual que otros organismos eucariotas, el parásito es capaz de transportar GSSG, conjugados de glutatión y GSH en presencia de drogas a través de múltiples transportadores de la resistencia (MRP). Tomado de (Nogueira et al. 2010).

1.3.3 Mecanismos de acción de drogas antimaláricas que afectan el metabolismo redox del eritrocito.

La terapia mediante el empleo de fármacos sigue siendo el pilar fundamental del tratamiento y prevención de la malaria (Daily 2006). Dentro de estos, destacan las 4 y 8 amino-quinolinas y las artemisininas por su amplio uso.

Los fármacos derivados de 4-aminoquinolina son una clase importante de drogas que actúan en el entorno del proceso de degradación de la hemoglobina por el parásito. El principal representante dentro este grupo es la cloroquina, la cuál es una base débil anfipática que se acumula en la vacuola digestiva (Egan 2001). En esta localización se piensa que también interactúa con la FP impidiendo su polimerización a hemozoina. De esta forma, la FP libre causa daño en las membranas y enzimas del parásito debido a sus propiedades detergentes y su capacidad para incrementar reacciones redox perjudiciales para el parásito que no pueden ser neutralizadas (Pandey et al. 2001).

En respuesta a la cloroquina, han emergido cepas de *Plasmodium* resistentes a su acción. Esta resistencia se asocia con modificaciones en las proteínas de membrana que transportan la droga (Pgh1), el transportador de resistencia a cloroquina (pfcr1) y la modulación de la actividad enzimática de glutatión reducido (GSH) del parásito (Ginsburg et al. 1998; Fidock et al. 2000; Reed et al. 2000).

Con respecto a las 8-aminoquinolinas, la primaquina destaca por seguir siendo la droga de primera elección para el tratamiento clínico de formas exo-eritrocitarias de infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* (Shanks et al. 2001). Sin embargo a pesar de varias décadas de uso, su mecanismo de acción no es del todo comprendido.

Se ha propuesto que los metabolitos hidroxilados de la primaquina son los responsables tanto del mecanismo de acción como de los efectos hemolíticos secundarios (Bolchoz et al. 2002). Estos metabolitos quinónicos ejercen un sustancial estrés oxidativo en el eritrocito que resulta en la depleción de GSH y NADPH; reduciendo la capacidad de la célula para detoxificar las ROS (Bolchoz et al. 2002).

Es por este mecanismo que el uso clínico de la primaquina en células con bajo nivel de GSH (por ejemplo, en individuos con déficit de G6PD) sea limitado; dado que aún con moderadas dosis de primaquina, se produce una meta-hemoglobinemia extensiva que desencadena la oxidación de lípidos y proteínas de membrana y posterior hemolisis aguda (Bolchoz et al. 2002).

Por su parte, las artemisininas son sesquiterpen-trioxano-lactonas cuyo endoperoxido es esencial para la actividad antimalárica (O'Neill et al. 2010). A pesar de ser consideradas actualmente como las drogas más activas y de rápida respuesta antimalárica (Schlitzer 2007), su mecanismo exacto de acción se mantiene sin resolver y es materia de intensos debates (O'Neill et al. 2010).

No obstante, existen fuertes evidencias que sugieren que el activador primario es una fuente de hierro, en la forma de Fe^{2+} , hemo o ambos (O'Neill et al. 2010). Posteriormente, se cree que las artemisininas alquilan diferentes moléculas blanco como el hemo, hemoproteínas (como la catalasa, citocromo c y hemoglobina) y la bomba de Ca^{2+} de *P. falciparum* ATP-dependiente (PfATP6) y lípidos de la membrana plasmática del parásito (O'Neill et al. 2010).

La secuenciación del genoma de *P. falciparum*, los avances en el conocimiento de su proteoma, la emergencia de resistencias a drogas antimaláricas y los avances en técnicas moleculares de alta eficiencia han redirigido los esfuerzos para el descubrimiento de nuevos o fármacos o dianas para el tratamiento de la malaria. Así, para el desarrollo de nuevos fármacos basados en mecanismos redox se vienen evaluando sustancias pro-oxidantes (peroxi-derivados y azul de metileno), híbridos de doble pro-fármacos, análogos de flavina, antraquinonas y xantonas (Becker et al. 2004). Mientras desde el punto de vista de dianas del parásito destacan la glutatión reductasa, la S-transferasa y la G6PD-6PGL (O'Brien et al. 1994; Sodeinde et al. 2003; Becker et al. 2004; Croke et al. 2006). Estas evidencias experimentales ponen de manifiesto la necesidad de comprender a fondo el papel del estrés oxidativo en el eritrocito infectado y la manera como este contribuye a la protección contra los síntomas graves de la enfermedad en los diferentes polimorfismos eritrocitarios que prevalecen en las regiones endémicas de malaria.

2. POLIMORFISMOS ERITROCITARIOS PROTECTORES FRENTE A MALARIA GRAVE.

Estudios epidemiológicos en seres humanos y los experimentos en modelos animales han demostrado que los factores genéticos desempeñan un papel clave en el inicio, progresión y en última instancia el resultado de la malaria (Min-Oo 2005).

De esta forma, en los asentamientos humanos donde la malaria es endémica se han seleccionado diferentes variantes polimórficas de los eritrocitos por la protección que confieren contra los síntomas más graves de la enfermedad. Así, se ha propuesto que el efecto protector conferido por dichas variantes se debe a una disminución en la capacidad del parásito para invadir o desarrollarse en los eritrocitos (Fowkes et al. 2008). Estos polimorfismos se producen por mutaciones en las proteínas de citoesqueleto que generan trastornos como la esferocitosis (An 2008; Perrotta et al. 2008), mutaciones de la hemoglobina que producen anemia falciforme (Allison 1954; Aidoo et al. 2002) y talasemias (Modiano et al. 1991; Allen et al. 1997), mutaciones en enzimas del metabolismo oxidativo como el déficit de G6PD (Bienzle et al. 1975; Clark et al. 2009) y de la síntesis de grupos sanguíneos (Cserti 2007; Loscertales et al. 2007). Estos últimos polimorfismos mencionados, el déficit de G6PD y el tipo de grupo sanguíneo ABO, por ser objeto de nuestro estudio serán revisados con mayor detalle a continuación.

2.1 Déficit de glucosa-6-fostato deshidrogenasa y su relación con malaria.

La deficiencia de glucosa-6-fostato deshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía humana hereditaria más frecuente con cerca de 400 millones de personas afectadas en el mundo. Esta deficiencia es causada por mutaciones en el gen G6PD ubicado en el cromosoma X en posición q28. Ictericia neonatal, anemia hemolítica aguda y anemia hemolítica crónica, son las manifestaciones clínicas más importantes de esta alteración, que tradicionalmente ha sido un problema médico en países con historial de malaria endémica como África, India, el Mediterráneo, China y los países tropicales

por el incremento en crisis de anemia aguda asociado a medicamentos, infecciones y alimentos (Mason et al. 2007).

El monómero de la G6PD humana es una proteína de 514 aminoácidos cuya forma activa es de homo-dímero u homo-tetrámero (Figura 8). La G6PD cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato a fosfogluconolactona con la concomitante reducción de NADP a NADPH, que es importante en las células para la producción de equivalentes reductores en forma de NADPH y de pentosas para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (Figura 9).

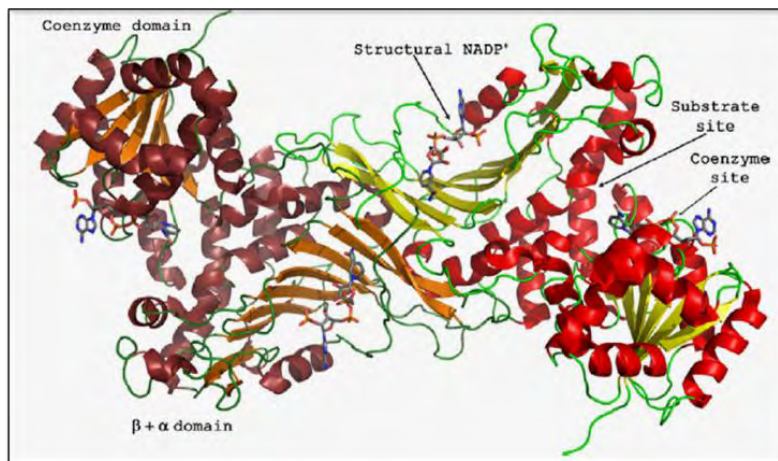


Figura 8. Estructura del dímero de G6PD humana. En la figura se observa la estructura del dominio del sitio activo y la posición de la molécula de NADP. Una subunidad está en rojo y verde, mientras que la otra está sombreada de marrón. Imagen adaptada a partir de (Mason et al. 2007).

En los glóbulos rojos esta ruta es la única fuente de NADPH, siendo esencial para proteger al eritrocito contra niveles fisiológicamente elevados de daño oxidativo y que es controlado por los niveles elevados de glutatión reducido (GSH) (Filosa et al. 2003). A través de la glutarredoxina (Grx en la figura 9), el GSH protege los grupos sulfhídricos de la hemoglobina y la membrana del eritrocito, pero en presencia de agentes oxidantes, en forma de radicales libres o peróxidos, el nivel de GSH disminuye, aunque puede ser restaurado por acción de la glutatión reductasa si cuenta con un adecuado suplemento de NADPH (Mason et al. 2007).

En otras células, las reacciones dependientes de NADP pueden aportar una gran proporción del NADPH requerido bajo condiciones normales; no obstante la G6PD

es la única enzima productora de NADPH que se activa en respuesta al stress oxidativo en el eritrocito (Vulliamy et al. 1998), pero si su actividad no es suficiente o está disminuida por un déficit puede ocurrir el daño oxidativo y posterior hemólisis (Cappellini 2008).

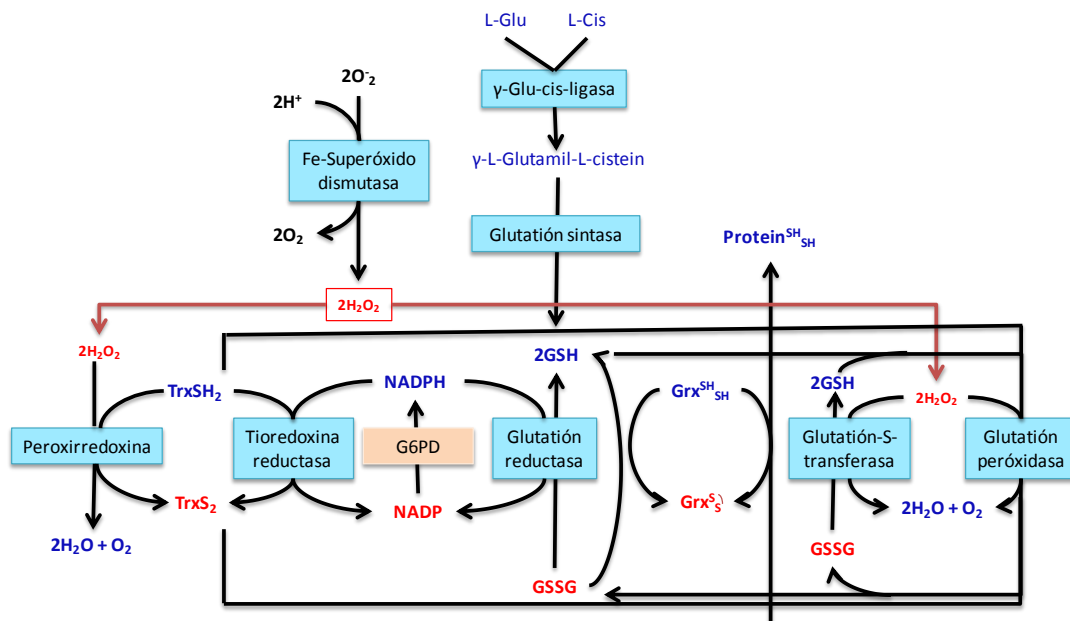


Figura 9. La G6PD tiene un papel central en la defensa antioxidante del eritrocito. G6PD suministra el NADPH para la cascada antioxidante en el eritrocito. A través de la glutatión sintasa, el glutatión es sintetizado *de novo* y suministrado a la glutatión peróxidasa para la detoxificación del peróxido de hidrógeno. El reciclaje del glutatión oxidado es catalizado por las enzimas glutatión-S-transferasa y glutatión reductasa. Esta última enzima también suministra glutatión a la glutarredoxina (Grx), una enzima tiol-transferasa que mantiene reactivo a los grupos tioles de la hemoglobina, espectrina, fosfructoquinasa y otras proteínas esenciales de eritrocito en su estado funcional reducido. La peroxirredoxina del eritrocito reduce tanto al peróxido de hidrógeno como a los peróxidos orgánicos, protegiendo así a la membrana contra la peroxidación lipídica. Para ello, deriva su poder reductor de las reacciones acopladas tiorredoxina reductasa-G6PD. Esquema adaptado a partir de (Mason et al. 2007).

Aunque la G6PD está presente en todas las células su concentración varía en los diferentes tejidos por ejemplo en la médula ósea, vesícula biliar, ovarios, bazo y células de Leydig se encuentra altamente expresada, mientras que está ausente en cerebelo, corteza cerebral, músculo cardíaco y esquelético (Hodge et al. 1998). En los eritrocitos de individuos saludables, la enzima opera entre el 1% al 2% de máximo potencial, aún bajo condiciones fisiológicas de stress oxidativo, manteniendo así una gran reserva de potencial reductor que está sustancialmente disminuido en eritrocitos deficientes de G6PD (Mason et al. 2007).

Existen más de 140 mutaciones del gen humano de la *G6PD* que han sido identificadas y agrupadas dentro de cinco clases basándose en la actividad enzimática y las manifestaciones clínicas (Tabla 3) (Cappellini 2008).

Tabla 3. Clases de déficit clínico de G6PD (Cappellini 2008)

Clase de Déficit	Característica
I	Déficit grave, asociado con anemia hemolítica crónica no esferocítica
II	Déficit grave con 1 a 10% de actividad enzimática residual, asociado con anemia hemolítica aguda
III	Déficit moderado deficiente con 10 a 60% de actividad enzimática residual
IV	Actividad Normal con 60 a 150% de actividad enzimática
V	Actividad incrementada mayor de 150% de actividad enzimática

El déficit de G6PD no parece afectar la calidad de vida o la actividad de los individuos afectados, por ello la mayoría de las personas que lo padecen es asintomática y puede permanecer inconsciente de su estado durante toda su vida. La enfermedad generalmente se manifiesta con una aguda hemólisis, que suele producirse cuando los glóbulos rojos se ven sometidos al estrés oxidativo provocado por agentes externos como infecciones, medicamentos o la ingestión de habas (*Vicia faba*) (Cappellini 2008).

La alta prevalencia de las variantes polimórficas de la G6PD en varios grupos étnicos y poblacionales, incrementa la probabilidad de establecer asociaciones con otras condiciones patológicas (Min-Oo 2005).

Las variantes clase I se consideran formas raras y severas, asociada con la anemia hemolítica no esferocítica crónica y todos sus casos se consideran de aparición esporádica (Vulliamy et al. 1998).

Las variantes polimórficas de la G6PD que han alcanzado apreciables frecuencias génicas (1-70%) en poblaciones particulares son las de clase II y III y están asociadas a regiones de alta prevalencia de malaria.

Tabla 4. Principales variantes polimórficas de la G6PD y su distribución geográfica (Mason et al. 2007)

Nombre de la mutación	Cambio(s) de aminoácido(s)	Comentario	Distribution
Gaohe	32His->Arg		China, Tailandia, Malasia
Honiara	33Ile->Met, 44Ala->Gly	Puede ser una mutación neutra sobre un antecedente de unión a	Islas Solomón
Orissa	454Arg->Cys		India Tribal, Mauricio, Malasia
Aures	48Ile->Thr		Algeria, Kuwait, Arabia Saudi, UAE, España
Metaponto	58Asp->Asn		Italia
A-	68Val->Met; 126Asn->Asp	Se encuentra en personas de origen africano en todo el mundo	África, España, Portugal, Oriente Medio, Brasil etc.
Namoru	70Tyr->His		India Tribal (Sur)
Ube-Konan	81Arg->Cys	Las variantes más comunes se encuentran en Japón	Japón
Vanua Lava	128Leu->Pro		Malasia, Indonesia, Vanuatu
Mahidol	163Gly->Ser	Variante común en Thais	China, Sur Este de Asia
Santamaría	181Asp->Val; 126Asn->Asp		España, México, Costa Rica, Argelia, Sicilia
Mediterránea	188Ser->Phe	Es la mutación más común en muchos países del Mediterráneo y de Oriente Medio y el subcontinente Indio. Se encuentra en las personas de origen mediterráneo en cualquier parte del mundo. Puede haber surgido independientemente en el área mediterránea y en la India	India, Malasia, Italia, Grecia, España, Portugal, Medio Este, Croacia, Brasil, etc
Coimbra	198Arg->Cys		Italia, Malasia, Indonesia, Cambodia
Seattle	282Asp->His	Amplia distribución. Única variante encontrada en un estudio en Islas Canarias	Sardinia, Brasil, México, España, Portugal, Islas Canarias, Italia, Grecia, Croacia
Montalbano	285Arg->His		Italia
Viangchan	291Val->Met	La variante más común en Tailandia y Cambodia	China, Tailandia, Malasia, Cambodia, Laos, Indonesia,
Kerala/Kalyan	317Glu->Lys		India
A-(968)	323Leu->Pro, 126Asn->Asp		España
Chatham	335Ala->Thr		India, Indonesia, Italia, Irán, Malasia, Kuwait, Indonesia, China, España, Japón
Chinese-5	342Leu->Phe		China, Malasia, Tailandia, Singapur
Ierapetra	353Pro->Ser		Grecia
Cassano	449Gln->His		Italia, Grecia
Unión	454Arg->Cys	Amplia distribución	Islas Solomón, Vanuatu, Croacia, China, Italia, España, México, Cambodia, Tailandia, Malasia
Cantón	459Arg->Leu	Variante más común hallada en un estudio en Singapur y entre Chinos Malasios. Común en población China	China, Sur Este de Asia
Cosenza	459Arg->Pro	Mutación más común en un estudio en Croacia	Italia, Irán, Croacia
Kaiping	463Arg->His	Común en Chinos. Variante más común en Flores, Indonesia	China, Sur Este de Asia, Indonesia

Dependiendo del área geográfica prevalece un conjunto de variantes polimórficas que confiere resistencia a las formas graves de la enfermedad (Tabla 4). Así por ejemplo, la variante Mediterránea (Ser188Phe) se encuentra ampliamente distribuida en áreas del Mediterráneo (España, Italia, Grecia), el Oriente Medio y el subcontinente Indio; mientras que la variante A⁻ (Val68Met y Asn128Asp) es prácticamente la única en todo África (Mason et al. 2007).

Desde un punto de vista molecular, el daño oxidativo en la proteínas de membrana del eritrocito con déficit de G6PD puede ocurrir por oxidación directa de los grupos tioles de las proteínas o de manera indirecta mediante la unión de productos de desnaturalización de la hemoglobina (hemicromos y cuerpos de Heinz) (Arese 1990). Este daño se ve incrementado en la infección por malaria debido al estrés oxidativo que induce el parásito sobre su célula huésped y que se asocia a un incremento de la rigidez de la membrana a causa de las alteraciones en la composición de lípidos y el entrecruzamiento de sus proteínas de membrana (Destro Bisol 1999; Giribaldi et al. 2001; Omodeo-Sale et al. 2003).

Los eritrocitos parasitados muestran incrementos significativos en la expresión de ARNm parasitario de sus enzimas antioxidantes y proteínas de choque térmico en un intento de adaptación al medio ambiente con elevado estrés oxidativo (Akide-Ndunge et al. 2009; Nogueira et al. 2010).

Estos incrementos significativos solo se han observado cuando el parásito madura hasta la forma de trofozoitos, indicando que la respuesta es dependiente del estadio de desarrollo del parásito. Así, incrementos en la proporción relativa de expresión de los ARNm entre 1.7 y 2.0 se han observado en trofozoitos crecidos en eritrocitos normales para las enzimas antioxidantes y HSPs frente al estadio de anillo. Mientras que parásitos en trofozoitos, cultivados en eritrocitos con déficit de G6PD mostraron valores de 4.0 y 8.5 para los mismos productos (Akide-Ndunge et al. 2009).

Al ser esta una respuesta tardía por parte del parásito, se ha demostrado en estudios de fagocitosis mediada por monocitos, que los parásitos cultivados en eritrocitos con déficit de G6PD son eliminados con mayor rapidez durante el estado de

anillos que los cultivados en eritrocitos normales; sin embargo, no se observaron diferencias en la fagocitosis en cultivos de formas maduras (trofozoitos y esquizontes) (Cappadoro et al. 1998).

La eliminación temprana por fagocitosis como mecanismo protector en el déficit de G6PD frente a la malaria grave podría ser un sistema similar al observado en las células senescentes (Arese et al. 2005). Así, la formación de complejos de alto peso molecular que contienen principalmente agregados de banda-3, hemicromos, IgG y fragmentos C3b (Cappadoro et al. 1998), podrían estar implicados en ambos mecanismos, aunque no se ha demostrado en el déficit de G6PD.

El mecanismo centrado en banda-3 quizás eleva varios interrogantes relacionados con el daño oxidativo que ocurre en otras proteínas de membrana del eritrocito infectado. Así por ejemplo, se desconoce si sería suficiente la agregación de la banda 3 para desencadenar el mecanismo protector, o si participan otras proteínas diferentes a la banda 3. Por otra parte resulta del máximo interés conocer que funciones del eritrocito (y del parásito) se pueden ver afectados por el daño oxidativo y si pudiesen servir de dianas terapéuticas o inmunológicas en la malaria.

2.2 Polimorfismo de grupos sanguíneos ABO y su relación con la malaria.

En la práctica clínica, ABO es el sistema de compatibilidad de grupos sanguíneos más importante. Quizás por esto, es probablemente el sistema de grupos sanguíneos más conocido y el de mayor misterio funcional y de polimorfismo genético en humanos.

La membrana de cada eritrocito contiene millones de antígenos que son ignorados por el sistema inmune, pero cuando una persona recibe una transfusión sanguínea, su sistema inmune puede reaccionar frente a los eritrocitos del donante que contengan antígenos diferentes a los del receptor (Daniels 2007).

Los antígenos pueden ser azúcares o proteínas y pueden estar unidos a varios componentes en la membrana del glóbulo rojo. Por ejemplo, los antígenos del grupo

Rh son proteínas mientras que en los grupos sanguíneos ABO son carbohidratos. Los antígenos A y B son los trisacáridos N-ácetilgalactosil- α -1-3(α -1-2 fucosil) β -1-galactósido y galactosil α -1-3 (α -1-2 fucosil) β -1-galactósido respectivamente, en cambio las proteínas antigénicas de grupos sanguíneos pueden ser de 3 tipos: proteínas de un solo paso, multipaso y ligadas a GPI (Figura 10) (Landsteiner 1900; von Decastello A 1910; Dean 2005).

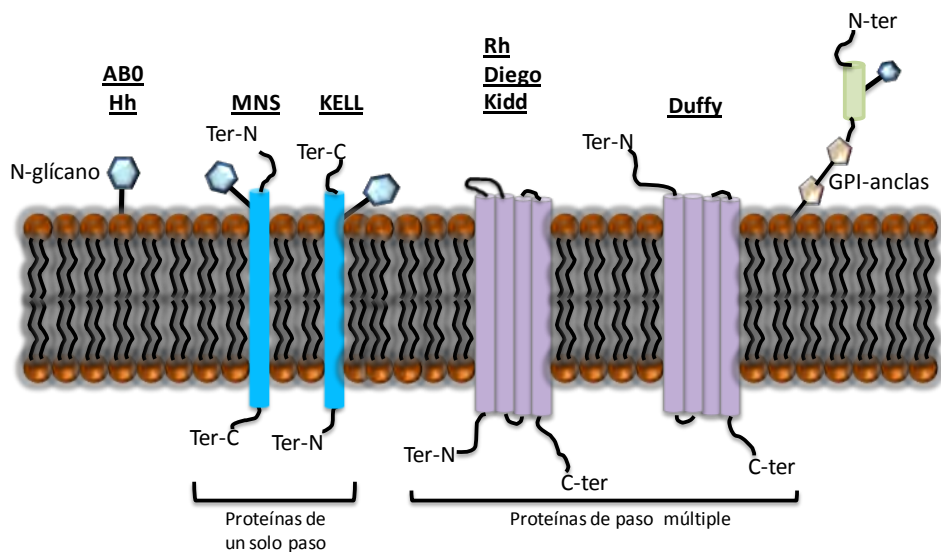


Figura 10. Antígenos de superficie de eritrocitos y grupos sanguíneos. La figura corresponde a una ilustración de la membrana plasmática del eritrocito con algunos de los 22 antígenos de grupos sanguíneos descritos.

Los antígenos del sistema ABO son oligosacáridos denominados determinantes A, B y H. Estas moléculas son construidas secuencialmente por distintas glicosil-transferasas que a su vez están determinadas por diferente locus génico (los loci ABO, H, y secretor) (Watkins 1980; Oriol et al. 1986).

Las glicosil-transferasas operan sobre uno de los cuatro tipos de oligosacáridos precursores sintetizados por las células humanas. Así, oligosacáridos precursores de tipo 1 se encuentran al final de la cadena lineal y ramificada de oligosacáridos enlazados a proteínas mediante residuos de asparaginas, serinas o treoninas. Los precursores tipo 1 solo se sintetizan por lo epitelios de varias células que los vierten a los fluidos corporales y las secreciones. Los determinantes ABH expresados por lo eritrocitos son principalmente del tipo 2 y 4. Mientras los de tipo 2 son oligosacáridos

enlazados a asparaginas, serinas o treoninas, los del tipo 4 son glicolípidos. Por último, los de tipo 3 se expresan en mucinas (Watkins 1980; Oriol 1990).

La síntesis de los antígenos de grupos sanguíneos ABO comienza con la modificación de los oligosacáridos de tipo 1 o 2 por las α -1,2-fucosil-transferasas (α 1-2FucTs) en una reacción de trans-glicosilación. Estas enzimas transfieren el azúcar fucosa al carbono 2 de la molécula de galactosa presente en los oligosacáridos precursores (Oriol et al. 1986). La fucosa es enlazada mediante un enlace α -anómico dando origen a determinantes H (Figura 11).

El genoma humano codifica 2 tipos de α 1-2FucTs, codificadas por los loci H y secretor (Se). La H α 1-2FucTs se expresa en células precursoras de eritrocitos donde transfieren la fucosa a oligosacáridos de tipo 1 y 4. Por su parte, la Se α 1-2FucTs se expresa en células epiteliales donde utiliza oligosacáridos de tipo 1 y 3 (Oriol 1990; Joziase 1992; Rouquier et al. 1995).

Seguidamente, los determinantes de grupos A o B se forman por la acción de glicosil-transferasas codificadas por el locus ABO. El epítipo del grupo A está formado por el trisacárido N-ácetilgalactosil- α -1-3(α -1-2 fucosil) β -1-galactósido codificado en el alelo A de locus ABO. El alelo B del locus ABO, codifica para el trisacárido galactosil α -1-3 (α -1-2 fucosil) β -1-galactósido, el cual corresponde al azúcar determinante del grupo B. Alelos O del locus ABO codifican una A/B glicosil-transferasa inactiva (Varki 2009).

Los antígenos ABO se expresan sobre glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de los eritrocitos y otras células de diversos tejidos (Varki 2009). Sobre cada eritrocito, cerca de 1-2 millones de determinantes ABH (~80% del total) se unen a la proteína banda 3. Cerca de medio millón se unen al transportador de glucosa (proteína banda 4.5) y un pequeño número se expresa sobre otras glicoproteínas. Cada eritrocito también expresa cerca de medio millón de determinantes ABH enlazados a glicolípidos (Hearn et al. 1968; Laine 1988).

Los antígenos del grupo ABO son los más inmunogénicos entre los diferentes grupos sanguíneos y se cree que emergieron con la aparición de los humanos

modernos en África hace aproximadamente 200.000 años durante un periodo solapante con el desarrollo de la especie de *Plasmodium falciparum* (Cserti 2007).

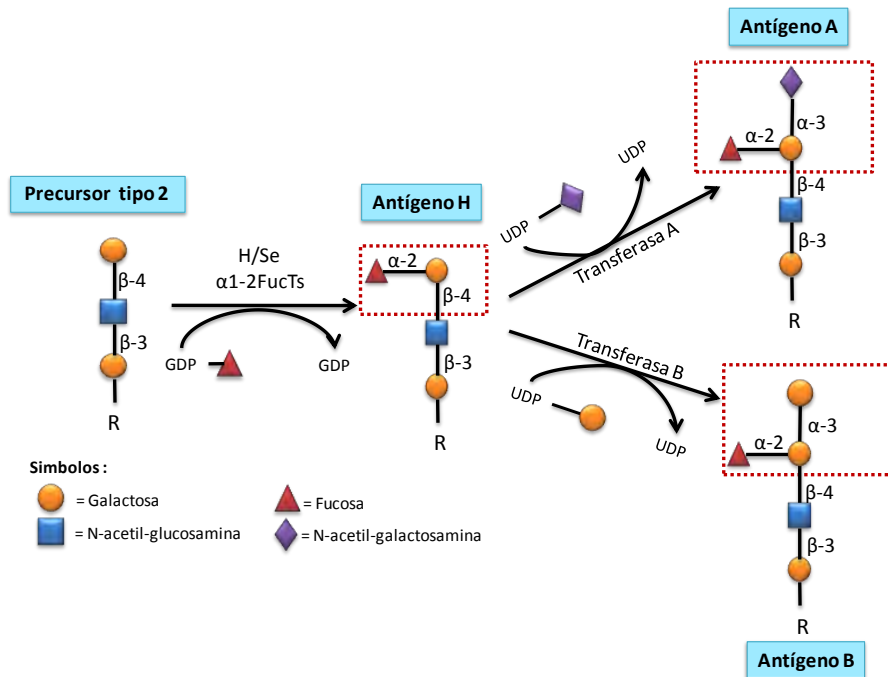


Figura 11. Biosíntesis de los antígenos H, A y B de grupos sanguíneos AB0. Enzimas de α 1-2FucTs transfieren la fucosa a moléculas de galactosa terminal presentes en el oligosacárido precursor, formado en el antígeno H. Posteriormente, glicosiltransferasas A o B transfieren los azúcares correspondientes de los respectivos grupos A y B.

Además, la distribución actual mundial de los grupos ABO sugiere que la prevalencia de grupo 0 quizás aporta un particular tipo de ventaja selectiva frente a la malaria (Tabla 5) (Cserti 2007; Rowe et al. 2007). Sin embargo, las funciones fisiológicas de los antígenos ABO sigue siendo el mayor misterio funcional de polimorfismo genético en humanos (Dean 2005; Cserti 2007).

Tabla 5. Frecuencia de grupos sanguíneos ABO por grupo poblacional

Población	% Grupo					
	0	A1	A2	B	A1B	A2B
Caucásicos	44	33	10	9	3	1
Negros	49	19	8	20	3	1
Asiáticos	43	27	raro	25	5	raro

La prevalencia del grupo 0 en regiones endémicas de malaria apoya la hipótesis de que este grupo ofrece ventajas de supervivencia frente al grupo A que conferiría

una desventaja, mientras que el grupo B parecería tener un efecto intermedio. Esta hipótesis se sustenta por los valores elevados del cociente grupo O / grupo A en las regiones donde la malaria prevalece actualmente o fue endémica (Tabla 6) (Cserti 2007; Rowe et al. 2007). Más aún, en un estudio de casos y control de 567 niños de Malí, el grupo O fue asociado con una reducción de 66% en los ratios de probabilidad de desarrollo de malaria severa en comparación con el resto de grupos ABO. Adicionalmente un número bajo de rosetas, estadísticamente significativo, fue igualmente asociado al grupo O en comparación con los otros grupos (Rowe et al. 2007). Las rosetas son los agregados de eritrocitos parasitados y no parasitados asociados entre sí mediante adhesividad celular y que da lugar a las formas graves de malaria orgánica en cerebro, placenta, riñón y pulmón principalmente (Rowe et al. 1997).

Se ha propuesto como mecanismo molecular de protección del grupo O frente a malaria severa un modelo hipotético de adhesión reducida a las células endoteliales de los capilares sanguíneos en órganos como cerebro y placenta (Figura 12) (Cserti 2007; Rowe et al. 2007). No obstante, sigue siendo un misterio funcional los procesos moleculares involucrados en la hipotética protección ofrecida por el grupo O.

Respecto a la funcionalidad asociada al papel protector frente a la malaria del grupo O son muchos los interrogantes que se plantean debido a la falta de evidencias experimentales. Así por ejemplo, dado que otros polimorfismos eritrocitarios comparten un mecanismo común de daño oxidativo sobre la banda 3, se sugiere que los polimorfismos ABO también pueden ejercer una influencia por la asociación estructural existente; o bien que otras proteínas diferentes a la banda 3 puedan también intervenir. A este respecto, cabe también cuestionar si existen diferencias en los patrones de oxidación de las proteínas de membrana en eritrocitos con estos polimorfismo.

Tabla 6. Frecuencias de grupos sanguíneos AB0 en regiones de alta prevalencia actual o histórica de malaria. Datos tomados de (Cserti 2007)

País/población	% Grupo			Cociente 0/A	Área de malaria (actual o en pasado)
	0	A	no-0		
Sudeste de Nigeria	87	8	13	11	Si
Sudán	62	16	38	3.86	si
Kenia/Kikuyu	60	19	40	3.16	Si
African Bushmen	56	34	44	1.65	Si
Republica Central Africana	44	28	56	1.57	Si
Congo	52	24	48	2.17	Si
Eritrea/Somalia	60	22	40	2.73	Si
Ghana	47	23	53	2.04	Si
Namibia	47	10	53	4.7	Si
América Central; Amazonía	90	<10	10	>9	Si
Norte América/Indios Navajo	73	27	27	2.7	Si
USA, general/Indios	79	16	21	4.94	Si
Persia	38	33	62	1.15	Si
Turquía	43	34	57	1.26	Si
Filipinas	45	22	55	2.04	Si
Vietnam	42	22	58	1.91	Si
Papúa, Nueva Guinea	41	27	59	1.52	Si
Finlandia	34	41	66	0.83	No
Austria y Hungría	36	44	64	0.82	No
Suecia	38	47	62	0.81	No
Suiza	40	50	60	0.80	No
Noruega	39	50	61	0.78	No
Bulgaria	32	44	68	0.73	No
Republica Checa	30	44	70	0.68	No
Portugal	35	53	65	0.66	No

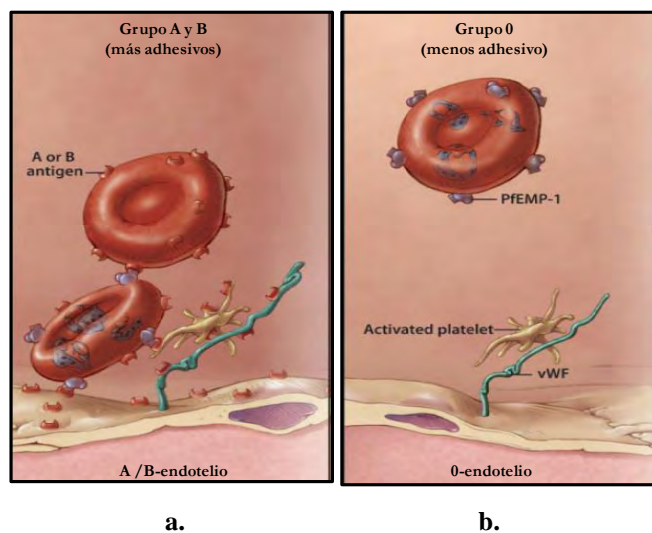


Figura 12. Modelo hipotético de citoadhesión de eritrocitos parasitados con diferente grupo sanguíneo AB0 a) Los eritrocitos infectados expresan proteínas de adhesión como la PfEMP-1 en su superficie. Estas proteínas son exportadas por el parásito y pueden unirse a través de los determinantes de grupo A o B a otras células, como por ejemplo un eritrocito no infectado (adherencia homo-típica) por un mecanismo similar a la adhesión por lectinas. A su vez, por intermedio de los antígenos de grupos A y B la célula infectada se adhiere al endotelio vascular de manera directa o indirecta (adherencia hetero-típica) a través de las plaquetas o el factor de Von Willebrand (glicoproteína de la hemostasia). b) La ausencia de trisacáridos determinantes sobre el grupo cero hacen que este mecanismo de adhesión mediada por antígenos de grupo sanguíneo no sea posible. Imagen adaptada de (Cserti 2007).

3. OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS: MECANISMOS DE OXIDACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL ESQUELETO CARBONADO DE UNA PROTEÍNA.

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la respiración celular de todos los organismos aeróbicos. Si bien su reactividad química constituye una fuente de energía para impulsar el proceso de la vida, también lo convierten en una toxina potencialmente peligrosa. Las ROS son productos altamente reactivos que resultan de la utilización del O_2 , generándose constantemente dentro de las células a bajas concentraciones en condiciones fisiológicas y jugando un papel importante en la regulación redox celular.

Sin embargo, el incremento de estas especies, por cualquiera de sus dos vías generales de formación (enzimática y no enzimática) describe una condición fisiológica en la cual las defensas antioxidantes de las células son incapaces de inactivarlas completamente (Dalle-Donne, Rossi et al. 2006). Dentro de las ROS, se incluye un número de radicales primarios ($\bullet OH$, $O_2^{\bullet -}$, $CO_2^{\bullet -}$), varias especies no radicales (H_2O_2 , $HOCl$, O_3 , CO , 1O_2) y también radicales libres ($RSO\bullet$, $RSOO$, $RO\bullet$, $ROO\bullet$) producidos en reacciones secundarias de las ROS con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Shacter 2000; Stadtman 2003; Dalle-Donne et al. 2006).

La alta sensibilidad de las proteínas a las modificaciones oxidativas causadas por las ROS, ha sido demostrada en estudios de exposición de sus soluciones acuosas a radiaciones ionizantes (rayos X e γ) bajo condiciones donde se formaban solamente $\bullet OH$ y $O_2^{\bullet -}$ (Schuessler and Herget 1980; Schuessler and Schilling 1984) (Figura 13).

Aunque la mayoría de las proteínas no se encuentran normalmente sometidas a radiaciones ionizantes, los principios básicos derivados de estos estudios iniciales aplican también bajo situaciones fisiológicas donde las reacciones catalizadas por iones metálicos simulan los efectos de las radiaciones ionizantes (Stadtman 1997).

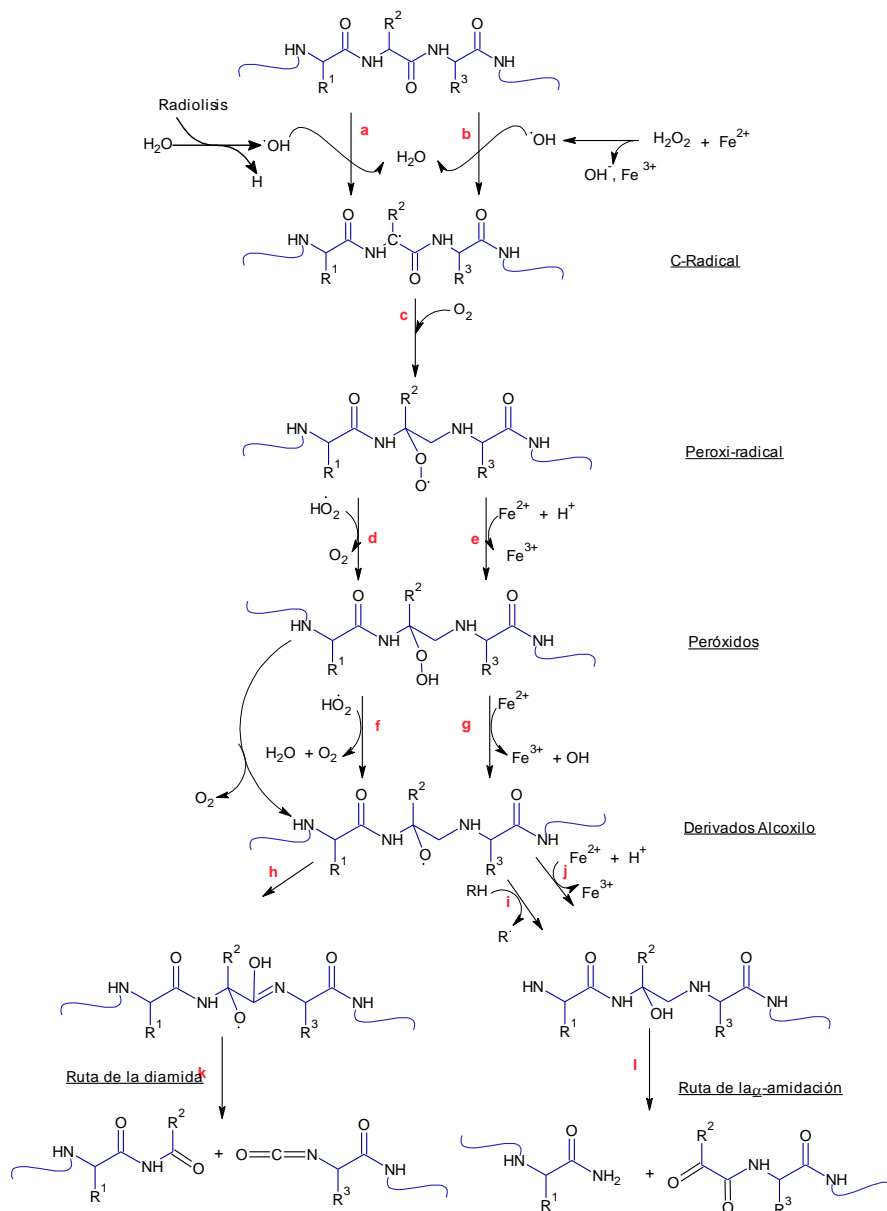


Figura 13. Mecanismos de oxidación y fragmentación del esqueleto carbonado de una proteína.

Radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$) formados durante la exposición a radiaciones ionizantes, o por descomposición catalizada por metales del H_2O_2 ; son capaces de sustraer el átomo de α -hidrógeno de cualquier residuo de aminoácido de una proteína, conduciendo a la formación de un radical centrado sobre el átomo de carbono ($\bullet\text{C}$ -radical, reacciones a y b). Estos $\bullet\text{C}$ -radicales sufren adiciones de O_2 para formar derivados peroxi-radicales (reacción c), que son rápidamente convertidos a peróxidos, seguidos por la formación de derivados alcoxilo por reacción con las especies $\text{HO}_2\bullet$ or iones Fe^{2+} (reacciones d, e y f, g). Esto prepara el escenario para la ruptura del enlace peptídico por medio de dos diferentes vías, las rutas de la diamida ó α -amidación. En la ruta de la diamida (reacción k), el aminoácido C-terminal del fragmento de péptido que deriva de la porción N-terminal de la proteína, se presenta un derivado de diamida. Por su parte, el aminoácido N-terminal del fragmento de péptido que deriva de la porción C-terminal de la proteína, se presenta un derivado de isocianato. En la ruta de la α -amidación (reacción l), el aminoácido C-terminal del fragmento de péptido que deriva de la porción N-terminal de la proteína se presenta como una amida, mientras que el aminoácido N-terminal del fragmento de péptido que deriva de la porción C-terminal de la proteína, se presenta un derivado α -ceto-acil. Significativamente, la escisión por la ruta de la α -amidación favorece la introducción de grupos carbonilos dentro de un péptido. Esquema tomado de (Dalle-Donne et al. 2006).

Estos estudios pioneros, permitieron establecer los mecanismos químicos básicos involucrados en la oxidación de proteínas mediada por radicales libres. Ellos demostraron que la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, la fragmentación de la cadena polipeptídica y la formación de agregados proteína-proteína ocurría a través de la formación de radicales centrados sobre un átomo de carbono (\bullet C-radical) mediante las cuatro posibles rutas denominadas diamida, α -amidación, oxidación de glutamina-prolina y β -escisión (Dalle-Donne, Scaloni et al. 2006).

Los mecanismos de formación de ROS y ruptura del enlace peptídico por las rutas de la diamida y α -amidación se ilustran en la Figura 13 (Stadtman 1997; Dalle-Donne et al. 2006; Scaloni 2006).

3.1 Proteínas carboniladas: Mecanismos de oxidación que conducen a la carbonilación de las cadenas laterales de los aminoácidos.

La carbonilación es una modificación irreversible y no enzimática de las proteínas, que ocurre en varios órdenes de magnitud mayor que otras modificaciones oxidativas, convirtiendo a la determinación del nivel de grupos carbonilo en el marcador de daño oxidativo de proteínas más usado en situaciones de estrés oxidativo, envejecimiento y diversas patologías (Dalle-Donne et al. 2006). A nivel celular, los grupos carbonilos son introducidos dentro de las proteínas por diversas rutas oxidativas (Figura 14) y pueden impactar de diferente forma en la función de las proteínas (Dalle-Donne et al. 2006).

Las interacción directa ROS-proteína en presencia de metales produce derivados carbonilos altamente reactivos que resultan de la oxidación de las cadenas laterales de residuos de lisina, arginina, prolina y treonina, de la ruptura del enlace peptídico mediante la ruta de la α -amidación o de la oxidación de residuos de ácido glutámico (Stadtman 2003).

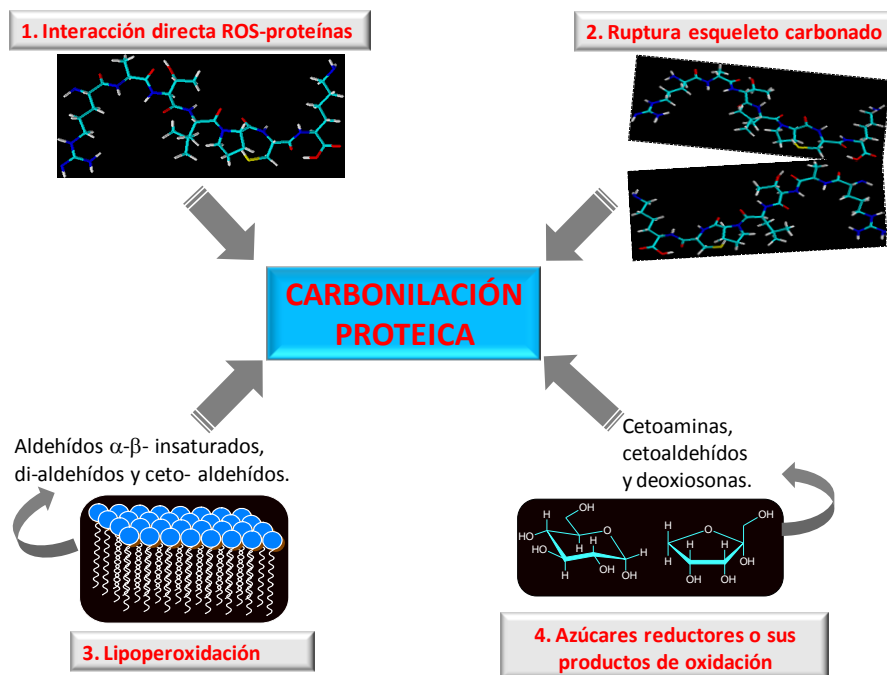


Figura 14. Orígenes de las proteínas carboniladas. Las vías 1 y 2 suceden mediante acción directa sobre residuos de lisina, arginina, prolina, treonina y ácido glutámico por los mecanismos de ruptura mencionados en el texto. Las vías 3 y 4 suceden a través de reacciones secundarias con otros metabolitos y producen aductos de proteínas como la adición de Michael de 4-HNE. Figura adaptada de (Dalle-Donne et al. 2006).

Los principales productos carbonilados que se obtienen de la oxidación directa de las cadenas laterales catalizada por metales son: semialdehído 2-aminoadípico (Figura 15a), semialdehído glutámico (Figura 15b), 2-pirrolidona (Figura 15c) y ácido 2 amino-3- cetobutírico (Figura 15d) (Stadtman 2003).

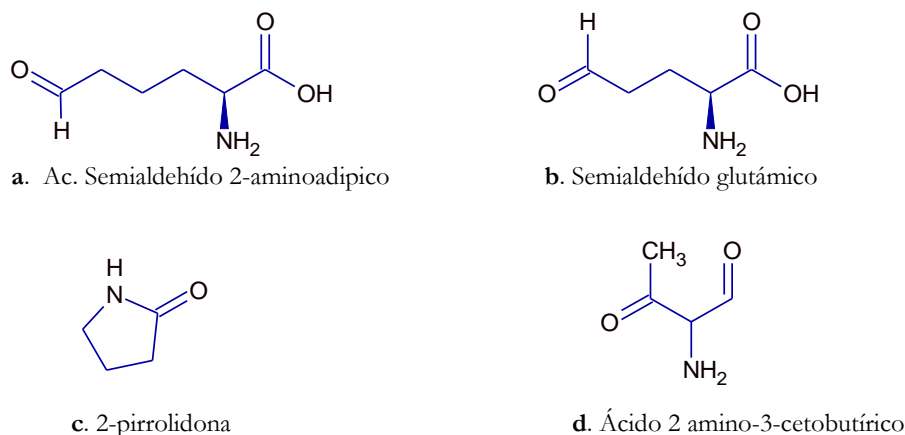


Figura 15. Principales productos carbonilados de la oxidación de cadenas laterales de aminoácidos catalizada por metales.

Las proteínas con grupos carbonilos reactivos también pueden ser generadas por reacciones secundarias de los grupos aminos primarios presentes en los residuos de lisinas con azúcares reductores o sus productos de oxidación (reacciones de glicación/glicoxidación) ó mediante reacciones de adición de Michael de las lisinas, cisteínas o histidinas con aldehídos α - β -insaturados formados durante la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Stadtman 1997).

Las reacciones generales de formación de las proteínas carboniladas con especies secundarias por glicación, glicoxidación e interacción con productos peroxidados de los PUFAs (del inglés, polyunsaturated fatty acids), se presentan en la Figura 16.

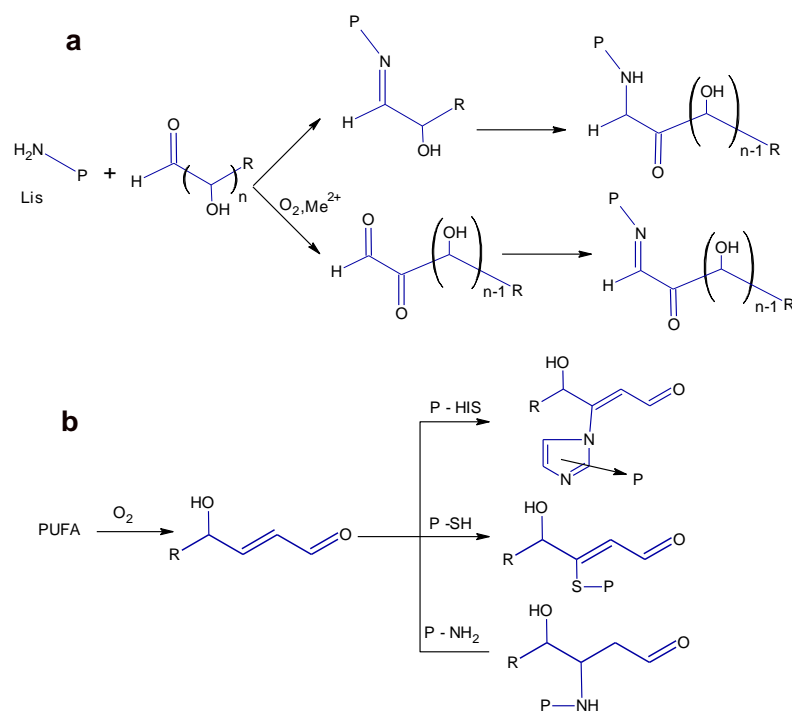


Figura 16. Formación de proteínas carboniladas por glicación, glicoxidación y reacción con productos peroxidados de los PUFAs. **A**, reacción de azúcares con grupos amino lisil. **B**, Aductos de Michael de 4-hidroxi-2-nonenal con residuos de lisina (P-NH₂), histidina (P-His) o cisteína (P-SH). Esquema adaptado (Berlett 1997).

3.1.1 Carbonilación de proteínas mediada por aldehídos bioactivos.

Las cadenas acilo poliinsaturadas (componentes de fosfolípidos) y ácidos grasos poliinsaturados, como el araquidónico, el linoleico y linolénico, son altamente

susceptibles a la peroxidación y la ruptura a través de mecanismos no enzimáticos que conducen a la formación de una variedad de aldehídos y cetonas reactivas.

Estos aldehídos y cetonas pueden difundir a través de las membranas e introducir grupos carbonilos mediante uniones covalentes a proteínas localizadas a lo largo de la célula y relativamente lejos del sitio inicial de formación de las ROS (Grimsrud et al. 2008).

Dentro de estos productos, el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) es considerado como el principal y más tóxico de los aldehídos generados por el ataque de radicales libres sobre los ácidos grasos ω -6 poliinsaturados y por tanto se le considera como un segundo mensajero tóxico de las ROS (Esterbauer et al. 1991; Eckl et al. 1993; Uchida 2003).

La alta reactividad del 4-HNE es causada por la conjugación del doble enlace con la función aldehído, el cual, por equilibrio tautomérico, convierte al C-3 en un fuerte centro electrofílico, una propiedad que es incrementada por el grupo hidroxilo saliente (Figura 17a). La naturaleza electrofílica de C-3 hace al 4-HNE altamente reactivo con los grupos sulfhídricos de las proteínas, conduciendo a la formación de aductos tioéter conocidos como aductos de Michael, que posteriormente sufren una reorganización intramolecular para formar hemiacetales cíclicos (Esterbauer et al. 1991).

Estos aductos de Michael, han sido observados también con la molécula de imidazol de los residuos de histidina y el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina en diversos péptidos; presentándose en todos ellos la ciclación entre el grupo aldehído y el C-4 del 4-HNE (Figura 17b) (Uchida 1992; Eckl et al. 1993; Nadkarni and Sayre 1995).

La reactividad del 4-HNE también ha sido demostrada con el grupo ϵ -amino de la lisina mediante un mecanismo de adición 1,2 para formar un intermediario carbinol-amina que mediante rearrreglo intramolecular con pérdida de agua produce una base de Schiff (Figura 17c) (Schneider et al. 2001). La relevancia fisiológica de estos aductos de Schiff es incierta debido a la reversibilidad de la reacción o debido a que

eventualmente pueden conducir a la formación de un derivado 2-pentilpirrol (Sayre et al. 1993; Schneider et al. 2001).

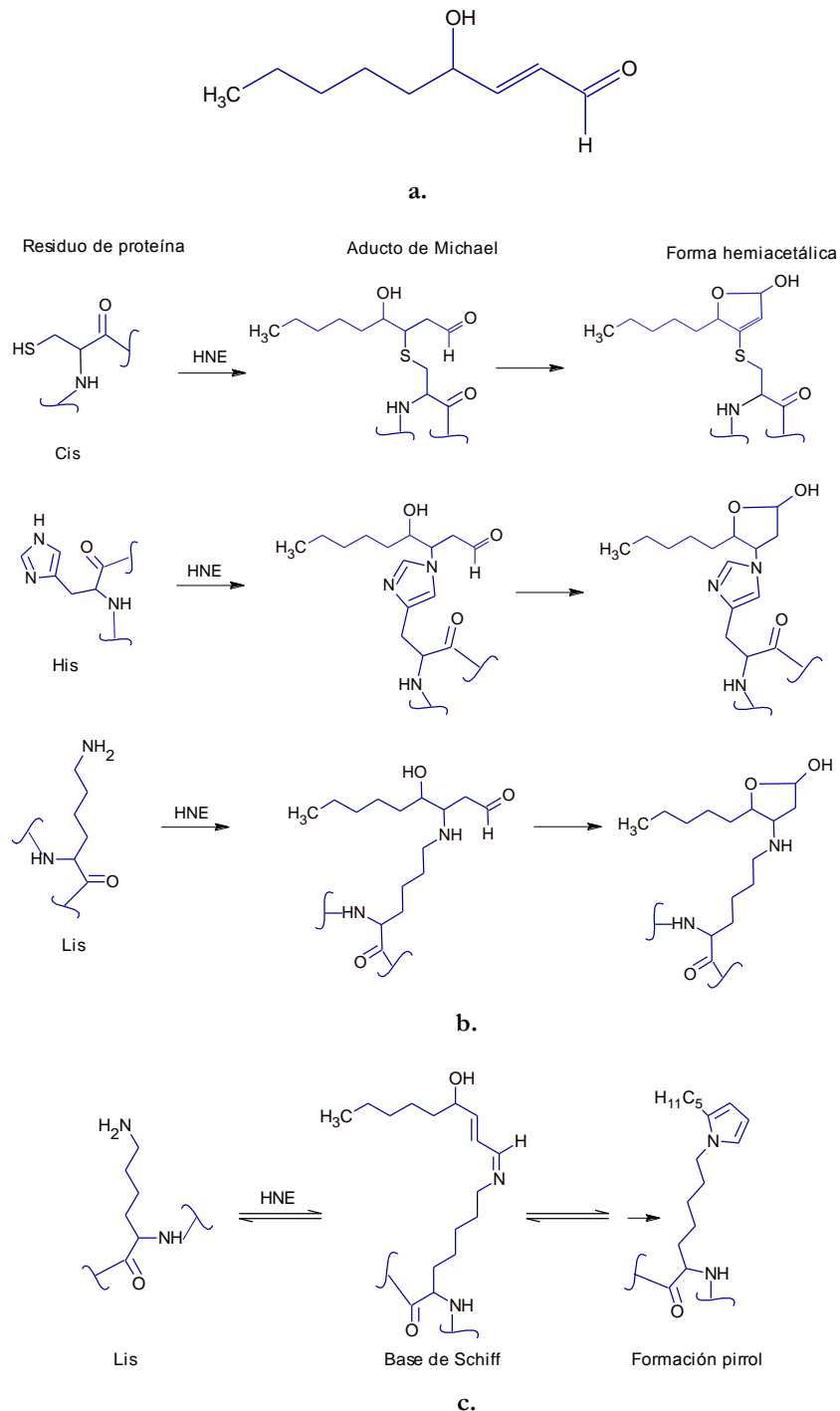


Figura 17. Estructura y mecanismos de interacción del 4-HNE con residuos de aminoácidos nucleofílicos de cisteína, histidina y lisina en péptidos y proteínas. (a) Estructura del 4-hidroxi-2-nonenal. (b) Aductos de Michael-1,4 a partir de los residuos de cisteína, histidina y lisina. (c) Aducto de Michael-1,2 con residuos de lisina. Esquema adaptado de (Carini et al. 2004).

3.2 Carbonilación de proteínas: disfunción celular y enfermedades.

En células de mamíferos, son cinco las fuentes endógenas que parecen contribuir mayoritariamente a la formación de la ROS: (1) la respiración aeróbica, como parte normal del consumo mitocondrial de O_2 , el cual es reducido en pasos secuenciales para producir H_2O , (2) producción de un estallido oxidativo por células fagocíticas que resulta en la generación de NO , O_2^- , H_2O_2 y OCl^- , los cuales destruyen eficientemente bacterias o células infectadas con virus. (3) H_2O_2 generado como un sub-producto del proceso de degradación de ácidos grasos en los peroxisomas. (4) enzimas del sistema citocromo P450, el cual constituye uno de los sistemas primarios de defensa contra compuestos tóxicos naturales, generados por subproductos metabólicos oxidantes y, (5) estimulación de enzimas homólogas de las NAD(P)H oxidasas (Storey 2001).

De forma similar, existe un amplio número de fuentes exógenas que incluyen agentes de estrés, tóxicos e infecciosos. Dentro de ellos están, la radiación UV, agentes quimioterápicos, citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, y las infecciones por virus, bacterias y parásitos. La exposición a estos agentes exógenos genera ROS a través de la expresión alterada y actividad de diversas enzimas como las lipooxigenasas, ciclooxigenasas, NADPH oxidasas y citocromo p450, así como por medio de la acción directa sobre el agua de la célula (Storey 2000).

En general, las ROS formadas a partir de fuentes endógenas y/o exógenas pueden causar daño sobre biomoléculas importantes como los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas afectando severamente la integridad y viabilidad celular por necrosis/apoptosis o inducir una variedad de respuestas celulares a través de la generación de especies reactivas secundarias como el 4-HNE proveniente de la peroxidación lipídica (Uchida 2003; Codreanu et al. 2009).

Actualmente existe un número creciente de evidencias que sugieren que el daño oxidativo, tisular o celular también puede contribuir a nivel de mecanismos patofisiológicos primarios o secundarios en el desarrollo de múltiples enfermedades

tanto agudas como crónicas de los humanos, como son la enfermedad de Parkinson (Jenner 2003; Yoo et al. 2003), la enfermedad de Alzheimer (Kruman et al. 1997; Butterfield 2002), aterosclerosis (Heinecke 2002; Stocker 2004), diabetes (Margetis et al. 2009; Curtis et al. 2010), anemia de células falciformes (Dalle-Donne et al. 2001; Manfredini et al. 2008), obesidad (Grimsrud et al. 2007; Curtis et al. 2010), enfermedad cardiovascular (Musatov et al. 2002; Dandona et al. 2007) y asma (Johnson et al. 2007) entre otras (Dalle-Donne et al. 2006).

En el caso particular de las proteínas carboniladas, se ha documentado que su incremento durante el envejecimiento y en respuesta al stress oxidativo no es aleatorio, dado que algunas proteínas resultan más susceptibles que otras. Por ejemplo en plasma de ratón, la carbonilación asociada a envejecimiento ha sido observada solamente en dos proteínas, albúmina y transferrina (Jana et al. 2002). Sin embargo en plasma de rata, son la albúmina y α 1-microglobulina las que muestran cambios significativos en su carbonilación (Eckl et al. 1993). Estas diferencias demuestran que el grado de carbonilación de una proteína es consecuencia de la estructura proteica y no de la cantidad relativa de la misma, lo que le confiere un carácter selectivo (Cabiscol et al. 2000).

Además proteínas con estructura y/o funciones similares comparten algún grado de homología y susceptibilidad a este proceso (Reverter-Branchat et al. 2004). Un ejemplo son las enzimas piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasas del ciclo de Krebs de *Saccharomyces cerevisiae*, que presentan secuencias homologas de 50 y 59% con respecto a las de *Escherichia coli*. No obstante, en el caso de las proteínas de choque térmico Hsp-60 y la Hsp-70 chaperona DnaK, no comparten similitud significativa de sus secuencias, indicando que en este caso la función de chaperona sería la razón de su similar selectiva susceptibilidad al daño oxidativo (Reverter-Branchat et al. 2004).

A pesar de estas evidencias, no existe aún respuesta directa al porqué de la selectividad de la carbonilación. Factores adicionales a la presencia de sitios para la unión a metales de transición en la proteína también han sido sugeridos como importantes en dicho proceso. Algunos de estos factores incluyen la conformación

molecular, tasa de recambio y la abundancia relativa de residuos de aminoácidos susceptibles a la oxidación catalizada por metales (Merker 2000).

Recientemente se ha propuesto que las proteínas carboniladas son más susceptibles a plegamientos erróneos, cuando se comparan con sus formas nativas, lo que puede ser interpretado como una señal por parte del sistema proteasomal que se encarga de la degradación de la proteína, afectando en consecuencia la ruta en la cual participa (Nystrom 2005). De hecho, esto es lo que ocurre con la Proteína 2 reguladora de hierro (IRP-2) que es selectiva y rápidamente degradada en células suficientes en hierro al sufrir una oxidación catalizada por el metal, pero que es estable y funcional en células deficientes de hierro (Guo et al. 1995).

Por su parte, la carbonilación mediada por 4-HNE también exhibe un amplio rango de actividades biológicas en las que se incluye la inhibición de la síntesis de proteínas y ADN, inactivación de enzimas, estimulación de fosfolipasa C, estimulación de la quimiotaxis neutrófila y la modulación de la agregación plaquetaria, entre otras (Carini et al. 2004).

Con el fin de revelar los mecanismos moleculares en los que se fundamentan los efectos biológicos de los aductos 4-HNE-proteína se han realizado estudios proteómicos basados en espectrometría de masas sobre proteínas de importancia clínica que han sido previamente modificadas por 4-HNE *in vitro*. Tal es el caso de las hemoproteínas hemoglobina (Hb) y mioglobina (Mb), en las cuales los aductos de aldehídos α - β insaturados con oxi-Hb y oxi-Mb sugieren una alteración de su estructura terciaria incrementando su susceptibilidad a la oxidación con pérdida de sus funciones biológicas (Faustman et al. 1999).

De forma similar, la formación de aductos de Michael 4-HNE-Lys-182 en el sitio activo de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* produce su inactivación (Grace et al. 1996); y una actividad enzimática reducida de la catepsina ha sido atribuida a la unión del 4-HNE a los residuos Cys-29 (cadena A) e His-150 (cadena B) (Crabb et al. 2002). También, la inactivación por 4-HNE de la enzima gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa, clave de la glicolisis, ha sido atribuida a la

formación de aductos de Michael con los residuos de amino ácidos His-164, Cis-244, Cys-281, His-327 y Lys-331 (Uchida et al. 1993; Ishii et al. 2003).

No obstante, hasta la fecha estos estudios se han realizado con proteínas aisladas y modificadas *in vitro* por incubación con 4-HNE a concentraciones milimolares que generalmente están por encima de las fisiológicas, estimadas en valores alrededor de 5 a 10 μM (Poli et al. 1985). Esta situación deja un escenario propicio para el desarrollo u optimización de métodos que permitan estudiar esta modificación en condiciones celulares y fisiológicas.

3.3 Métodos generales de identificación y caracterización de proteínas carboniladas.

Para investigar el papel del estrés oxidativo y la presencia de ROS en la patogenia y progresión de diversas enfermedades se hace necesaria la optimización de procedimientos analíticos a gran escala. Actualmente se encuentran disponibles un cierto número de técnicas sensibles para el análisis de diferentes tipos de ROS como son $\text{NO}\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y ONOO^- (Tarpey 2001). Sin embargo, la determinación directa de ROS en tejidos y fluidos es difícil debido a que estas especies moleculares son generalmente muy reactivas y tienen periodos de vida media muy cortos. Dado que los productos moleculares del estrés oxidativo son generalmente más estables que las ROS, la medición del daño oxidativo se realiza con frecuencia sobre los productos blancos de la oxidación (Keyse 2000).

Las proteínas carboniladas están presentes en las preparaciones proteicas a niveles de aproximadamente 1nmol/mg de proteína, lo que es equivalente a 0.05mol carbonilos/mol en una proteína de 50 KDa, lo que indica que aproximadamente 1 en 3000 aminoácidos contiene un grupo carbonilo, aunque este nivel de detección oxidativo puede variar con el método empleado (Shacter 2000).

La mayoría de los ensayos altamente sensibles que están disponibles para la detección de carbonilos involucra la preparación de dinitrofenilhidrazonas estables mediante una reacción de derivatización de las proteínas con dinitrofenilhidrazina

(DNPH). Posteriormente, las proteínas derivatizadas pueden ser detectadas mediante diferentes métodos (Levine et al. 2000; Shacter 2000). Entre ellos merecen ser reseñados los tres siguientes, empleado mayoritariamente en los diferentes estudios de carbonilación realizados hasta la fecha.

a. Métodos espectrofotométricos: Dado que el grupo dinitrofenil (DNP) absorbe a 370 nm con un coeficiente de extinción molar de 22000, se puede calcular el contenido total de carbonilo de una proteína o mezcla de proteínas mediante el cociente de absorbancia a 370 nm y 280 nm (Shacter 2000). Las desventajas principales de este método son el requerimiento de cantidades de muestras relativamente grande (orden de miligramos), la limitada solubilidad de muchas proteínas DNP-derivatizadas y la dificultad en la eliminación del DNPH libre utilizado en la derivatización (Cao 1995). Con la introducción de un fraccionamiento previo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), parte de las desventajas son superadas y el ensayo mejora en sensibilidad y especificidad cuando se estudian proteínas individuales (Cao 1995).

b. ELISA o inmunohistoquímica: Estos ensayos permiten determinar el contenido total de carbonilo en una mezcla de proteínas o tejidos con mayor sensibilidad que los métodos espectrofotométricos (Buss et al. 1997; Alamdari et al. 2005). Sus desventajas derivan de la amplia reactividad que pueden presentar los anticuerpos policlonales que son generalmente utilizados (Buss et al. 1997). Adicionalmente, en los ensayos inmunohistoquímicos resulta muchas veces limitante lograr un adecuado acceso a los epítomos en las muestras de tejidos.

c. Electroforesis en una/dos dimensiones seguido por transferencia Western e inmunodetección (oxyblots): Es el método de mayor especificidad y sensibilidad para la determinación de proteínas individuales carboniladas, sin embargo solamente son semi-cuantitativos (Levine et al. 1994; Shacter 2000). El ensayo de transferencia Western permite detectar hasta 1 pmol de carbonilo en una proteína y solo requiere de 50 ng de proteína oxidada. El acoplamiento de 2D-oxyblots con la espectrometría de masas resulta en un método de primera elección para la realización de estudios de

alta eficiencia de proteínas carboniladas, tal como se ilustra en la Figura 18 (Butterfield 2002; Butterfield et al. 2002).

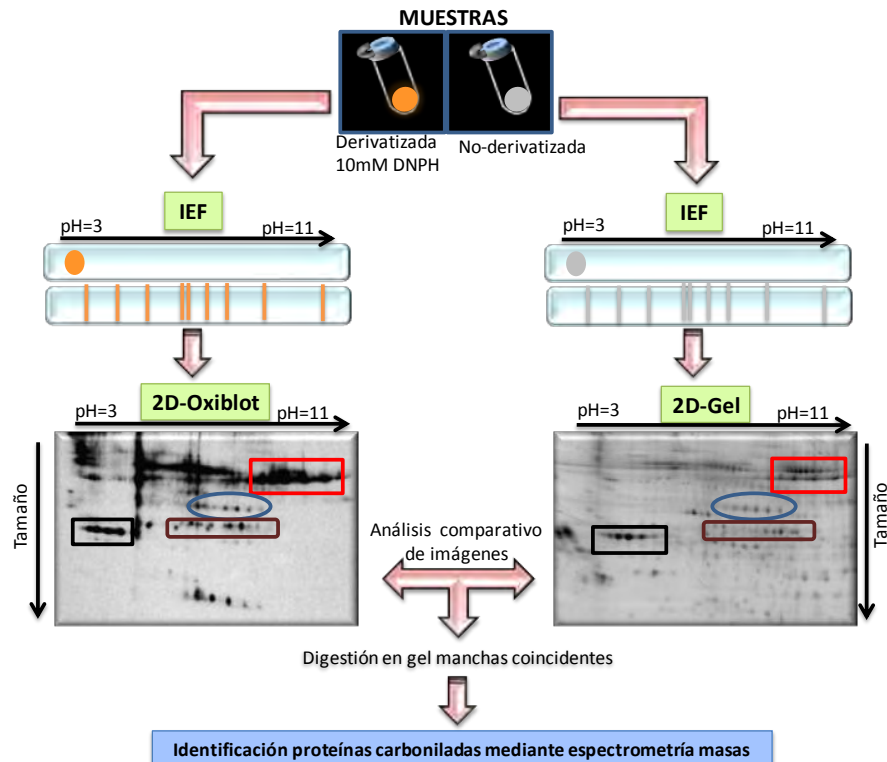


Figura 18. Ejemplo de un método de alta eficiencia de proteómica redox para la identificación de proteínas carboniladas (Castegna et al. 2002). En este protocolo, cada muestra biológica obtenida se procesa por duplicado y en paralelo. Una de las muestras es tratada con DNPH para producir hidrazonas por reacción con los grupos carbonilos de las proteínas oxidadas. Luego es sometida a electroforesis bidimensional, transferida a membrana e incubada con anticuerpos anti-DNP. Los oxyblots bidimensionales se visualizan con reactivos quimio-luminiscentes. La muestra no derivatizada (vía de la derecha) es sometida a electroforesis bidimensional y el gel se visualiza mediante tinción con agentes como el SYPRO-Ruby o Coomassie, siguiendo protocolos estándares. Imágenes de los oxyblots y gel teñido se comparan para seleccionar las manchas con proteínas carboniladas, extraerlas del gel, digerirlas e identificarlas por métodos basados en espectrometría de masas.

También se han desarrollado métodos alternativos libres de gel para estudios de alta eficiencia de proteínas carboniladas. Entre ellos, el marcaje con biotina-hidrazida es el más utilizado para la separación de proteínas carboniladas sobre columnas de avidina inmovilizada en lechos de agarosa y/o sefarosa (Soreghan et al. 2003). Sin embargo, estos métodos basados en la formación de derivados de hidrazina aunque poseen una alta sensibilidad, carecen de especificidad al no distinguir los residuos de aminoácidos afectados y la naturaleza de la modificación (Mirzaei 2005). Así por ejemplo, la introducción de un grupo carbonilo por medio de la reacción de

adición con aldehídos α - β -insaturados no puede ser diferenciada de la producida por cualquiera de las demás rutas de introducción de carbonilos que se detallan en la Figura 14.

Por consiguiente, la reactividad de los grupos carbonilos con la hidrazina también se ha utilizado para introducir mejoras en los métodos de enriquecimiento de proteínas y/o péptidos carbonilados por cromatografía de afinidad, en diversos estudios dirigidos a la identificación de los residuos de aminoácidos modificados (Grimsrud et al. 2008; Madian 2010).

Dentro de ellos destacan la utilización de N-aminoximetilcarbonilhidro-D-biotina y el reactivo P de Girard (GRP; cloruro de 1-(2-hidrazino-2-oxoetil)-piridina). El primero se ha empleado para el marcaje *in vitro* de proteínas 4-HNE modificadas en mitocondrias de corazón de rata (Chavez et al. 2006); y el segundo se ha utilizado para el estudio de proteínas carboniladas en levaduras (Mirzaei and Regnier 2006).

Aunque estos métodos de enriquecimiento son prometedores, ninguno ha mostrado de manera fiable ser útil en la identificación de los residuos de aminoácidos carbonilados presentes en baja abundancia en mezclas de proteínas endógenas, dejando evidente la necesidad de mejorar o desarrollar métodos nuevos más sensibles (Grimsrud et al. 2008; Madian 2010).

3.4 Métodos basados en espectrometría de masas para la caracterización molecular de proteínas carboniladas.

A diferencia de los métodos de inmunodetección de proteínas carboniladas, los análisis basados en espectrometría de masas (MS, del inglés Mass Spectrometry) de los péptidos modificados son los únicos utilizados para la asignación de la modificación sobre residuos específicos de aminoácidos. Para ello, se han desarrollado una serie de estrategias analíticas basadas en estas técnicas, a partir de la detección de los productos de oxidación en proteínas aisladas (Suzuki et al. 2009) (Figura 19).

En general, estos métodos se fundamentan en la determinación de la variación de masas que produce la modificación covalente sobre las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos afectados.

En el caso particular de la modificación por 4-HNE se produce un incremento de masa de 156 Da en los residuos de la histidina, lisina y cisteína cuando la modificación se efectúa por la vía de Michael (Figura 17b); mientras que un incremento de 138 Da indican que la modificación ocurre por la formación de bases de Schiff (Figura 17c) (Fenaille et al. 2003; Fenaille et al. 2004).

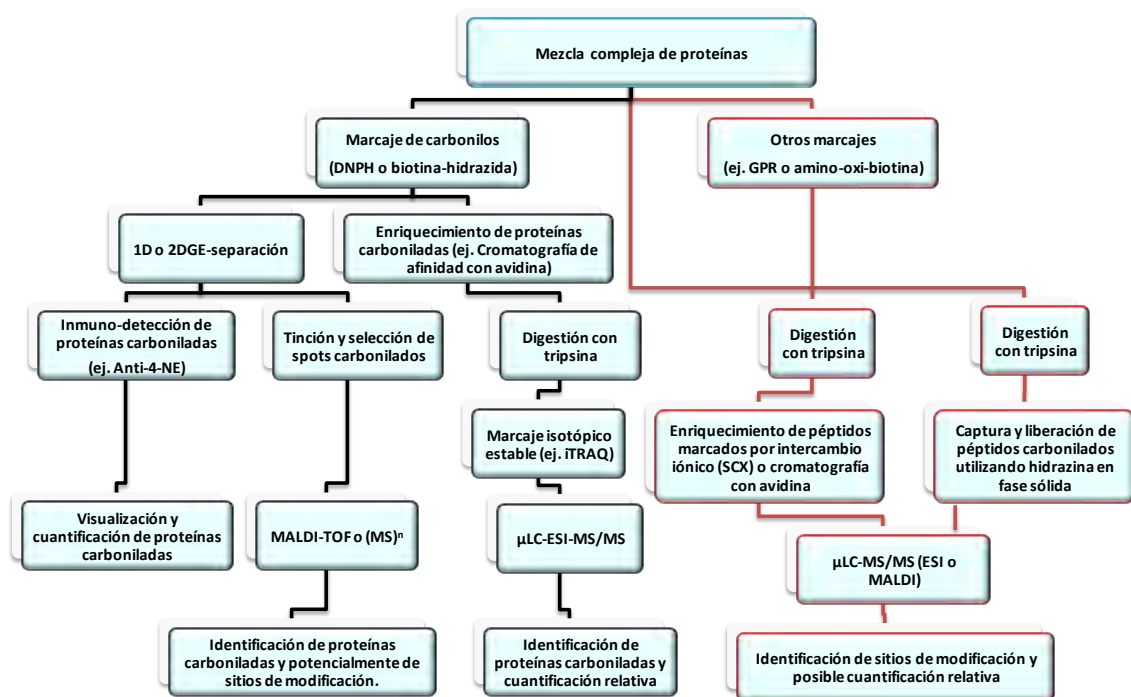


Figura 19. Visión general de los métodos proteómicos basados en MS para el estudio de proteínas carboniladas en mezclas complejas. Métodos en la parte izquierda (cuadros de texto en negro) son utilizados generalmente para identificar proteínas carboniladas. La utilización de anticuerpos dirigidos a la detección de un tipo particular de carbonilación (ej. Anti-4HNE) permite la identificación de sitios de modificación mediante métodos de MS acoplados en tándem. Métodos a la derecha de la figura (cuadros de texto en rojo) son los específicamente desarrollados para identificar sitios de modificación aminoácidos de la modificación de carbonilo. Esquema adaptado de (Grimsrud et al. 2008).

Por su parte, aunque los productos de la ruptura del esqueleto carbonado pueden ser fácilmente detectados en proteínas aisladas usando electroforesis unidimensional (SDS-PAGE) o HPLC, su utilidad como un marcador de oxidación proteica *in vivo* es muy limitada debido a la ocurrencia de otras proteínas en sistemas

complejos y el potencial papel de las proteasas en la hidrólisis de los péptidos (Dalle-Donne et al. 2006).

Así, dependiendo de la naturaleza y estabilidad de la modificación en las cadenas laterales, existen diferentes abordajes para determinar la carbonilación en proteínas intactas, mezclas de péptidos generados por digestión con proteasas o aminoácidos obtenidos por hidrólisis química o enzimática extensivas.

En todos los casos, se escogen condiciones experimentales específicas cuidadosamente seleccionadas para la manipulación y/o hidrólisis de las proteínas con el objeto de preservar la estabilidad de los aminoácidos modificados (Dalle-Donne et al. 2006). Estas condiciones incluyen la utilización de agentes antioxidantes como el 3,5-Di-*tert*-4-butilhidroxitoluene (BHT) (Tanito et al. 2006), utilización de agentes derivatizantes en preparados frescos de proteínas, eliminación de exceso de agentes derivatizantes y almacenamiento de alícuotas a -80°C para evitar los efectos de los ciclos de congelación descongelación (Conrad et al. 2000; Keyse 2000; Roe 2006; Yang et al. 2006).

De igual forma los métodos de ionización, el tipo de analizador de masas y el uso de experimentos de masas en tándem resultan importantes a la hora de preservar la estabilidad de los aminoácidos modificados durante el análisis de los digeridos trípticos carbonilados y la identificación de los residuos de aminoácidos carbonilados. Una breve descripción de los analizadores y los experimentos en tándem se realiza a continuación (Aebersold 2003; Steen 2004).

3.4.1 Métodos de ionización: ESI y MALDI.

La ionización electrospray (ESI, del inglés Electrospray ionisation) y la ionización/desorción en matriz asistida por láser (MALDI) son los dos métodos de ionización suave más utilizados (Figuras 20 y 21).

En la ESI, los péptidos disueltos en una solución acuosa ácida son forzados a pasar por una aguja estrecha a alto voltaje. Un fino vapor de gotas cargadas emerge de la aguja y es dirigido hacia la cámara de vacío del espectrómetro de masas a través de

un pequeño orificio, como se ilustra en la Figura 20. Al ingresar en el espectrómetro de masas, las gotas se secan con una corriente de gas inerte, lo que resulta en iones en fase gaseosa que se aceleran a través del analizador hacia el detector. Dado que la ESI produce iones en fase gaseosa a partir de una solución, es fácilmente integrable con métodos de separación de proteínas en fase líquida como la electroforesis capilar y en especial la cromatografía líquida, convirtiendo al tándem LC-ESI-MS en el método más adecuado para el análisis de muestras complejas (Steen 2004).

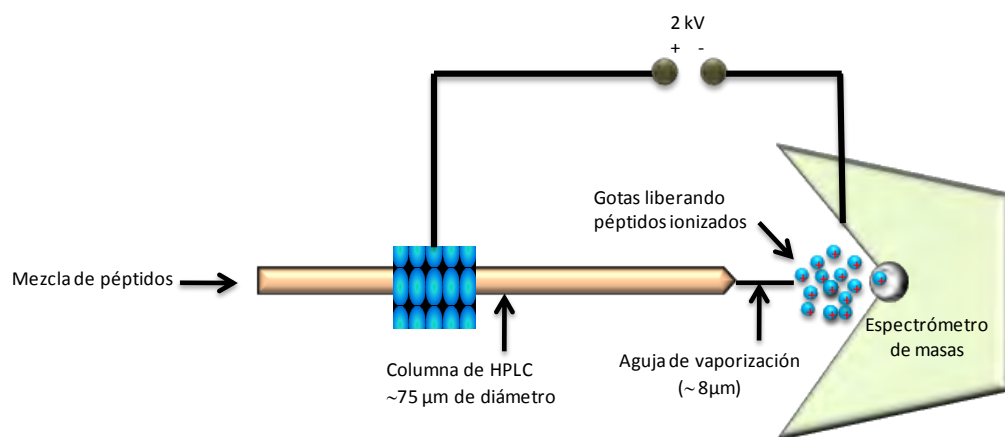


Figura 20. Representación del método de ionización de proteínas por electrospray (ESI).

Una característica de la ESI, es que las condiciones ácidas utilizadas producen gotas cargadas positivamente que tienden a protonar todos los sitios básicos disponibles en las moléculas del analito. En péptidos, los sitios básicos primarios son el amino N-terminal y los grupos básicos de las cadenas laterales de residuos de lisina, arginina e histidina. Como resultado, se obtienen péptidos iónicos multicargados si están presentes estos aminoácidos básicos, con un protono asociado al amino N-terminal y los otros asociados con cada residuo básico adicional (Fenn et al. 1989; Niessen 2003).

Los péptidos doble cargados tienden a predominar en los digeridos trípticos de proteínas debido a la especificidad proteolítica de la tripsina que rompe enlaces amida por el lado C-terminal de residuos de lisina y arginina. Péptidos trípticos con un valor de carga superior a dos casi siempre contienen histidinas internas, el par lisil-prolina, el par arginil-prolina o saltos de sitios de escisión de la tripsina. Como resultado, el

estado de máxima carga de un péptido en un digerido trípico puede suministrar alguna información acerca de su estructura (Kinter 2000).

Una segunda característica de la ESI es la eficiencia del proceso de ionización que se traduce en una elevada sensibilidad. Aunque existe un continuo debate acerca del preciso papel de la protonación en la fase de solución, la eficiencia de la protonación de los sitios básicos en las condiciones ácidas utilizadas parece contribuir a la sensibilidad (Wilm et al. 1996).

Sin embargo, algunos productos carbonilados pueden resultar sensibles a estas condiciones ácidas y sufrir rupturas durante esta etapa del análisis, reduciendo el rendimiento en la identificación de residuos de aminoácidos modificados. Tal es el caso de la carbonilación producida por productos finales de la lipoperoxidación de los ácidos grasos, como la acroleína, malonildialdehído y 4-HNE (Uchida 2003; Carini et al. 2004).

Ante esta situación, la introducción de un paso de reducción de los grupos carbonilos con NaCNBH_3 o NaBH_4 previo a la ionización ácida estabiliza la modificación, permitiendo la identificación de los residuos de aminoácidos afectados por estos carbonilos-reducidos (Crabb et al. 2002; Fenaille et al. 2004). No obstante, en el caso particular de la carbonilación por 4-HNE, la utilización del paso previo de reducción ha sido eficiente para el estudio de proteínas aisladas pero ha resultado con poco éxito cuando se analizan muestras biológicas complejas (Uchida 1992; Uchida et al. 1993; Fenaille et al. 2004). Esto deja un campo abierto para el desarrollo de métodos proteómicos que permitan mejorar la identificación de los residuos 4-HNE modificado en muestras biológicas.

Por su parte, en la ionización por MALDI, el analito se mezcla con un gran exceso de una "matriz de compuestos aromáticos" que pueden absorber la energía del láser que se utiliza con el espectrómetro de masas (Figura 21). Por ejemplo, el compuesto matriz ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico puede absorber la energía de un láser de nitrógeno UV (337 nm).

Mediante MALDI, los péptidos y la matriz se disuelven en un disolvente orgánico volátil. Posteriormente, el disolvente se evapora dejando cristales de matriz con el analito incluido. La energía de los pulsos láser aplicados es absorbida por los cristales y emitida (desorbida) en forma de calor, lo que resulta en la sublimación rápida de la mezcla matriz-péptidos (Karas 1988; Hillenkamp et al. 1991).

La ionización ocurre por la protonación en el medio ácido producido por la acidez de la mayoría de los compuestos utilizados como matriz y por la adición de ácidos diluidos a la muestra. Al igual que la ESI, la protonación de los péptidos en un ambiente ácido es extremadamente eficiente, haciendo de la ionización MALDI un excelente método de producción de péptidos protonados (Hillenkamp et al. 1991).

En el caso de proteínas carboniladas marcadas con DNPH, la utilización de la dinitrofenil-hidrazina como compuesto matriz, incrementa la ionización de los péptidos carbonilados mejorando por tanto la sensibilidad de la detección (Fenaille et al. 2004). Finalmente, dado que la desorción láser genera iones en grupos discretos y pequeños, la ionización por MALDI es generalmente combinada con analizadores de masa de tiempo de vuelo (TOF, del inglés time of fly) convirtiéndose en un método de alta sensibilidad para el análisis de mezclas de péptidos simples, como los derivados de una sola mancha en un gel bidimensional (Whittal 1995).

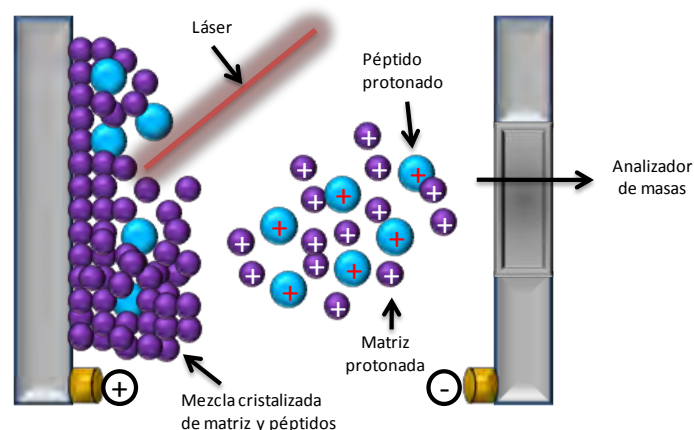


Figura 21. Representación del método de ionización de proteínas por MALDI.

3.4.2 Analizadores de masas: Trampa iónica y TOF.

El análisis de masas en los espectrómetros determina la relación masa / carga (m/z) de los iones derivados de los péptidos ionizados. La unidad para m/z es el Thomson (Th), aunque se acepta el uso de la relación m/z como un cociente sin unidades.

En general se pueden considerar dos tipos de iones observables en los experimentos de MS: el ión molecular (péptido entero protonado) y los fragmentos iónicos (porciones protonadas de péptido). Sí se conoce la carga del péptido, la señal correspondiente al ión molecular se usa para calcular el peso molecular del péptido, mientras que los fragmentos iónicos se emplean para derivar información acerca del orden de secuencia de los aminoácidos en el péptido (Hunt et al. 1986; Ziady 2009).

Estas determinaciones se realizan mediante uno de los cuatro tipos básicos de analizadores de masas de amplio uso en análisis proteómico. Cada uno de ellos posee fortalezas y debilidades en términos de sensibilidad, resolución y exactitud.

Estos analizadores pueden ser utilizados solos o en combinación para generar diferentes tipos de datos. Conceptualmente los instrumentos más simples son los analizadores de triple cuádruplo (TQ) y tiempo de vuelo (TOF). Una segunda generación de instrumentos más sofisticados incluye a los analizadores de trampa iónica y de resonancia iónica de ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR, del inglés Fourier transform ion cyclotron resonance).

La sensibilidad, como se mencionó anteriormente, es un parámetro fuertemente influenciado por el método de ionización utilizado, pero que también depende de la forma en que los iones vaporizados llegan al detector, es decir del diseño del analizador de masas (Wilm et al. 1996; Steen 2004).

Por su parte, la resolución en un espectro de masas se define como: $(m/z)/(\Delta m/z)$, donde el divisor ($\Delta m/z$) se puede definir de diferentes formas, como por ejemplo el ancho de pico a mitad de altura (Figura 22a). En la práctica cuanto mayor sea la resolución se obtienen picos de masas más estrechos lo que permite a su vez una mejor capacidad para distinguir iones con valores cercanos de m/z .

Una buena resolución está generalmente determinada por la capacidad de distinguir el cúmulo de picos isotópicos (Figura 22b). Este grupo corresponde a la serie de masas diferentes producidas por los isótopos de los elementos C, H, N, O y S. Cuando los picos isotópicos están resueltos, la medida de la masa del péptido se hace con base en el m/z del ión monoisotópico (ión compuesto por los isótopos más livianos de cada uno de los diferentes átomos que forman el péptido), alcanzándose una alta precisión (~ 0.01 Da) en la medición de la masa del péptido. Una buena resolución también permite determinar si la carga de un ión determinado es sencilla, doble o triple dependiendo si la diferencia de masas entre los isótopos es de 1, 0.5 o 0.33 Th, respectivamente (Whittal 1995; Bossio 2002).

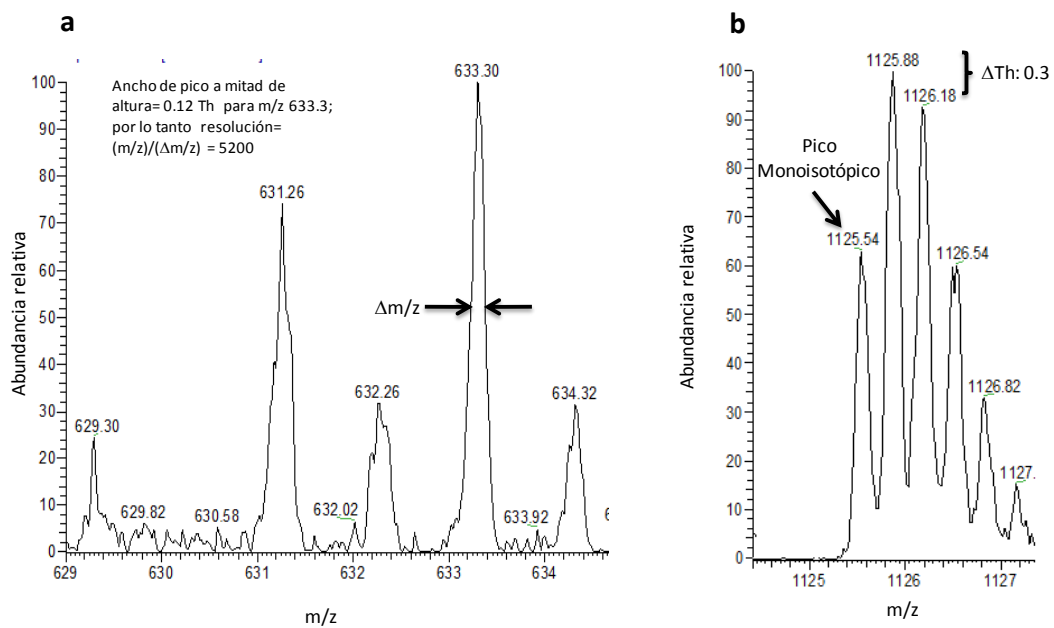


Figura 22. Resolución de masas y estado de carga. a) En este ejemplo, el ancho del ión a m/z 633.3 al 50% de abundancia relativa es de 0.12 Th. Así que la resolución calculada para este m/z es de 5200. b) Esta resolución es suficiente para resolver los componentes isotópicos del péptido con una masa monoisotópica observada a m/z 1125,54. Además, la diferencia de 0.3 Th entre los picos isotópicos permite determinar un estado de triple carga para este ión peptídico.

Una alta resolución resulta también en una mayor precisión y exactitud en la medida de la relación m/z de los iones peptídicos, donde la precisión refleja la reproducibilidad los valores medidos y la exactitud refleja la diferencia entre el valor medido y el valor real (Mann et al. 2001; Aebersold 2003).

En las aplicaciones proteómicas de la MS, la exactitud de masas es particularmente importante porque la mayoría de los valores obtenidos experimentalmente se miden una sola vez y son comparados con valores teóricos que se asumen verdaderos (Hanash 2003; Steen 2004).

La diferencia entre el valor medido y el teórico puede ser expresada en términos de desviación absoluta o relativa. Por ejemplo, una medida de masas de 1000.2 Da obtenida para el ión molecular de un péptido $(M+H)^+$ que tiene una masa teórica de 1000.0 Da presenta una exactitud de 0.2 Da (desviación absoluta). Esta misma medida se puede expresar en términos relativos así: $10^6 \times$ (desviación absoluta/masa teórica del péptido). Por lo tanto, la exactitud de masas sería ahora de 200 ppm. En general, se recomienda considerar la exactitud de masas en términos relativos porque muchos de sus factores determinantes son proporcionales a la masa del péptido (Kinter 2000).

Adicionalmente, factores como el tipo de analizador de masa utilizado, la forma de adquisición de los datos y parámetros prácticos como la calidad de la calibración instrumental influyen en la exactitud de la medición de masas (Aebersold 2003). A continuación, se realiza una breve descripción de los analizadores TOF y trampa iónica porque se utilizaron en los trabajos de investigación realizados en esta tesis doctoral.

El analizador de tiempo de vuelo (TOF), conceptualmente es uno de los analizadores más simples. La relación m/z de un péptido protonado se determina midiendo el tiempo que éste requiere para recorrer la longitud de un tubo de vuelo desde que abandona la fuente de iones. El ión es impulsado con una velocidad inicial, la cual depende directamente de su masa. El tiempo de vuelo es proporcional a la raíz cuadrada de su relación m/z dada una aceleración constante provocada por el voltaje.

$$\text{Tiempo de vuelo} = k (m/z)^{1/2}$$

Algunos analizadores de masa de TOF incluyen un espejo de iones o reflectrón al final del tubo de vuelo, el cual repele los iones a través de este tubo y los dirige al detector (Figura 23).

De esta forma, se ve incrementada la longitud del tubo de vuelo y se mejora la resolución. El reflectrón sirve también para corregir las pequeñas diferencias de energía cinética (E_c) que existen entre iones de la misma masa (Cornish 1993). Estas diferencias se deben a la posición que guarda cada ión en la fuente de iones en el momento de ser acelerados por la aplicación de una diferencia de potencial. Las diferencias en la energía cinética de los iones se reducen debido a que los iones con E_c mayor viajan más lejos en el reflectrón que los iones con E_c menor (Cornish 1993). Esto ocasiona que los iones con la misma masa se enfoquen mejor en el detector mejorando considerablemente la resolución y la precisión del cálculo de masas. Los analizadores TOF, hasta hace poco tiempo, se han utilizado casi exclusivamente con la ionización MALDI para el análisis de iones peptídicos intactos (MALDI-TOF-MS) e identificación de proteínas por huella peptídica (Aebersold 2003; Twyman 2004).

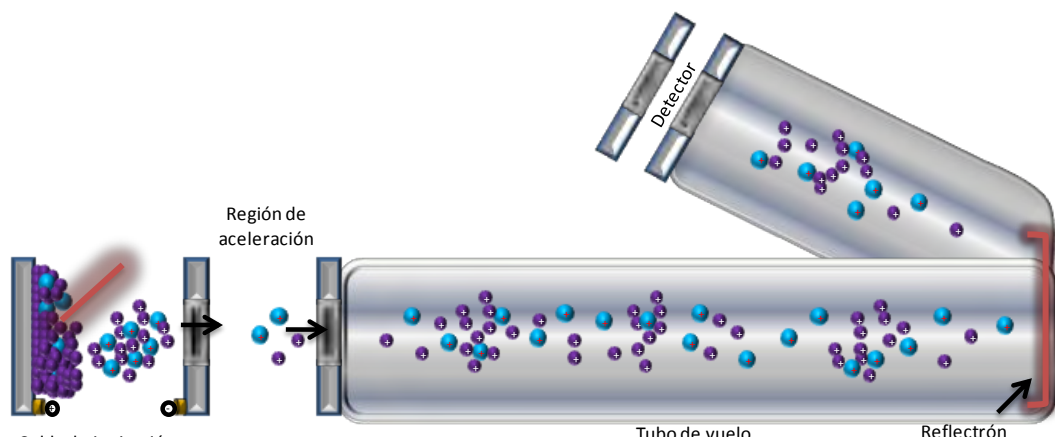


Figura 23. Representación esquemática del analizador de masas de vuelo y reflectrón

Por su parte, la función de los analizadores de trampa iónica es atrapar iones moleculares en un campo eléctrico tridimensional (Figura 24). La trampa iónica posee la capacidad de almacenar los iones y liberarlos de manera selectiva, lo que se traduce en un incremento de la sensibilidad. La liberación selectiva se logra por incrementos de voltaje que aumentan las oscilaciones de los iones atrapados en la trampa. Como resultado, los iones son expulsados al detector por un mecanismo que primero los atrapa y luego los expulsa de una manera dependiente de su masa (Pannell et al. 1990).

Este sistema de atrapamiento iónico y expulsión junto con el tamaño compacto de estos analizadores que permite una transmisión eficiente de los iones desde la fuente de ionización hasta el detector; hacen de los sistemas de trampa iónica instrumentos altamente sensibles (Aebersold 2003; Twyman 2004).

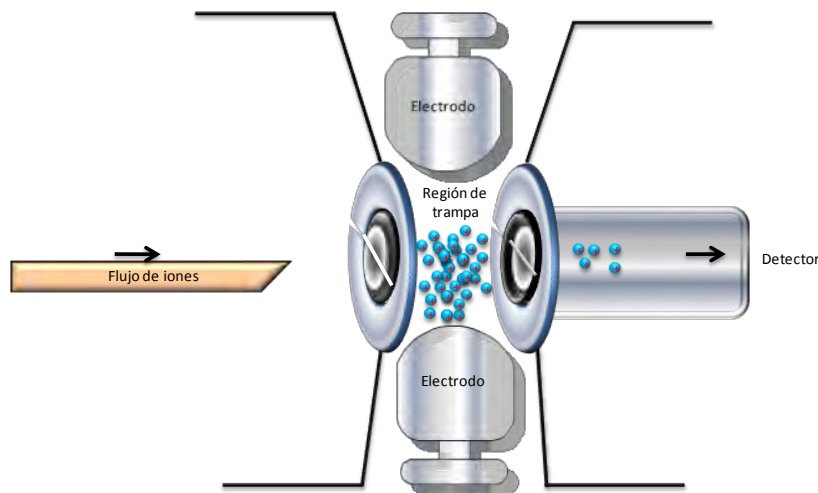


Figura 24. Representación esquemática del analizador de masas de trampa iónica.

3.4.3. Análisis de los fragmentos iónicos peptídicos.

En los experimentos basados en MS, la información acerca de la estructura de un péptido se deriva de la observación de los productos iónicos que se obtienen al fragmentar dicho péptido. Debido a que ESI y MALDI son métodos suaves de ionización, los digeridos trípticos no sufren o sufren muy baja fragmentación y por tanto dan poca información acerca de la secuencia de cualquier péptido.

Para resolver esta situación se utiliza una serie de métodos que en conjunto se denominan espectrometría de masas en tándem (MS^n). El término tándem refleja que al menos dos etapas de análisis por MS se utilizan en un experimento individual. El resultado es que iones específicos dentro de una mezcla compleja pueden ser selectivamente estudiados en un experimento que da información acerca de la estructura de ese ión.

La trampa iónica es un analizador de masas en el cuál se pueden realizar múltiples análisis en tándem para un único experimento, convirtiéndolo en uno de los

mejores instrumentos para el estudio de modificaciones post-traduccionales (Yang et al. 2009). Estos métodos utilizan en una primera etapa la separación de los iones de acuerdo a su m/z para luego, seleccionar y aislar un ión con valor específico de m/z . En la siguiente etapa se realiza la fragmentación del ión aislado y los fragmentos iónicos producidos se utilizan para derivar la secuencia del péptido (Twyman 2004).

El proceso más frecuentemente utilizado para fragmentar los iones seleccionados es la activación colisional. En este, el ión aislado es transmitido a una región de alta presión del espectrómetro donde sufre un número de colisiones con las moléculas de gas contenidas en esa región (Paizs 2005).

Estos choques hacen que una porción de la energía cinética se transforme en energía interna, volviendo al ión inestable y llevándolo a su fragmentación antes de dejar la celda de colisión. Este proceso es conocido como disociación activada colisionalmente (CAD, del inglés collisionally activated dissociation) o disociación inducida por colisión (CID, del inglés collisionally induced dissociation). Los fragmentos iónicos producidos son entonces analizados, por MS nuevamente, en la segunda o subsiguientes etapas del análisis en tándem (Jia et al. 2006).

Para derivar información acerca de la estructura del péptido, se utiliza el sistema de nomenclatura propuesto por Roepstorff–Fohlmann–Biemann (Roepstorff and Fohlman 1984; Biemann 1992) (Figura 25). Este sistema establece que si después de la fragmentación la carga se retiene en el fragmento que contiene extremo N-terminal, el ión es designado como “ión -b”; en cambio, si la carga se retiene en el fragmento que contiene el extremo C-terminal, el ión es denominado un “ión -y”. La diferencia en masa entre un ión -b y un ión -y corresponde a un aminoácido (Roepstorff and Fohlman 1984; Bleiholder et al. 2008).

Esta diferencia de masa entre los iones se utiliza para identificar los aminoácidos, y con ello, la secuencia peptídica. Para distinguir entre los aminoácidos leucina e isoleucina, que poseen la misma masa molecular, es necesario que la fragmentación se lleve a cabo con energías de colisión muy altas, de manera que se

propicie la fragmentación de cadenas laterales de los aminoácidos (Johnson et al. 1987).

Tanto los iones -b como los -y pueden perder NH_3 (principalmente de los residuos básicos como arginina y lisina), H_2O (principalmente del alcohol contenido en residuos de serina y treonina; y de los residuos que contienen grupos carboxilo libres como el ácido glutámico y el aspártico) y CO . Cuando un ión -b pierde CO se forma un ión-a (Zhang 2000).

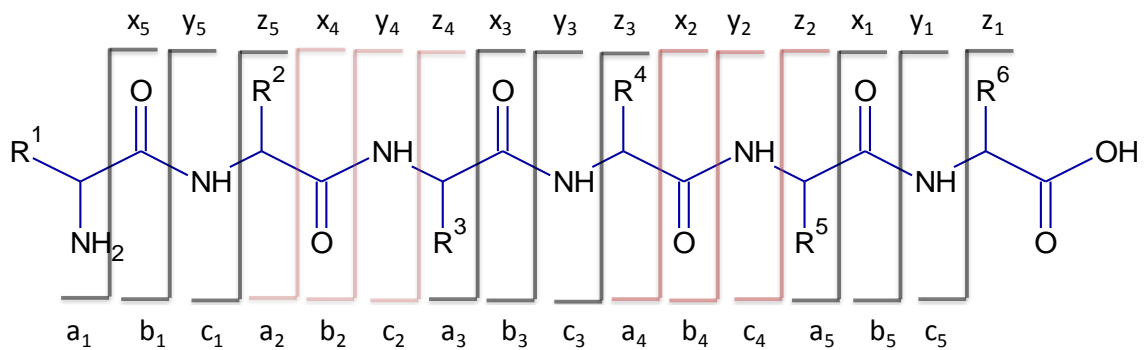


Figura 25. Nomenclatura de Roepstorff-Fohlmann-Biemann para la secuencia de iones en MS de péptidos.

4. JUSTIFICACIÓN.

La malaria es una enfermedad parasitaria común y potencialmente mortal que actualmente afecta de forma endémica a más de 100 países en el mundo, lo que supone que 3.3 mil millones de personas, la mitad de la población mundial, está en riesgo de contraerla (WHO/OMS 2009). Se calcula que cada año se producen más de 500 millones de casos clínicos de malaria aguda, lo que se traduce en alrededor de un millón de muertes, causadas principalmente por *Plasmodium falciparum*. Aproximadamente un 90% de esas defunciones se producen en el África subsahariana, donde los niños menores de 5 años suponen el 82% de todos los fallecimientos con una tasa cercana 3.000 muertes por día (WHO/OMS 2006).

La malaria tiene efectos de por vida en el desarrollo cognitivo, en la educación y en la productividad. Como media, la enfermedad causa pérdidas por valor del 1,3% del crecimiento económico anual en los países donde se produce una transmisión intensa. La evidencia acumulada muestra que la malaria no solamente es consecuencia de la pobreza, sino una causa de pobreza persistente (WHO/OMS 2006).

En las zonas endémicas de malaria, se han seleccionado en el ser humano, variantes genéticas polimórficas asociadas a la función de eritrocito ya que confieren cierto grado de resistencia ante los síntomas más graves de la enfermedad (Usanga et al. 1977; Rowe et al. 2007; Fowkes et al. 2008; Clark et al. 2009).

Entre estos polimorfismos, el déficit de G6PD es la eritroenzimopatía más frecuente, llegando a alcanzar valores mayores del 30% de prevalencia en África ecuatorial (Mason et al. 2007). Es por tanto, una gran oportunidad de analizar los factores genéticos y fisiológicos que ha seleccionado el ser humano para resistir la malaria en zonas endémicas (Cappadoro et al. 1998).

En el contexto de déficit de G6PD, la relación entre el estado redox del parásito de la malaria y su célula huésped resulta importante para el desarrollo de la patología. Así, existen evidencias que demuestran que *Plasmodium falciparum* incrementa el estrés oxidativo en el eritrocito infectado y que éste contribuye también a las manifestaciones más graves de la enfermedad como el secuestro orgánico, incluyendo

la patología cerebral, los trastornos respiratorios y la malaria placentar (Becker et al. 2004).

Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares relacionados con las modificaciones postraduccionales oxidativas que sufren las proteínas del eritrocito y el papel fisiológico y adaptativo que tienen en relación a la invasión y desarrollo del parásito

Otro polimorfismo eritrocitario de interés, relacionado con las modificaciones postraduccionales oxidativas, es el asociado a los grupos sanguíneos ABO. Este polimorfismo y en particular la prevalencia del grupo sanguíneo O en zonas de África endémicas de malaria (Cserti 2007; Loscertales et al. 2007) donde también está presente la variable A- del déficit de G6PD, sugiere una posible asociación funcional con el estrés oxidativo eritrocitario y la protección frente a la malaria

Finalmente, desde el punto de vista técnico, hay aspectos analíticos que limitan el estudio de las modificaciones postraduccionales oxidativas. Entre ellos, y debido a la importancia que tienen las causadas por subproductos de la peroxidación lipídica, la detección de residuos 4-hidroxi-2-nonenal tiene especial relevancia en cuanto a las modificaciones oxidativas que pueden sufrir las proteínas de membrana del eritrocito.

Así, dentro del interés por profundizar en las alteraciones oxidativas que sufre el eritrocito durante la infección por *P. falciparum* como base de los mecanismos adaptativos de su función, seleccionados genéticamente en las poblaciones sometidas a la presión externa que ejerce la alta endemicidad de malaria, se plantean a continuación, la hipótesis y objetivos de la presente tesis doctoral.

5. HIPÓTESIS

Considerando la elevada importancia biológica de la compleja relación redox del parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* y su eritrocito huésped, partimos de la hipótesis de que existe un control adaptativo de las modificaciones oxidativas que ocurren en la membrana del eritrocito infectado y que dirigirían la relación parásito-huésped en dos vías opuestas.

La primera vía se produciría bajo el ambiente redox controlado por los mecanismos de defensa antioxidante de *P. falciparum* que determinaría cambios oxidativos específicos en un grupo de proteínas de membrana del eritrocito. Estos cambios adaptativos del parásito estarían orientados a facultar sus procesos vitales como son la replicación y la evasión de la respuesta inmune del huésped.

La segunda vía estaría dirigida por cambios oxidativos alternativos que ocurren en otras proteínas de membrana de eritrocitos en casos de déficit de G6PD y del grupo sanguíneo O. Estas modificaciones adaptativas del huésped se orientarían a protegerse de las consecuencias clínicas graves de la malaria.

Por lo tanto, el análisis y la identificación de proteínas de membrana carboniladas en ambas condiciones permitirían clasificarlas en una de las dos vías y determinar posibles estrategias de intervención antimalárica.

6. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral ha sido la identificación diferencial de modificaciones oxidativas en las proteínas de membrana del eritrocito humano infectado por el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* sobre diferentes sustratos genéticos seleccionados por la interacción parásito-huésped que confieren protección frente a la forma clínica de la enfermedad más grave.

Para alcanzar este objetivo se diseñaron tres aproximaciones experimentales complementarias entre ellas, dirigidas a resolver la hipótesis de trabajo propuesta y que ha dado lugar a definir los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización del método de cultivo de estadíos intraeritrocitarios de *P. falciparum* para la obtención de muestras con elevada parasitemia en condiciones de alta sincronización y que fuesen adecuados para estudios globales de proteómica de membrana.
2. Identificación de proteínas de membrana diferencialmente oxidadas en eritrocitos portadores de déficit de G6PD y de los grupos sanguíneos ABO en condiciones normales y de infección por *Plasmodium falciparum*.
3. Implementación de un método de análisis proteómico para la identificación de residuos de aminoácidos modificados por 4-Hidroxi-2-nonenal.

Capítulo VI

DISCUSIÓN GENERAL.

Dentro de los objetivos de desarrollo establecidos para el presente milenio, la Organización Mundial de la Salud ha propuesto en los países en vías de desarrollo detener y al mismo tiempo comenzar a reducir, a partir del año 2015, la incidencia del paludismo (WHO/OMS 2000). Sin embargo, la expansión de resistencias del parásito de la malaria a los fármacos de primera elección, así como la resistencia del mosquito a los insecticidas y las dificultades para la obtención de una vacuna eficaz constituyen amenazas que comprometen la lucha contra el paludismo a escala mundial (World Health Organization. et al. 2009; WHO/OMS 2010).

Para alcanzar esta meta de erradicar la malaria se hace necesario, entre otras aproximaciones, una investigación orientada a profundizar en los mecanismos naturales de contención de la enfermedad, tanto a nivel adaptativo como inmunológico. Desde esta posición, el trabajo aquí presentado incide en las modificaciones oxidativas causadas por *Plasmodium falciparum* sobre las proteínas de membrana del eritrocito infectado. Y lo hace desde la perspectiva de la protección que ejercen ciertos polimorfismos adaptativos fijados en las poblaciones humanas sometidas a una presión selectiva por malaria.

Para ello dos condiciones genéticas, el déficit de G6PD y los polimorfismos sanguíneos ABO, se eligieron para la realización de un tamizaje diferencial de carbonilación por proteómica redox. Asimismo, se ha optimizado un protocolo de cultivo de parásitos de alta densidad adecuado para estudios de proteómica y se ha diseñado una metodología proteómica basada en espectrometría de masas, dirigida a la identificación de residuos de aminoácidos modificados por 4-HNE.

El cultivo continuo de los estadios eritrocitarios de *Plasmodium falciparum* logrado por Trager y Jensen hace más de tres décadas (Trager and Jensen 1976), marcó un importante hito en el estudio de la biología, bioquímica, inmunología y farmacología de la malaria. Usando esta metodología, se han alcanzado significativos avances durante estos 30 años, en el campo de la quimioterapia, resistencia a fármacos, metodologías para el desarrollo de vacunas, patogénesis, proteínas exportadas dentro de la célula huésped, biología celular, resistencia innata relacionada

con mutaciones en eritrocitos humanos, transfección y genómica entre otras áreas (Trager and Jensen 1997; Andriantsoanirina et al. 2009; Nogueira et al. 2010).

Aunque se han introducido diversas modificaciones para mejorar el cultivo de *Plasmodium falciparum*, los protocolos de cultivos estáticos utilizados actualmente se siguen fundamentando en el método original de Trager y Jensen (Zolg et al. 1984; Ofulla et al. 1993; Binh et al. 1997; Singh et al. 2007; Srivastava et al. 2007).

En general, después de ser adaptada a las condiciones *in vitro*, cada ciclo eritrocitario de la mayoría de las cepas de *Plasmodium falciparum* termina en una nueva etapa de invasión que incrementa de 3 a 4 veces la parasitemia de los cultivos (Reilly et al. 2007). El mantenimiento del cultivo se realiza mediante remplazo diario del medio de cultivo a bajas parasitemias, para que a partir del cuarto ciclo de propagación, se alcancen valores de parasitemias superiores a 10% (Jensen. 2002).

A estas parasitemias o superiores, usando el valor habitual de hematocrito del 5%, se producen signos de estrés celular en el cultivo que pueden afectar su viabilidad (Jensen. 2002; Fairhurst et al. 2003; Reilly et al. 2007). Para reducir el estrés, se puede incrementar el número de remplazos de medio cultivo por día, pero esto hace que el cultivo del parásito de la malaria se convierta en una labor exigente en términos de tiempo y recursos (Jensen. 2002).

En el caso particular de los estudios proteómicos en malaria, se requieren cultivos sincrónicos con elevadas parasitemias para realizar análisis comparativos de expresión global de genes durante los diferentes estadíos del parásito (Singh et al. 2007) y reducir las interferencias que pueden causar las proteínas de los eritrocitos no infectados cuando el objeto de estudio son las células rojas parasitadas.

Con el objeto de alcanzar altas parasitemias en cultivos sincrónicos, se realizaron modificaciones en varios de los parámetros establecidos originalmente por Trager y Jensen (Trager and Jensen 1976). Estos cambios incluyeron calidad de los eritrocitos, valores de hematocrito, métodos de sincronización, características de los inóculos, condiciones de incubación y métodos de tinción.

La calidad de los eritrocitos fue determinada en términos de su frescura, tiempo de almacenamiento y momento adecuado de adición al cultivo. Aunque se ha descrito que el conservante sanguíneo CPDA mantiene adecuadamente los eritrocitos para el cultivo de parásitos hasta los 35 días (Jensen. 2002), también se ha observado que la susceptibilidad a la invasión disminuye con la edad de la célula roja (Ferrer et al. 2008). Por ello, con el fin de aportar eritrocitos capaces de sostener las tasas de multiplicación del parásito en cada ciclo invasivo, se realizó un seguimiento al aumento de la parasitemia en función del tiempo de almacenamiento de la sangre entera y eritrocitos obtenidos a partir de voluntarios sanos.

De esta forma, la conservación en CPDA a 4°C de la sangre entera por un periodo de 15 días y de los eritrocitos aislados hasta los 5 días, se establecieron como tiempos límites de almacenamiento para mantener incrementos de parasitemia de 3 a 5 veces en cada ciclo invasivo. Así, la adición de los eritrocitos durante la etapa de trofozoitos maduros (~ 34-40 h) fue consistente con aumento de la parasitemia más cercano a 5 veces que la adición durante la fase de trofozoitos jóvenes (~24h). Aunque el uso de eritrocitos fuera de estos periodos de almacenamiento permitió la propagación del cultivo, los aumentos de parasitemia se mantenían alrededor de dos veces, retardando notablemente la consecución de parasitemias superiores al 50%.

Por su parte, el hematocrito resultó ser un parámetro fundamental asociado al incremento de la parasitemia y al recambio diario del medio de cultivo. Aunque la actividad metabólica del eritrocito infectado por *Plasmodium falciparum* es unas 100 veces mayor que cuando no está infectado (Kirk 2001), esta diferencia a nivel individual no es tan grande cuando se considera que en un cultivo al 5% de hematocrito la cantidad de eritrocitos no infectados puede ser muy elevada en comparación con los infectados.

De hecho, una reducción del hematocrito hasta 2%-3% en los cultivos había permitido previamente alcanzar parasitemias sincrónicas de hasta el 40% con sólo un cambio diario de medio de cultivo (Raventos-Suarez 1985). En nuestro caso, valores de hematocrito entre 0.8 % y 1.5% permitieron un remplazo diario de medio de cultivo y un crecimiento potencial del cultivo hasta alcanzar valores del 60% de parasitemia.

Este comportamiento fue coincidente con los datos de requerimientos nutricionales teóricos establecidos por Ribacke (Ribacke 2008); lo cual nos permitió derivar una ecuación que permite calcular el volumen aproximado de medio de cultivo requerido (V) para el sostenimiento del cultivo en un lapso de 24 h. Esta ecuación aporta una concepción más objetiva de los requerimientos de los cultivos por encima de la subjetividad propia de la observación del mismo al microscopio, al tiempo que permite que los cultivos de *P. falciparum* se conviertan en una técnica de rutina de laboratorio.

En cuanto al inóculo, se había descrito que después de su descongelación, los parásitos requieren alrededor de una semana para adaptarse nuevamente al cultivo y recuperar su tasa normal de crecimiento (Binh et al. 1997; Flores et al. 1997). Al ser los anillos las formas más resistentes al proceso de congelación-descongelación (Inger Ljungström 2004), la optimización del momento de congelación con nuestro protocolo logró una reducción significativa en el tiempo de adaptación del parásito descongelado al cultivo. Este efecto se consiguió mediante el uso de inóculos sincronizados en estado de anillos y con al menos 10% de parasitemia. De esta forma, a las 48h de iniciar el cultivo se restaura la parasitemia de 10%.

Por otra parte, la utilización de estos inóculos sincrónicos también favorece la sincronización posterior del cultivo con sorbitol y Percoll 70%. Estos métodos son los más ampliamente usados para mantener poblaciones mayoritarias de determinadas formas del parásito (Lambros 1979; Wahlgren et al. 1983). El sorbitol produce sincronización debido a que las formas eritrocitarias del parásito, mayores de 18h, son permeables a este glicitol y por tanto sufren un proceso de hemólisis (Lambros 1979; Wagner et al. 2003). Sin embargo, el tratamiento con sorbitol produce con frecuencia una ventana de sincronización demasiado amplia que puede llegar hasta 18h (Jensen. 2002); pero que en los cultivos lanzados con inóculos sincrónicos se logró reducir a tan solo 10 horas.

Por su parte, el tratamiento de los cultivos con soluciones de Percoll® se ha usado en las últimas tres décadas para el aislamiento de las formas maduras del parásito, explotando que la densidad del eritrocito infectado disminuye con la

maduración del parásito (Wahlgren et al. 1983). Durante este periodo, se han realizados algunos refinamientos a este método; siendo el uso de gradientes discontinuos de mezclas hipertónicas de Percoll®-sorbitol el más utilizado porque permite la obtención de diferentes fracciones de eritrocitos parasitados con distintos grados de maduración del parásito (Rivadeneira et al. 1983; Kutner et al. 1985; Fernandez et al. 1998).

Sin embargo, el uso frecuente de alguno de los dos métodos de sincronización, sorbitol y Percoll®, puede tener efectos secundarios sobre el cultivo. En el primero, el sorbitol puede penetrar a los eritrocitos que contienen las formas jóvenes produciendo un estrés osmótico sub-lítico en los eritrocitos parasitados (Krugliak and Ginsburg 2006). En el segundo, las soluciones hipertónicas de Percoll®-sorbitol puede causar el encogimiento de los eritrocitos (Kutner et al. 1985). En ambos casos, los efectos secundarios causan estrés celular, comprometiendo la viabilidad de los parásitos en cultivo (Jensen. 2002; Schuster 2002)

Con el uso alternado de los métodos de sorbitol y Percoll 70% se logró reducir este riesgo de toxicidad y la obtención de cultivos con una ventana de sincronización de 4-6 horas, que persiste hasta tres ciclos invasivos, pero que puede ser restablecida por un nuevo tratamiento de sincronización con sorbitol o Percoll 70%. De esta forma una fase estacionaria de cultivo sincrónico con parasitemias superiores a 50% pueden ser mantenidos durante semanas.

En cuanto a la atmósfera apropiada para su crecimiento, los parásitos mantienen buenas tasas de crecimiento en ambientes con bajo porcentaje de oxígeno y cerca de 5% de CO₂ (Jensen. 2002). Para ello, pueden ser adoptadas diferentes opciones, desde la original "candle-jar" (Trager and Jensen 1976), hasta el uso de mezclas de gases pre-mezcladas con diferentes porcentajes de O₂ del 3 al 18%, CO₂ del 2 al 5% y N₂ en cantidad suficiente para alcanzar el 100% (Binh et al. 1997; Schuster 2002; Omodeo-Sale et al. 2003; Wu 2006). En el proceso de optimización y con el fin de simplificar el método por las condiciones que pudiesen existir en los laboratorios situados en regiones tropicales, se decidió comparar el uso de una incubadora estándar con atmosfera con 5% CO₂ frente al uso recomendado de una mezcla de 3%

O₂, 5% CO₂ y 92% N₂ (Binh et al. 1997). Dado que se obtuvo un crecimiento indistinguible con ambos métodos, la opción de la incubadora de CO₂ resultó ser más eficiente por su bajo costo tanto económico como de manipulación, puesto que se eliminó el uso de frascos de cultivos no ventilados y la etapa de gaseado, lo que además disminuye el riesgo de contaminación.

Finalmente, la tinción con eosina-azul de metileno según Wright (Garcia 2000) tiñe las extensiones de los cultivos con una calidad similar a las preparaciones con Giemsa (Lebba 2008) en cuanto a la capacidad de distinguir los diferentes estadios de crecimiento del parásito. Adicionalmente, la tinción de Wright demostró ser 3 – 4 veces más rápida que la tinción con Giemsa 3%. Este menor tiempo de tinción, contribuye de forma decisiva a la toma de decisiones rápidas y asertivas durante el seguimiento diario al progreso de los cultivos. Por ello se propone como un método alternativo de tinción para los cultivos *in vitro* y que ha sido escasamente usado en la investigación con malaria (Garcia 2000; CDC 2004).

La presencia de eritrocitos no infectados en cultivos de *P. falciparum*, es una fuente de proteínas que interfieren en los subsiguientes análisis proteómicos del parásito y de la membrana del eritrocito infectado (Florens et al. 2002), lo que hace deseable un cultivo con elevada homogeneidad y por tanto con alta parasitemia.

Por otra parte, cuando el objeto de estudio son las proteínas de membrana del eritrocito infectado, además de cultivos sincrónicos con altas parasitemias y bajo hematocrito (Radfar et al. 2008), se requiere el uso de métodos selectivos de lisis para reducir la contaminación por parte de proteínas solubles del eritrocito, de membrana del parásito y de eritrocitos no infectados. Sin embargo, los métodos más utilizados para el fraccionamiento de eritrocitos infectados incluyen la lisis con soluciones amortiguadoras de fosfato a concentraciones hipotónicas entre 5 y 50 mM (Omodeo-Sale et al. 2003; Vincensini et al. 2005; Blisnick et al. 2006) soluciones de saponina entre 0.02 y 0.2% p/v (Florens et al. 2004; Wu 2006) o el tratamiento con estreptolisina-O (Ansorge et al. 1997; Bietz et al. 2009); pero ninguno de ellos logra lisar selectivamente los eritrocitos parasitados y por tanto no reducen la

contaminación que producen las proteínas de eritrocitos no parasitados en los subsiguientes análisis proteómicos.

Basados en la lisis osmótica que causa el sorbitol en los eritrocitos tras 18h de infectados (Wagner et al. 2003), el procedimiento descrito en este trabajo permitió la separación de una fracción rica en las proteínas de membrana de los eritrocitos infectados del resto de proteínas solubles y del parásito.

Esta selectividad quedó demostrada por la cantidad total de extracto proteico de membrana obtenido para cada uno de los estadios mayores de 18h que fueron lisados con sorbitol y el tipo de proteína identificada mediante los análisis proteómicos de huella peptídica y LC-MS-MS. Así por ejemplo, a partir de 1 mL de cultivo con 50% de parasitemia de trofozoitos jóvenes (24 h) se obtuvo la mitad de extracto total de proteínas de membrana que produce la lisis completa de 1mL de eritrocitos controles no parasitados y permitió la identificación de 15 proteínas de membrana HNE-carboniladas en el estudio de la infección por malaria en polimorfismos de grupos sanguíneos. Más aún, 30 de las 32 proteínas diferentes identificadas (isoformas no incluidas) se catalogaron dentro de alguno de los tipos de proteínas de membrana de eritrocito, como son las de citoesqueleto, las integrales y las asociadas a la superficie externa e interna de la membrana.

En cuanto a la carbonilación diferencial de proteínas membrana de eritrocitos con déficit de G6PD, una primera aproximación consistió en el estudio comparativo de muestras procedentes de individuos normales y de aquellos con déficit de G6PD A-.

Es conocido que los eritrocitos con esta variante presentan una reducida capacidad antioxidante en comparación con los eritrocitos no deficientes (Mason et al. 2007). Sin embargo, solo dos componentes mayoritarios de citoesqueleto, ankirina y proteína banda 4.1, se encontraron diferencialmente carbonilados. Considerando que estas proteínas son componentes mayoritarios de las interacciones verticales que contribuyen al mantenimiento de la forma y flexibilidad de los eritrocitos (Perrotta et al. 2008), y que la carbonilación es una modificación irreversible que puede afectar la función biológica de la proteína (Dalle-Donne et al. 2006), se propone que la

carbonilación de las ankirinas y la proteína banda 4.1 son productos del elevado ambiente oxidativo basal del eritrocito con déficit de G6PD que hacen a estas células susceptibles a la hemólisis por estrés oxidativo (Cappellini 2008).

De igual forma, se ha descrito la selección natural por malaria sufrida por la variante G6PD A- en las zonas endémicas y la protección que confiere contra las formas graves de la enfermedad (Ruwende et al. 1995; May et al. 2000; Guindo et al. 2007; Clark et al. 2009). A este respecto, la ausencia de diferencias en las curvas de parasitemia de los parásitos cultivados en eritrocitos con y sin déficit de G6PD, permite descartar un papel protector basado en impedir la invasión para la carbonilación diferencial de las ankirinas y proteína banda 4.1 en la variante A-.

No obstante, una vez infectado el eritrocito, se observaron diferencias en los perfiles de oxidación de las proteínas de membrana a lo largo del ciclo intraeritrocitario en condiciones normales y de déficit de G6PD, indicando que el daño oxidativo que ocurre en estas proteínas puede hacer parte del mecanismo protector. Así, mientras que en condiciones normales, un periodo de aumentado estrés oxidativo se observó entre las 24h y 40h post-infección; bajo condiciones de déficit de G6PD A- este periodo abarca desde 12h hasta 40h post-infección.

El papel biológico descrito de las proteínas carboniladas identificadas diferencialmente en la membrana eritrocitaria durante la infección sugiere la existencia de una remodelación oxidativa que implica cambios funcionales distintos dependiendo del estatus de G6PD.

Así, en los eritrocitos normales (G6PD-B) infectados se presenta un ambiente oxidativo aumentado pero atenuado por el propio parásito gracias a sus defensas antioxidantes (Becker et al. 2004; Akide-Ndunge et al. 2009). En esta situación, la carbonilación de las proteínas del citoesqueleto: espectrin, ankirinas, banda 4.2 y actina, supondrían dianas específicas durante la invasión ya que interactúan con otras proteínas exportadas por *P. falciparum* que participan en los procesos de adhesión al endotelio vascular y evasión del sistema inmune humano (Maier et al. 2008).

Esta hipótesis se ve reforzada con la identificación de la chaperoninas que contienen TCP1 y de flotilina-1. Las primera forma parte del grupo de chaperonas moleculares que asisten al plegamiento de las proteínas del citoesqueleto después de la hidrólisis del ATP (Abe et al. 2009). Dado que previamente, se ha demostrado que la fosforilación de diversas proteínas como la banda 4.1 y PfHSP-70 son necesarias para el ensamble de los antígenos exportados por el parásito a la membrana del eritrocito huésped (Wu et al. 2009), es factible considerar que la carbonilación y la fosforilación actúen como mecanismos concertados para el adecuado acoplamiento de las proteínas exportadas por el parásito.

Por su parte, la flotilina 1 es una proteína integral de membrana que forma parte de las balsas de lípidos (Salzer 2001) y se ha propuesto que interacciona con el antígeno PfEMP1 para estabilizar la endo-vacuolación en el eritrocito infectado (Samuel et al. 2001; Murphy et al. 2007). Es por ello que la carbonilación de la flotilina-1 y la subunidad 2 de la TCP-1, en un ambiente oxidativo controlado por el parásito, podría formar parte del mecanismo de regulación para la interacción entre las proteínas del citoesqueleto de la célula huésped y los antígenos exportados por *P. falciparum*.

Sin embargo, cuando el parásito se desarrolla en eritrocitos con déficit de G6PD la situación funcional dirigida por la carbonilación de las proteínas de membrana es diferente. En esta condición, aunque se produce un aumento significativo en la expresión de las defensas antioxidantes del parásito (Akide-Ndunge et al. 2009), también se genera un extenso daño oxidativo en las proteínas de membrana del eritrocito desde las etapas tempranas de la invasión eritrocitaria.

La formación de hemicromos que migraron en la electroforesis bidimensional junto a proteínas antioxidantes como la peroxirredoxina 6, biliverdin IX β reductasa y las anhidrasas carbónicas I y II, refuerzan la hipótesis de la existencia de un mecanismo protector centrado en los agregados de hemicromos-banda 3 como sucede en talasemia y anemia de células falciformes (Mannu et al. 1995; Ayi et al. 2004) y que favorecería la fagocitosis temprana del eritrocito infectado (Cappadoro et al. 1998).

Adicionalmente, la oxidación de 4 proteínas de choque térmico (2 humanas y 2 del parásito), fascina, subunidad 8 de TCP1 y la ubiquitin proteasa-14, sugiere además una interferencia con el tráfico, plegamiento y ensamblaje de las proteínas que el parásito exporta a la superficie del eritrocito huésped. En consecuencia, los procesos de citoadherencia y evasión del sistema inmune humano se verían afectados.

Por lo tanto, considerando las funciones de este elevado número de proteínas carboniladas en el eritrocito con déficit de G6PD infectado, se propone la hipótesis de daño oxidativo no controlado por el parásito que afecta el tráfico y ensamblaje de proteínas de citoadherencia exportadas por *P. falciparum*. De esta forma, el mecanismo protector de la deficiencia de G6PD A- además de la acumulación de hemicromos que agregan la banda 3, se presentaría un efecto deletéreo dentro del sistema secretorio del parásito. El resultado sería un parásito menos virulento y su célula huésped, el eritrocito, más fácilmente eliminado por fagocitosis (Cappadoro et al. 1998).

La importancia biológica de la carbonilación de las proteínas de membrana del eritrocito infectado se refuerza con los resultados obtenidos en el estudio de carbonilación de eritrocitos de los diferentes grupos sanguíneos. En éste, se demostró que bajo condiciones fisiológicas normales, el grupo 0 presenta una menor cantidad de proteínas carboniladas que los demás grupos del sistema ABO. Considerando que la glicosilación de las proteínas es una vía de introducción de carbonilos en las proteínas (Dalle-Donne et al. 2006), el bajo nivel de oxidación mostrado por el grupo 0 quizás sea consecuencia de la ausencia de los carbohidratos determinantes de grupos A y B.

Al igual que el polimorfismo de G6PD, debido a que la propagación *in vitro* del parásito fue similar con cada grupo sanguíneo, se puede descartar un papel protector basado en impedir la invasión para el menor nivel oxidativo basal de las proteínas de membrana del eritrocito con grupo 0.

En cuanto a la carbonilación causada por *P. falciparum* en eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos, se observó nuevamente que el parásito produce un elevado estrés oxidativo entre las 24h y 40h del ciclo intraeritrocitario.

Adicionalmente, la obtención de perfiles de carbonilación similares para todos los grupos sanguíneos estudiados a las 24h de la invasión, refuerzan la hipótesis del aumento de estrés oxidativo controlado por el parásito en la membrana eritrocitaria.

Debido a la naturaleza química heterogénea de la carbonilación y con el fin de profundizar en su estudio, se procedió a estudiar la carbonilación mediada por 4-HNE en los polimorfismos de grupo sanguíneo ABO. Esta forma de carbonilación ha llamado la atención de los investigadores por su papel como marcador de daño oxidativo en un amplio abanico de enfermedades (Uchida 2003). En particular, en malaria el 4-HNE producido por *P. falciparum* genera aductos con proteínas de membrana del eritrocito huésped, disminuyendo su deformabilidad y contribuyendo a la aparición de anemia, uno de los síntomas relacionados con la gravedad de la enfermedad (Skorokhod et al. 2007).

Sin embargo, un detallado estudio para la identificación de las proteínas HNE-modificadas inducidas por el parásito no se ha completado aún. Más aún, a pesar del creciente interés por el estudio de las proteínas carboniladas en general y la actualización constante de sistemas de búsqueda y análisis proteómico como el MASCOT, la identificación y localización de los residuos de aminoácidos modificados, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, sigue siendo uno de los principales retos de la proteómica (Madian 2010) .

Por ello, con el objeto de identificar proteínas de membrana de eritrocitos HNE-modificadas por *Plasmodium falciparum* fue necesario desarrollar antes un método proteómico basado en espectrometría de masas dirigido a la identificación de los residuos de aminoácidos modificados y que se describe a continuación.

Para poner a punto la metodología se utilizó la BSA como proteína modelo. Así, el empleo de un diseño experimental que combina la separación de las proteínas por SDS-PAGE, seguido de la inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-HNE y el inmuno-enriquecimiento de péptidos trípticos con el análisis proteómico por LC-MS/MS resulto adecuado para la identificación y localización de residuos de aminoácidos 4-HNE-modificados.

En este diseño experimental resultó clave la etapa de inmuno-enriquecimiento de péptidos trípticos modificados por 4-HNE, previo al análisis por LC –MS/MS. De esta forma, se consigue la identificación y localización de aductos de Michael en 12 péptidos de BSA y 2 péptidos de β -espectrina eritrocitaria en muestras de grupos sanguíneos AB y B bajo condiciones fisiológicas normales. La susceptibilidad de la espectrina a la modificación por 4-HNE se ha demostrado previamente en estudios de modificación forzada con 4-HNE de los eritrocitos o extractos proteicos enriquecidos en espectrinas (Uchida et al. 1997; Arashiki et al. 2009). Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado localizar la modificación de β -espectrina en condiciones fisiológicas. De allí, que este resultado se convierte en la primera evidencia de localización de un residuo de aminoácido modificado por 4-HNE bajo condiciones fisiológicas normales (Grace et al. 1996; Crabb et al. 2002; Fenaille et al. 2003; Rauniyar et al. 2009; Chavez et al. 2010).

La validación de los resultados obtenidos se realizó mediante análisis de secuenciación *de novo* (Steen 2004), de esta forma se demostró que los residuos de histidinas y lisinas fueron los más susceptibles a la modificación por la vía de Michael como ha sido sugerido para otras proteínas (Carini et al. 2004). De igual manera, permitió descartar falsos positivos de péptidos seleccionados como potencialmente modificados por la base de datos MASCOT. Finalmente, mediante este análisis también se logró la identificación de dos mezclas de péptidos isómeros 4-HNE-modificados. Considerando que estas mezclas no se pueden distinguir, aún utilizando espectrómetros de masas de alta resolución (He et al. 2004), se confirma que la inspección manual de los espectros es necesario para la validación de los resultados de localización de residuos de aminoácidos modificados (Bennaars-Eiden et al. 2002; Chavez et al. 2010; Madian 2010).

Sin embargo, se debe reseñar que un factor limitante del método resultó ser el alto número de péptidos no modificados que se obtuvieron para cada una de las proteínas identificadas. Esto puede ser debido a cierto grado inespecificidad de los anticuerpos policlonales utilizados en las etapas de inmunodetección e inmuno-enriquecimiento de proteínas y péptidos 4-HNE-modificados.

Una alternativa a este inconveniente sería la utilización de varios anticuerpos monoclonales o de anticuerpos policlonales purificados por cromatografía de afinidad. En el caso de los anticuerpos monoclonales, la identificación y localización de los residuos modificados solo se consigue mediante la modificación forzada *in vitro* de las muestras 4-HNE, pero no en condiciones fisiológicas (Chavez et al. 2010). Por lo tanto, quizás la elaboración de anticuerpos policlonales purificados por cromatografía de afinidad sea en un futuro una alternativa para mejorar la especificidad y aprovechar la capacidad que tienen estos anticuerpos para distinguir diversos tipos de aductos de 4-HNE en un solo paso experimental (Fenaille et al. 2002).

Dado que la identificación de muchas de las proteínas modificadas se repite en las réplicas de las muestras analizadas tanto en condiciones normales como infectadas *in vitro* por *P. falciparum*, se puede considerar que estas se hallan modificadas por 4-HNE de forma fisiológica y que por tanto deben jugar un papel funcional y/o estructural.

Así, el grupo 0 presentó menor cantidad de proteínas de membrana de eritrocitos 4-HNE-carboniladas que el resto de grupos sanguíneos del sistema ABO; tanto en condiciones normales como en la infección por *P. falciparum* en el estado de trofozoitos jóvenes (24h). Más aún, cuando se realizó la comparación entre las muestras de infectados con sus respectivos controles no infectados de cada grupo sanguíneo, se observó que el parásito incrementa el número de proteínas modificadas por 4HNE, una tendencia similar a la observada en los estudios previos con controles y déficit de G6PD.

Dentro de este grupo de proteínas, el comportamiento redox de la ankirina en los diferentes polimorfismos eritrocitarios estudiados merece una particular atención. La isoforma CRA_b de ankyrina 1, fue la única identificada como carbonilada en muestras de grupo 0 con la variante G6PD A- tanto en muestras de infectados y no infectados. Mientras, en muestras de grupo 0 con actividad normal de G6PD se hallaron carboniladas tres isoformas en el estadio de trofozoitos de 34h, pero ninguna de estas presentó la modificación por 4-HNE. Por su parte, un total de siete isoformas

de ankirina se identificaron en muestras de grupos A, B y AB tanto de infectados como no infectados.

Dado que la ankirina es un componente central de las interacciones verticales del citoesqueleto con la bícapa lipídica (Perrotta et al. 2008; Ipsaro et al. 2009), que resulta ser blanco de proteasas relacionadas con el egreso del parásito (Dua et al. 2001; Dhawan et al. 2003) y proteínas de Plasmodium exportadas a la célula huésped (Magowan et al. 2000); se plantea que la naturaleza de la carbonilación que sufre la ankirina resultaría importante para favorecer el proceso de remodelado de la membrana del eritrocito huésped que induce *P. falciparum*. Así por ejemplo, la ausencia de ankirina HNE-carbonilada en el grupo O y la carbonilación de una sola isoforma en la variante G6PD A- quizá confieren una ventaja adaptativa a las personas con estos polimorfismos frente a individuos normales con grupos sanguíneos diferentes del O.

Este comportamiento regulado por el tipo y extensión de las modificaciones postraduccionales de las proteínas como la fosforilación, metilación, miristilación, palmitilación y farnesilación se ha descrito previamente para las proteínas del citoesqueleto membranoso del eritrocito (Cohen 1992; Manno et al. 1995; Manno et al. 2005; Pasini et al. 2010)

Adicional a la ankirina, las proteínas EPB 4.2 y EPB 4.1 resultaron selectivamente HNE-carboniladas. EPB 4.2 se identificó como HNE-carbonilada en muestra de grupos A y B infectados, pero no en grupo O. Mientras que EPB 4.1 solo fue identificada como HNE-carbonilada en muestras de infectados con grupo O. Ambas proteínas se asocian con la ankirina y participan de los procesos de mantenimiento de la forma y elasticidad de la membrana del eritrocito sano (Su et al. 2006; Ipsaro et al. 2009; Satchwell et al. 2009).

En la infección por *P. falciparum* EPB 4.1 y 4.2 participan en el remodelado de la membrana de eritrocito parasitado como blanco de proteasas o proteínas exportadas (Dua et al. 2001; Waller et al. 2003; Lanzillotti and Coetzer 2006; Maier et al. 2009). El comportamiento redox observado para estas dos proteínas, en ambos estudios (déficit

de G6PD y grupo sanguíneo 0), refuerza el planteamiento que relaciona la naturaleza de la carbonilación con la regulación de la función de la proteína. Así, para el grupo 0, la ausencia de EPB 4.2 HNE-carbonilada y la presencia de EPB 4.1 HNE-carbonilada quizá contribuyen a la ventaja selectiva que confiere este grupo en zonas endémicas de malaria (Pathirana et al. 2005; Cserti 2007; Rowe et al. 2007; Senga et al. 2007).

Más aún, la pérdida de 4-HNE de las espectrininas observada en el estadio de trofozoitos maduros indica que este tipo de carbonilación – descarbonilación se comporta como un mecanismo de señalización celular (Wong et al. 2008; Wong et al. 2009), reforzando la hipótesis del remodelamiento de la membrana de la célula huésped bajo un ambiente oxidativo aumentado y controlado por el parásito en condiciones normales de actividad de G6PD.

Capítulo VII

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. El protocolo de cultivo optimizado de estadíos intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum* permite alcanzar hasta 60% de células parasitadas dentro de ventanas de sincronización de 4 a 6 horas, mediante el uso de eritrocitos frescos, inóculos sincrónicos, bajo hematocrito, sincronización combinada y el cálculo de la cantidad de medio de cultivo requerido para realizar un remplazo diario del mismo. Estas características lo convierten en un procedimiento rutinario de laboratorio y lo hacen adecuado para el estudio de modificaciones postraduccionales mediante herramientas proteómicas.
2. La identificación y localización de residuos de aminoácidos modificados por 4-HNE en proteínas de membrana de eritrocitos bajo condiciones fisiológicas normales y su validación es posible mediante el empleo de un análisis proteómico que combina la separación de las proteínas por SDS-PAGE, seguido de la inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-HNE y el inmunoenriquecimiento de péptidos tripticos para su separación e identificación por LC-MS/MS y secuenciación *de novo*.
3. La carbonilación de las proteínas de membrana eritrocitaria TCP-1, flotilina-1, espectrinas, ankirinas y banda 4.2 durante infección por *Plasmodium falciparum* indica que el parásito remodela oxidativamente la membrana del eritrocito parasitado de manera controlada.
4. Los cambios cuantitativos y cualitativos en el patrón de carbonilación por 4-HNE de las proteínas de membrana eritrocitaria durante la maduración de *Plasmodium falciparum* sugieren la existencia de un mecanismo de señalización celular parásito/hospedador basado en la carbonilación/descarbonilación de proteínas del citoesqueleto eritrocitario durante la infección.

5. El mecanismo protector frente a malaria grave de la variante A- de la deficiencia eritrocitaria de G6PD, involucra un extenso daño oxidativo no controlado por el parásito que afecta a proteínas de tres rutas metabólicas en la célula huésped, (i) las involucradas en el tráfico y ensamblaje de proteínas del parásito exportadas al citoesqueleto y superficie de membrana del eritrocito, (ii) las de respuesta al estrés oxidativo y (iii) las de respuesta general al estrés. De esta manera la acumulación de hemicromos en su superficie incrementaría la fagocitosis temprana de la célula parasitada, atenuándose la virulencia del parásito.

6. La menor exposición de proteínas de membrana carboniladas que presentan los eritrocitos del grupo sanguíneo O, junto con el patrón diferencial de carbonilación por 4-HNE de las proteínas ankirina, EPB 4.1 y EPB 4.2 podría estar asociado al carácter protector parcial del grupo O frente a los síntomas de malaria grave.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, Y., S. O. Yoon, et al. (2009). "p90 ribosomal S6 kinase and p70 ribosomal S6 kinase link phosphorylation of the eukaryotic chaperonin containing TCP-1 to growth factor, insulin, and nutrient signaling." *J Biol Chem* **284**(22): 14939-48.
- Aebbersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." *Nature* **422**(6928): 198-207.
- Aidoo, M., D. J. Terlouw, et al. (2002). "Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality." *Lancet* **359**(9314): 1311-2.
- Akide-Ndunge, O. B., E. Tambini, et al. (2009). "Co-ordinated stage-dependent enhancement of *Plasmodium falciparum* antioxidant enzymes and heat shock protein expression in parasites growing in oxidatively stressed or G6PD-deficient red blood cells." *Malar J* **8**: 113.
- Alamdari, D. H., E. Kostidou, et al. (2005). "High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein." *Free Radic Biol Med* **39**(10): 1362-7.
- Allen, S. J., A. O'Donnell, et al. (1997). "alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14736-41.
- Allison, A. C. (1954). "Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection." *Br Med J* **1**(4857): 290-4.
- An, X. and N. Mohandas (2008). "Disorders of red cell membrane." *Br J Haematol* **141**(3): 367-75.
- Andriantsoanirina, V., A. Ratsimbaoa, et al. (2009). "*Plasmodium falciparum* drug resistance in Madagascar: facing the spread of unusual pfdhfr and pfmdr-1 haplotypes and the decrease of dihydroartemisinin susceptibility." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(11): 4588-97.
- Ansorge, I., K. Paprotka, et al. (1997). "Permeabilization of the erythrocyte membrane with streptolysin O allows access to the vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum* and a molecular analysis of membrane topology." *Mol Biochem Parasitol* **84**(2): 259-61.
- Arashiki, N., Y. Otsuka, et al. (2009). "The covalent modification of spectrin in red cell membranes by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal." *Biochem Biophys Res Commun*.
- Arese, P. and A. De Flora (1990). "Pathophysiology of hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." *Semin Hematol* **27**(1): 1-40.
- Arese, P., F. Turrini, et al. (2005). "Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes." *Cell Physiol Biochem* **16**(4-6): 133-46.
- Ayi, K., F. Turrini, et al. (2004). "Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait." *Blood* **104**(10): 3364-71.
- Becker, K., L. Tilley, et al. (2004). "Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions." *Int J Parasitol* **34**(2): 163-89.
- Beier, J. C. (1998). "Malaria parasite development in mosquitoes." *Annu Rev Entomol* **43**: 519-43.

- Beier, J. C., R. S. Copeland, et al. (1992). "Ookinete rates in Afrotropical anopheline mosquitoes as a measure of human malaria infectiousness." Am J Trop Med Hyg **47**(1): 41-6.
- Benga, G. (2003). "Birth of water channel proteins-the aquaporins." Cell Biol Int **27**(9): 701-9.
- Bennaars-Eiden, A., L. Higgins, et al. (2002). "Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal *in vitro* and *in vivo*. Evidence for a role in antioxidant biology." J Biol Chem **277**(52): 50693-702.
- Berlett, B. S. and E. R. Stadtman (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." J Biol Chem **272**(33): 20313-6.
- Biemann, K. (1992). "Mass spectrometry of peptides and proteins." Annu Rev Biochem **61**: 977-1010.
- Bienzle, U., O. Ayeni, et al. (1972). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant." Lancet **1**(7742): 107-10.
- Bienzle, U., O. Sodeinde, et al. (1975). "Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell anemia: frequency and features of the association in an African community." Blood **46**(4): 591-7.
- Bietz, S., I. Montilla, et al. (2009). "Recruitment of human aquaporin 3 to internal membranes in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte." Mol Biochem Parasitol **167**(1): 48-53.
- Binh, V. Q., A. J. Luty, et al. (1997). "Differential effects of human serum and cells on the growth of *Plasmodium falciparum* adapted to serum-free *in vitro* culture conditions." Am. J. Trop. Med. Hyg. **57**(5): 594-600.
- Black, C. G., N. I. Proellocks, et al. (2008). "In vivo studies support the role of trafficking and cytoskeletal-binding motifs in the interaction of MESA with the membrane skeleton of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells." Mol Biochem Parasitol **160**(2): 143-7.
- Bleiholder, C., S. Osburn, et al. (2008). "Sequence-scrambling fragmentation pathways of protonated peptides." J Am Chem Soc **130**(52): 17774-89.
- Blisnick, T., L. Vincensini, et al. (2006). "Protein phosphatase 1, a *Plasmodium falciparum* essential enzyme, is exported to the host cell and implicated in the release of infectious merozoites." Cell Microbiol **8**(4): 591-601.
- Bolchaz, L. J., J. D. Morrow, et al. (2002). "Primaquine-induced hemolytic anemia: effect of 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline on rat erythrocyte sulfhydryl status, membrane lipids, cytoskeletal proteins, and morphology." J Pharmacol Exp Ther **303**(1): 141-8.
- Bonnet, M., I. Broek, et al. (2009). "Varying efficacy of artesunate+amodiaquine and artesunate+sulphadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in the Democratic Republic of Congo: a report of two in-vivo studies." Malar J **8**: 192.
- Bossio, R. E. and A. G. Marshall (2002). "Baseline resolution of isobaric phosphorylated and sulfated peptides and nucleotides by electrospray ionization FTICR ms: another step toward mass spectrometry-based proteomics." Anal Chem **74**(7): 1674-9.
- Buss, H., T. P. Chan, et al. (1997). "Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method." Free Radic Biol Med **23**(3): 361-6.

- Butterfield, D. A. (2002). "Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review." Free Radic Res **36**(12): 1307-13.
- Butterfield, D. A., A. Castegna, et al. (2002). "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death." Neurobiol Aging **23**(5): 655-64.
- Cabiscol, E., E. Piulats, et al. (2000). "Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **275**(35): 27393-8.
- Cao, G. and R. G. Cutler (1995). "Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine." Arch Biochem Biophys **320**(1): 106-14.
- Cao, G. and R. G. Cutler (1995). "Protein oxidation and aging. II. Difficulties in measuring alkaline protease activity in tissues using the fluorescamine procedure." Arch Biochem Biophys **320**(1): 195-201.
- Cappadoro, M., G. Giribaldi, et al. (1998). "Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency." Blood **92**(7): 2527-34.
- Cappellini, M. D. and G. Fiorelli (2008). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency." Lancet **371**(9606): 64-74.
- Carini, M., G. Aldini, et al. (2004). "Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins." Mass Spectrometry Reviews **23**(4): 281-305.
- Castegna, A., M. Aksenov, et al. (2002). "Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71." J Neurochem **82**(6): 1524-32.
- CDC. (2004). "Laboratory diagnosis of malaria ", from http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/PDF_Files/malaria_staining_benchaid.pdf.
- Clark, T. G., A. E. Fry, et al. (2009). "Allelic heterogeneity of G6PD deficiency in West Africa and severe malaria susceptibility." Eur J Hum Genet **17**(8): 1080-5.
- Codreanu, S. G., B. Zhang, et al. (2009). "Global analysis of protein damage by the lipid electrophile 4-hydroxy-2-nonenal." Mol Cell Proteomics **8**(4): 670-80.
- Cohen, C. M. and P. Gascard (1992). "Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins." Semin Hematol **29**(4): 244-92.
- Conrad, C. C., J. M. Talent, et al. (2000). "Post-Electrophoretic Identification of Oxidized Proteins." Biol Proced Online **2**: 39-45.
- Cooke, B. M., K. Lingelbach, et al. (2004). "Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells." Trends Parasitol **20**(12): 581-9.
- Cooke, B. M., N. Mohandas, et al. (2004). "Malaria and the red blood cell membrane." Semin Hematol **41**(2): 173-88.

- Cornish, T. J. and R. J. Cotter (1993). "A curved-field reflectron for improved energy focusing of product ions in time-of-flight mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **7**(11): 1037-40.
- Cowman, A. F. and B. S. Crabb (2006). "Invasion of red blood cells by malaria parasites." Cell **124**(4): 755-66.
- Crabb, J. W., J. O'Neil, et al. (2002). "Hydroxynonenal inactivates cathepsin B by forming Michael adducts with active site residues." Protein Sci **11**(4): 831-40.
- Craig, A. and A. Scherf (2001). "Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion." Mol Biochem Parasitol **115**(2): 129-43.
- Cristea, I. M., S. J. Gaskell, et al. (2004). "Proteomics techniques and their application to hematology." Blood **103**(10): 3624-34.
- Crooke, A., A. Diez, et al. (2006). "Transient silencing of *Plasmodium falciparum* bifunctional glucose-6-phosphate dehydrogenase- 6-phosphogluconolactonase." FEBS J **273**(7): 1537-46.
- Cserti, C. M. and W. H. Dzik (2007). "The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria." Blood **110**(7): 2250-8.
- Curtis, J. M., P. A. Grimsrud, et al. (2010). "Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction." Diabetes **59**(5): 1132-42.
- Chavez, J., W. G. Chung, et al. (2010). "Site-specific protein adducts of 4-hydroxy-2(E)-nonenal in human THP-1 monocytic cells: protein carbonylation is diminished by ascorbic acid." Chemical Research in Toxicology **23**(1): 37-47.
- Chavez, J., J. Wu, et al. (2006). "New role for an old probe: affinity labeling of oxylipid protein conjugates by N'-aminooxymethylcarbonylhydrazino d-biotin." Anal Chem **78**(19): 6847-54.
- Cheetham, M. E. and A. J. Caplan (1998). "Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function." Cell Stress Chaperones **3**(1): 28-36.
- Chen, Q., M. Schlichtherle, et al. (2000). "Molecular aspects of severe malaria." Clin Microbiol Rev **13**(3): 439-50.
- D'Amici, G. M., S. Rinalducci, et al. (2007). "Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage." J Proteome Res **6**(8): 3242-55.
- Daily, J. P. (2006). "Antimalarial drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance." J Clin Pharmacol **46**(12): 1487-97.
- Dalle-Donne, I., G. Aldini, et al. (2006). "Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression." J Cell Mol Med **10**(2): 389-406.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, et al. (2006). "Biomarkers of oxidative damage in human disease." Clin Chem **52**(4): 601-23.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, et al. (2001). "The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself." Free Radic Biol Med **31**(12): 1624-32.

- Dalle-Donne, I., A. Scaloni, et al. (2006). Redox proteomics : from protein modifications to cellular dysfunction and diseases. Hoboken, N.J., Wiley-Interscience.
- Dandona, P., A. Chaudhuri, et al. (2007). "Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease." Am J Cardiol **99(4A)**: 15B-26B.
- Daniels, G. (2007). "Functions of red cell surface proteins." Vox Sang **93(4)**: 331-40.
- Dean, L. (2005). Blood Groups and Red Cell Antigens. N. C. f. B. Information. Bethesda, NCBI.
- Deitsch, K. W. and T. E. Wellems (1996). "Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol **76(1-2)**: 1-10.
- Destro Bisol, G. (1999). "Genetic resistance to malaria, oxidative stress and hemoglobin oxidation." Parassitologia **41(1-3)**: 203-4.
- Dhawan, S., M. Dua, et al. (2003). "Ankyrin peptide blocks falcipain-2-mediated malaria parasite release from red blood cells." J Biol Chem **278(32)**: 30180-6.
- Diamond, D. L. and A. Carruthers (1993). "Metabolic control of sugar transport by derepression of cell surface glucose transporters. An insulin-independent recruitment-independent mechanism of regulation." J Biol Chem **268(9)**: 6437-44.
- Dua, M., P. Raphael, et al. (2001). "Recombinant falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1." Mol Biochem Parasitol **116(1)**: 95-9.
- Duraisingh, M. T., A. G. Maier, et al. (2003). "Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **100(8)**: 4796-801.
- Eckl, P. M., A. Ortner, et al. (1993). "Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes." Mutat Res **290(2)**: 183-92.
- Egan, T. J. (2001). "Structure-function relationships in chloroquine and related 4-aminoquinoline antimalarials." Mini Rev Med Chem **1(1)**: 113-23.
- Egan, T. J., J. M. Combrinck, et al. (2002). "Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Biochem J **365(Pt 2)**: 343-7.
- Elford, B. C., G. M. Cowan, et al. (1995). "Parasite-regulated membrane transport processes and metabolic control in malaria-infected erythrocytes." Biochem J **308 (Pt 2)**: 361-74.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur, et al. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11(1)**: 81-128.
- Fairbanks, G., T. L. Steck, et al. (1971). "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." Biochemistry **10(13)**: 2606-17.
- Fairhurst, R. M., H. Fujioka, et al. (2003). "Aberrant development of *Plasmodium falciparum* in hemoglobin CC red cells: implications for the malaria protective effect of the homozygous state." Blood **101(8)**: 3309-15.
- Faustman, C., D. C. Liebler, et al. (1999). "alpha,beta-unsaturated aldehydes accelerate oxymyoglobin oxidation." J Agric Food Chem **47(8)**: 3140-4.
- Fenaille, F., P. A. Guy, et al. (2003). "Study of protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal and other short chain aldehydes analyzed by electrospray ionization tandem mass spectrometry." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **14(3)**: 215-26.

- Fenaille, F., J. C. Tabet, et al. (2002). "Immunoaffinity purification and characterization of 4-hydroxy-2-nonenal- and malondialdehyde-modified peptides by electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Anal Chem* **74**(24): 6298-304.
- Fenaille, F., J. C. Tabet, et al. (2004). "Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified peptides within unfractionated digests using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Anal Chem* **76**(4): 867-73.
- Fenn, J. B., M. Mann, et al. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* **246**(4926): 64-71.
- Ferguson, H. M. and A. F. Read (2002). "Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved?" *Trends Parasitol* **18**(6): 256-61.
- Fernandez, V., C. J. Treutiger, et al. (1998). "Multiple adhesive phenotypes linked to rosetting binding of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria." *Infect Immun* **66**(6): 2969-75.
- Ferreira, A., J. Balla, et al. (2008). "A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?" *J Mol Med* **86**(10): 1097-111.
- Ferrer, J., M. D. Rosal, et al. (2008). "Effect of the haematocrit layer geometry on *Plasmodium falciparum* static thin-layer *in vitro* cultures." *Malar J* **7**: 203.
- Fidock, D. A., T. Nomura, et al. (2000). "Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance." *Mol Cell* **6**(4): 861-71.
- Figtree, M., R. Lee, et al. (2010). "*Plasmodium knowlesi* in human, Indonesian Borneo." *Emerg Infect Dis* **16**(4): 672-4.
- Filosa, S., A. Fico, et al. (2003). "Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress." *Biochem J* **370**(Pt 3): 935-43.
- Florens, L., X. Liu, et al. (2004). "Proteomics approach reveals novel proteins on the surface of malaria-infected erythrocytes." *Mol Biochem Parasitol* **135**(1): 1-11.
- Florens, L., M. P. Washburn, et al. (2002). "A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle." *Nature* **419**(6906): 520-6.
- Flores, M. V., S. M. Berger-Eiszele, et al. (1997). "Long-term cultivation of *Plasmodium falciparum* in media with commercial non-serum supplements." *Parasitol Res* **83**(7): 734-6.
- Fowkes, F. J., P. Michon, et al. (2008). "Host erythrocyte polymorphisms and exposure to *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinea." *Malar J* **7**: 1.
- Friedman, J. S., M. F. Lopez, et al. (2004). "SOD2-deficiency anemia: protein oxidation and altered protein expression reveal targets of damage, stress response, and antioxidant responsiveness." *Blood* **104**(8): 2565-73.
- Fujinaga, J., X. B. Tang, et al. (1999). "Topology of the membrane domain of human erythrocyte anion exchange protein, AE1." *J Biol Chem* **274**(10): 6626-33.
- Garcia, L. S. (2000). Laboratory diagnosis of blood-borne parasitic diseases : approved guideline. Washington; National Comm. Clinical Lab Standars.

- Gilberger, T. W., J. K. Thompson, et al. (2003). "A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes." J Biol Chem **278**(16): 14480-6.
- Gilles, D. A. W. H. M. (2002). Essential malariology. London ; New York, Arnold.
- Ginsburg, H., O. Famin, et al. (1998). "Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action." Biochem Pharmacol **56**(10): 1305-13.
- Ginsburg, H. and W. D. Stein (2004). "The new permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of the infected erythrocyte: comparison of results using different experimental techniques." J Membr Biol **197**(2): 113-34.
- Giribaldi, G., D. Ulliers, et al. (2001). "Growth of *Plasmodium falciparum* induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes." Br J Haematol **113**(2): 492-9.
- Giribaldi, G., D. Ulliers, et al. (2004). "Hemozoin- and 4-hydroxynonenal-mediated inhibition of erythropoiesis. Possible role in malarial dyserythropoiesis and anemia." Haematologica **89**(4): 492-3.
- Goodman, S. R., A. Kurdia, et al. (2007). "The human red blood cell proteome and interactome." Exp Biol Med (Maywood) **232**(11): 1391-408.
- Grace, J. M., T. L. MacDonald, et al. (1996). "Determination of site-specific modifications of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal using matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry." Free Radic Res **25**(1): 23-9.
- Grimsrud, P. A., M. J. Picklo, Sr., et al. (2007). "Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal." Mol Cell Proteomics **6**(4): 624-37.
- Grimsrud, P. A., H. Xie, et al. (2008). "Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes." J Biol Chem **283**(32): 21837-41.
- Guindo, A., R. M. Fairhurst, et al. (2007). "X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria." PLoS Med **4**(3): e66.
- Guo, B., J. D. Phillips, et al. (1995). "Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome." J Biol Chem **270**(37): 21645-51.
- Haldar, K. and N. Mohandas (2007). "Erythrocyte remodeling by malaria parasites." Curr Opin Hematol **14**(3): 203-9.
- Hanash, S. (2003). "Disease proteomics." Nature **422**(6928): 226-32.
- He, F., M. R. Emmett, et al. (2004). "Theoretical and experimental prospects for protein identification based solely on accurate mass measurement." J Proteome Res **3**(1): 61-7.
- Hearn, V. M., Z. G. Smith, et al. (1968). "An a-N-acetyl-D-galactosaminyltransferase associated with the human blood-group A character." Biochem J **109**(2): 315-7.
- Heinecke, J. W. (2002). "Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress." Free Radic Biol Med **32**(11): 1090-101.
- Hempelmann, E. and T. J. Egan (2002). "Pigment biocrystallization in *Plasmodium falciparum*." Trends Parasitol **18**(1): 11.

- Hess, J. R. (2010). "Red cell storage." J Proteomics **73**(3): 368-73.
- Hillenkamp, F., M. Karas, et al. (1991). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers." Anal Chem **63**(24): 1193A-1203A.
- Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, et al. (2004). "A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection." Science **306**(5703): 1934-7.
- Hodge, D. L., T. Charron, et al. (1998). "Structural characterization and tissue-specific expression of the mouse glucose-6-phosphate dehydrogenase gene." DNA Cell Biol **17**(3): 283-91.
- Hunt, D. F., J. R. Yates, 3rd, et al. (1986). "Protein sequencing by tandem mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(17): 6233-7.
- Inger Ljungström, H. P., Martha Schlichtherle, Artur Scherf, Mats Wahlgren (2004). "METHODS IN MALARIA RESEARCH. Fourth Edition. MR4 / ATCC".
- Ingram, V. M. (1956). "A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin." Nature **178**(4537): 792-4.
- Ipsaro, J. J., L. Huang, et al. (2009). "Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains." Blood **113**(22): 5385-93.
- Ishii, T., E. Tatsuda, et al. (2003). "Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." Biochemistry **42**(12): 3474-80.
- Jana, C. K., N. Das, et al. (2002). "Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat." Arch Biochem Biophys **397**(2): 433-9.
- Jenner, P. (2003). "Oxidative stress in Parkinson's disease." Ann Neurol **53 Suppl 3**: S26-36; discussion S36-8.
- Jensen., J. B. (2002). *In vitro* culture of *Plasmodium falciparum* parasites. Malaria Methods and protocols. D. L. D. Malaria. Baltimore, Humana Press Inc. **I**: 650.
- Jia, C., W. Qi, et al. (2006). "Multi-stage collisionally-activated decomposition in an ion trap for identification of sequences, structures and bn --> bn-1 fragmentation pathways of protonated cyclic peptides." Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng) **12**(4): 235-45.
- Johnson, J. B., W. Summer, et al. (2007). "Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma." Free Radic Biol Med **42**(5): 665-74.
- Johnson, R. S., S. A. Martin, et al. (1987). "Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine." Anal Chem **59**(21): 2621-5.
- Joziase, D. H. (1992). "Mammalian glycosyltransferases: genomic organization and protein structure." Glycobiology **2**(4): 271-7.
- Kaestner, L. and I. Bernhardt (2002). "Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance." Bioelectrochemistry **55**(1-2): 71-4.
- Kakhniashvili, D. G., L. A. Bulla, Jr., et al. (2004). "The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **3**(5): 501-9.

- Kakhniashvili, D. G., N. B. Griko, et al. (2005). "The proteomics of sickle cell disease: profiling of erythrocyte membrane proteins by 2D-DIGE and tandem mass spectrometry." Exp Biol Med (Maywood) **230**(11): 787-92.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal Chem **60**(20): 2299-301.
- Karnchanaphanurach, P., R. Mirchev, et al. (2009). "C3b deposition on human erythrocytes induces the formation of a membrane skeleton-linked protein complex." J Clin Invest **119**(4): 788-801.
- Keyse, S. M. (2000). Stress response : methods and protocols. Totowa, NJ, Humana Press.
- Kinter, M. and N. E. Sherman (2000). Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. New York, John Wiley.
- Kirk, K. (2001). "Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte." Physiol Rev **81**(2): 495-537.
- Kolakovich, K. A., I. Y. Gluzman, et al. (1997). "Generation of hemoglobin peptides in the acidic digestive vacuole of *Plasmodium falciparum* implicates peptide transport in amino acid production." Mol Biochem Parasitol **87**(2): 123-35.
- Kriebardis, A. G., M. H. Antonelou, et al. (2006). "Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 279-82.
- Krugliak, M. and H. Ginsburg (2006). "The evolution of the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*--infected erythrocytes--a kinetic analysis." Exp Parasitol **114**(4): 253-8.
- Kruman, I., A. J. Bruce-Keller, et al. (1997). "Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis." J Neurosci **17**(13): 5089-100.
- Krych-Goldberg, M., J. M. Moulds, et al. (2002). "Human complement receptor type 1 (CR1) binds to a major malarial adhesin." Trends Mol Med **8**(11): 531-7.
- Kutner, S., W. V. Breuer, et al. (1985). "Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development." J Cell Physiol **125**(3): 521-7.
- Kwiatkowski, D. (1990). "Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria." Immunol Lett **25**(1-3): 213-6.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Laine, R. A. and J. S. Rush (1988). "Chemistry of human erythrocyte polylectosamine glycopeptides (erythroglycans) as related to ABH blood group antigenic determinants." Adv Exp Med Biol **228**: 331-47.
- Lambros, C. and J. P. Vanderberg (1979). "Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture." J Parasitol **65**(3): 418-20.
- Landsteiner, K. (1900). "Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe." Zentralblatt Bakteriologie (27): 357-62.
- Lanzillotti, R. and T. L. Coetzer (2006). "The 10 kDa domain of human erythrocyte protein 4.1 binds the *Plasmodium falciparum* EBA-181 protein." Malar J **5**: 100.

- Lebba, M. (2008). Giemsa staining of thick or thin blood films. Methods in Malaria Research. I. L. Kirsten Moll, Hedvig Perlmann, artur Scherf and Mats Wahlgren. Manassas (Virginia, USA) and Paris (France), Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4) American Type Culture Collection.
- Levine, R. L., N. Wehr, et al. (2000). "Determination of carbonyl groups in oxidized proteins." Methods Mol Biol **99**: 15-24.
- Levine, R. L., J. A. Williams, et al. (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **233**: 346-57.
- Li, X., H. Chen, et al. (2008). "A Presenilin-like protease associated with *Plasmodium falciparum* micronemes is involved in erythrocyte invasion." Mol Biochem Parasitol **158**(1): 22-31.
- Liu, S. C. and L. H. Derick (1992). "Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: structure-function relationships." Semin Hematol **29**(4): 231-43.
- Loscertales, M. P., S. Owens, et al. (2007). "ABO blood group phenotypes and *Plasmodium falciparum* malaria: unlocking a pivotal mechanism." Adv Parasitol **65**: 1-50.
- Lublin, D. M. (2005). "Review: Cromer and DAF: role in health and disease." Immunohematology **21**(2): 39-47.
- Luchavez, J., F. Espino, et al. (2008). "Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines." Emerg Infect Dis **14**(5): 811-3.
- Madian, A. G. and F. E. Regnier (2010). "Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites." J Proteome Res **9**(8): 3766-80.
- Magowan, C., W. Nunomura, et al. (2000). "*Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane." Biochim Biophys Acta **1502**(3): 461-70.
- Maier, A. G., B. M. Cooke, et al. (2009). "Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte." Nat Rev Microbiol **7**(5): 341-54.
- Maier, A. G., M. Rug, et al. (2008). "Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes." Cell **134**(1): 48-61.
- Manfredini, V., L. L. Lazzaretti, et al. (2008). "Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state." J Natl Med Assoc **100**(8): 897-902.
- Mann, M., R. C. Hendrickson, et al. (2001). "Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry." Annu Rev Biochem **70**: 437-73.
- Manno, S., Y. Takakuwa, et al. (2005). "Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation." J Biol Chem **280**(9): 7581-7.
- Manno, S., Y. Takakuwa, et al. (1995). "Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation." J Biol Chem **270**(10): 5659-65.
- Mannu, F., P. Arese, et al. (1995). "Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes." Blood **86**(5): 2014-20.
- Margetis, P. I., M. H. Antonelou, et al. (2009). "Increased protein carbonylation of red blood cell membrane in diabetic retinopathy." Exp Mol Pathol **87**(1): 76-82.

- Marinkovic, D., X. Zhang, et al. (2007). "Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis." J Clin Invest **117**(8): 2133-44.
- Marti, M., R. T. Good, et al. (2004). "Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte." Science **306**(5703): 1930-3.
- Mason, P. J., J. M. Bautista, et al. (2007). "G6PD deficiency: the genotype-phenotype association." Blood Rev **21**(5): 267-83.
- May, J., C. G. Meyer, et al. (2000). "Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase status and pyruvate kinase activity in a Nigerian population." Trop Med Int Health **5**(2): 119-23.
- Merker, K. and T. Grune (2000). "Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence." Exp Gerontol **35**(6-7): 779-86.
- Min-Oo, G. and P. Gros (2005). "Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect." Cell Microbiol **7**(6): 753-63.
- Mirzaei, H. and F. Regnier (2005). "Affinity chromatographic selection of carbonylated proteins followed by identification of oxidation sites using tandem mass spectrometry." Anal Chem **77**(8): 2386-92.
- Mirzaei, H. and F. Regnier (2006). "Enrichment of carbonylated peptides using Girard P reagent and strong cation exchange chromatography." Anal Chem **78**(3): 770-8.
- Modiano, G., G. Morpurgo, et al. (1991). "Protection against malaria morbidity: near-fixation of the alpha-thalassemia gene in a Nepalese population." Am J Hum Genet **48**(2): 390-7.
- Mohandas, N. and P. G. Gallagher (2008). "Red cell membrane: past, present, and future." Blood **112**(10): 3939-48.
- Muller, S. (2004). "Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Mol Microbiol **53**(5): 1291-305.
- Murphy, S. C., S. Fernandez-Pol, et al. (2007). "Cytoplasmic remodeling of erythrocyte raft lipids during infection by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Blood **110**(6): 2132-9.
- Murphy, S. C., B. U. Samuel, et al. (2004). "Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection." Blood **103**(5): 1920-8.
- Musatov, A., C. A. Carroll, et al. (2002). "Identification of bovine heart cytochrome c oxidase subunits modified by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal." Biochemistry **41**(25): 8212-20.
- Nadkarni, D. V. and L. M. Sayre (1995). "Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal." Chem Res Toxicol **8**(2): 284-91.
- Niessen, W. M. (2003). "Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening." J Chromatogr A **1000**(1-2): 413-36.
- Nogueira, F., A. Diez, et al. (2010). "Early transcriptional response to chloroquine of the *Plasmodium falciparum* antioxidant defence in sensitive and resistant clones." Acta Trop **114**(2): 109-15.
- Nystrom, T. (2005). "Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence." Embo J **24**(7): 1311-7.

- O'Brien, E., B. Kurdi-Haidar, et al. (1994). "Cloning of the glucose 6-phosphate dehydrogenase gene from *Plasmodium falciparum*." Mol Biochem Parasitol **64**(2): 313-26.
- O'Neill, P. M., V. E. Barton, et al. (2010). "The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues." Molecules **15**(3): 1705-21.
- Ockenhouse, C. F., T. Tegoshi, et al. (1992). "Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1." J Exp Med **176**(4): 1183-9.
- Ofulla, A. V., V. C. Okoye, et al. (1993). "Cultivation of *Plasmodium falciparum* parasites in a serum-free medium." Am J Trop Med Hyg **49**(3): 335-40.
- Omodeo-Sale, F., A. Motti, et al. (2003). "Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*." Blood **102**(2): 705-11.
- Oriol, R. (1990). "Genetic control of the fucosylation of ABH precursor chains. Evidence for new epistatic interactions in different cells and tissues." J Immunogenet **17**(4-5): 235-45.
- Oriol, R., J. Le Pendu, et al. (1986). "Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens." Vox Sang **51**(3): 161-71.
- Paizs, B. and S. Suhai (2005). "Fragmentation pathways of protonated peptides." Mass Spectrometry Reviews **24**(4): 508-48.
- Pandey, A. V., H. Bisht, et al. (2001). "Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine." Biochem J **355**(Pt 2): 333-8.
- Pannell, L. K., Q. L. Pu, et al. (1990). "Fragment pathway analysis using automated tandem mass spectrometry on an ion-trap mass spectrometer." Rapid Commun Mass Spectrom **4**(4): 103-7.
- Pantaleo, A., G. Giribaldi, et al. (2008). "Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions." Autoimmun Rev **7**(6): 457-62.
- Pasini, E. M., M. Kirkegaard, et al. (2006). "In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells." Blood **108**(3): 791-801.
- Pasini, E. M., H. U. Lutz, et al. (2010). "Red blood cell (RBC) membrane proteomics--Part I: Proteomics and RBC physiology." J Proteomics **73**(3): 403-20.
- Pasini, E. M., H. U. Lutz, et al. (2010). "Red blood cell (RBC) membrane proteomics--Part II: Comparative proteomics and RBC patho-physiology." J Proteomics **73**(3): 421-35.
- Patarroyo, M. E. and M. A. Patarroyo (2008). "Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines." Acc Chem Res **41**(3): 377-86.
- Pathirana, S. L., H. K. Alles, et al. (2005). "ABO-blood-group types and protection against severe, *Plasmodium falciparum* malaria." Ann Trop Med Parasitol **99**(2): 119-24.
- Pauling, L., H. A. Itano, et al. (1949). "Sickle cell anemia, a molecular disease." Science **109**(2835): 443.
- Perrotta, S., P. G. Gallagher, et al. (2008). "Hereditary spherocytosis." Lancet **372**(9647): 1411-26.

- Poli, G., E. Chiarpotto, et al. (1985). "Carbon tetrachloride-induced inhibition of hepatocyte lipoprotein secretion: functional impairment of Golgi apparatus in the early phases of such injury." Life Sci **36**(6): 533-9.
- Radfar, A., A. Diez, et al. (2008). "Chloroquine mediates specific proteome oxidative damage across the erythrocytic cycle of resistant *Plasmodium falciparum*." Free Radic Biol Med.
- Ramasamy, M. S., R. Kulasekera, et al. (1997). "Interactions of human malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *P.falciparum*, with the midgut of *Anopheles* mosquitoes." Med Vet Entomol **11**(3): 290-6.
- Rauniyar, N., S. M. Stevens, et al. (2009). "Characterization of 4-hydroxy-2-nonenal-modified peptides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using data-dependent acquisition: neutral loss-driven MS3 versus neutral loss-driven electron capture dissociation." Anal Chem **81**(2): 782-9.
- Raventos-Suarez, C. (1985). "*Plasmodium falciparum*: invasion and development in highly parasitized cultures." In vitro Cell Dev. Biol. **21**(3 Pt 1): 161-4.
- Reed, M. B., K. J. Saliba, et al. (2000). "Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*." Nature **403**(6772): 906-9.
- Reilly, H. B., H. Wang, et al. (2007). "Quantitative dissection of clone-specific growth rates in cultured malaria parasites." Int J Parasitol **37**(14): 1599-607.
- Reverter-Branchat, G., E. Cabisco, et al. (2004). "Oxidative damage to specific proteins in replicative and chronological-aged *Saccharomyces cerevisiae*: common targets and prevention by calorie restriction." J Biol Chem **279**(30): 31983-9.
- Ribacke, U. (2008). Growing *Plasmodium falciparum* cultures at high parasitemia. . Methods in Malaria Research. I. L. Kirsten Moll, Hedvig Perlmann, artur Scherf and Mats Wahlgren. Manassas (Virginia, USA) and Paris (France), Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4) American Type Culture Collection: 8.
- Rivadeneira, E. M., M. Wasserman, et al. (1983). "Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients." J Protozool **30**(2): 367-70.
- Roe, M. R. and T. J. Griffin (2006). "Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: tools for studying biological response of proteins and proteomes." Proteomics **6**(17): 4678-87.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." Biomed Mass Spectrom **11**(11): 601.
- Roth, E., Jr. (1990). "*Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite." Blood Cells **16**(2-3): 453-60; discussion 461-6.
- Rouquier, S., J. B. Lowe, et al. (1995). "Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus." J Biol Chem **270**(9): 4632-9.
- Rowe, J. A., I. G. Handel, et al. (2007). "Blood group O protects against severe *Plasmodium falciparum* malaria through the mechanism of reduced rosetting." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(44): 17471-6.

- Rowe, J. A., J. M. Moulds, et al. (1997). "*P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1." Nature **388**(6639): 292-5.
- Ruwende, C., S. C. Khoo, et al. (1995). "Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria." Nature **376**(6537): 246-9.
- Saliba, K. J., H. A. Horner, et al. (1998). "Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." J Biol Chem **273**(17): 10190-5.
- Salzer, U. and R. Prohaska (2001). "Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts." Blood **97**(4): 1141-3.
- Samuel, B. U., N. Mohandas, et al. (2001). "The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection." J Biol Chem **276**(31): 29319-29.
- Satchwell, T. J., D. K. Shoemark, et al. (2009). "Protein 4.2: a complex linker." Blood Cells Mol Dis **42**(3): 201-10.
- Sayre, L. M., P. K. Arora, et al. (1993). "Pyrrole formation from 4-hydroxynonenal and primary amines." Chem Res Toxicol **6**(1): 19-22.
- Schlitzer, M. (2007). "Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development." ChemMedChem **2**(7): 944-86.
- Schneider, C., K. A. Tallman, et al. (2001). "Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals." J Biol Chem **276**(24): 20831-8.
- Schuster, F. L. (2002). "Cultivation of *Plasmodium* spp." Clin. Microbiol. Rev. **15**(3): 355-364.
- Senga, E., M. P. Loscertales, et al. (2007). "ABO blood group phenotypes influence parity specific immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Malawian women." Malar J **6**: 102.
- Shacter, E. (2000). "Protein oxidative damage." Methods Enzymol **319**: 428-36.
- Shacter, E. (2000). "Quantification and significance of protein oxidation in biological samples." Drug Metab Rev **32**(3-4): 307-26.
- Shanks, G. D., A. J. Oloo, et al. (2001). "A new primaquine analogue, tafenoquine (WR 238605), for prophylaxis against *Plasmodium falciparum* malaria." Clin Infect Dis **33**(12): 1968-74.
- Sherman, I. W. (1998). Malaria : parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington, DC, ASM Press.
- Sherman, I. W., S. Eda, et al. (2003). "Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind." Microbes Infect **5**(10): 897-909.
- Sim, B. K., C. E. Chitnis, et al. (1994). "Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*." Science **264**(5167): 1941-4.
- Singh, K., A. Agarwal, et al. (2007). "Growth, drug susceptibility, and gene expression profiling of *Plasmodium falciparum* cultured in medium supplemented with human serum or lipid-rich bovine serum albumin [corrected]." J Biomol Screen **12**(8): 1109-14.

- Skorokhod, A., E. Schwarzer, et al. (2007). "HNE produced by the malaria parasite *Plasmodium falciparum* generates HNE-protein adducts and decreases erythrocyte deformability." Redox Rep **12**(1): 73-5.
- Sodeinde, O., J. L. Clarke, et al. (2003). "Expression of *Plasmodium falciparum* G6PD-6PGL in laboratory parasites and in patient isolates in G6PD-deficient and normal Nigerian children." Br J Haematol **122**(4): 662-8.
- Soreghan, B. A., F. Yang, et al. (2003). "High-throughput proteomic-based identification of oxidatively induced protein carbonylation in mouse brain." Pharm Res **20**(11): 1713-20.
- Spycher, C., M. Rug, et al. (2008). "The Maurer's cleft protein MAHRP1 is essential for trafficking of PfEMP1 to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." Mol Microbiol **68**(5): 1300-14.
- Srivastava, K., S. Singh, et al. (2007). "*In vitro* cultivation of *Plasmodium falciparum*: studies with modified medium supplemented with ALBUMAX II and various animal sera." Exp Parasitol **116**(2): 171-4.
- Stadtman, E. R. and B. S. Berlett (1997). "Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease." Chem Res Toxicol **10**(5): 485-94.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2003). "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins." Amino Acids **25**(3-4): 207-18.
- Steen, H. and M. Mann (2004). "The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(9): 699-711.
- Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." Physiol Rev **84**(4): 1381-478.
- Storey, K. B. and J. M. Storey (2000). Environmental stressors and gene responses. Amsterdam ; New York, Elsevier.
- Storey, K. B. and J. M. Storey (2001). Protein adaptations and signal transduction. Amsterdam ; New York, Elsevier.
- Su, Y., Y. Ding, et al. (2006). "Associations of protein 4.2 with band 3 and ankyrin." Mol Cell Biochem **289**(1-2): 159-66.
- Suzuki, Y. J., M. Carini, et al. (2009). "Protein carbonylation." Antioxid Redox Signal **12**(3): 323-5.
- Tanito, M., H. Haniu, et al. (2006). "Identification of 4-hydroxynonenal-modified retinal proteins induced by photooxidative stress prior to retinal degeneration." Free Radic Biol Med **41**(12): 1847-59.
- Tanner, M. J. (1993). "Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1)." Semin Hematol **30**(1): 34-57.
- Tarpey, M. M. and I. Fridovich (2001). "Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite." Circ Res **89**(3): 224-36.
- Trager, W. and J. B. Jensen (1976). "Human malaria parasites in continuous culture." Science **193**(4254): 673-675.
- Trager, W. and J. B. Jensen (1997). "Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: its impact on malaria research." Int. J. Parasitol. **27**(9): 989-1006.

- Treutiger, C. J., A. Hedding, et al. (1997). "PECAM-1/CD31, an endothelial receptor for binding *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." Nat Med **3**(12): 1405-8.
- Tripathi, A. K., D. J. Sullivan, et al. (2007). "*Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes decrease the integrity of human blood-brain barrier endothelial cell monolayers." J Infect Dis **195**(7): 942-50.
- Twyman, R. M. (2004). Principles of proteomics. New York, BIOS Scientific Publishers.
- Uchida, K. (2003). "4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress." Progress in Lipid Research **42**(4): 318-43.
- Uchida, K., Y. Hasui, et al. (1997). "Covalent attachment of 4-hydroxy-2-nonenal to erythrocyte proteins." Journal of Biochemistry **122**(6): 1246-51.
- Uchida, K. and E. R. Stadtman (1992). "Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4544-8.
- Uchida, K., L. I. Szveda, et al. (1993). "Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8742-6.
- Udomsangpetch, R., P. H. Reinhardt, et al. (1997). "Promiscuity of clinical *Plasmodium falciparum* isolates for multiple adhesion molecules under flow conditions." J Immunol **158**(9): 4358-64.
- Usanga, E. A., U. Bienzle, et al. (1977). "Genetic variants of human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: new variants in West Africa characterized by column chromatography." Ann Hum Genet **40**(3): 279-86.
- van Ooij, C. and K. Haldar (2007). "Protein export from *Plasmodium* parasites." Cell Microbiol **9**(3): 573-82.
- Varki, A. (2009). Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vince, J. W. and R. A. Reithmeier (1998). "Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte C1-/HCO₃⁻ exchanger." J Biol Chem **273**(43): 28430-7.
- Vincensini, L., S. Richert, et al. (2005). "Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell." Mol Cell Proteomics **4**(4): 582-93.
- von Decastello A, S. A. (1910). "Ueber die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen." Mfinch med Wschr (49): 1090-5.
- Vulliamy, T. J., J. S. Kaeda, et al. (1998). "Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and a single new mutation causing chronic nonspherocytic haemolytic anaemia." Br J Haematol **101**(4): 670-5.
- Wagner, M. A., B. Andemariam, et al. (2003). "A two-compartment model of osmotic lysis in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes." Biophys J **84**(1): 116-23.
- Wahlgren, M., K. Berzins, et al. (1983). "Characterization of the humoral immune response in *Plasmodium falciparum* malaria. I. Estimation of antibodies to *P. falciparum* or human erythrocytes by means of microELISA." Clinical and Experimental Immunology **54**(1): 127-34.

- Waller, K. L., W. Nunomura, et al. (2003). "Mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum* binds to the 30-kDa domain of protein 4.1 in malaria-infected red blood cells." Blood **102**(5): 1911-4.
- Waller, K. L., L. M. Stubberfield, et al. (2010). "Interaction of the exported malaria protein Pf332 with the red blood cell membrane skeleton." Biochim Biophys Acta **1798**(5): 861-871.
- Waller, K. L., L. M. Stubberfield, et al. (2007). "Interactions of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 with the red blood cell membrane skeleton." Biochim Biophys Acta **1768**(9): 2145-56.
- Watkins, W. M. (1980). "Biochemistry and Genetics of the ABO, Lewis, and P blood group systems." Adv Hum Genet **10**: 1-136, 379-85.
- White, N. J. (2004). "Antimalarial drug resistance." J Clin Invest **113**(8): 1084-92.
- White, N. J. (2008). "Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite." Clin Infect Dis **46**(2): 172-3.
- Whittal, R. M. and L. Li (1995). "High-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization in a linear time-of-flight mass spectrometer." Anal Chem **67**(13): 1950-4.
- WHO/OMS. (2000). "Millennium Development Goals (MDGs)", from http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/diseases/en/index.html.
- WHO/OMS. (2006). "Malaria." from <http://www.who.int/mediacentre/events/2006/g8summit/malaria/es/index.html>.
- WHO/OMS. (2009). "10 datos sobre el paludismo." from http://www.who.int/features/factfiles/malaria/malaria_facts/es/index1.html.
- WHO/OMS. (2010). "Initiative for Vaccine Research (IVR)." from http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index4.html.
- Wilm, M., A. Shevchenko, et al. (1996). "Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry." Nature **379**(6564): 466-9.
- Wong, C. M., A. K. Cheema, et al. (2008). "Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling." Circ Res **102**(3): 310-8.
- Wong, C. M., L. Marcocci, et al. (2009). "Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation." Antioxid Redox Signal **12**(3): 393-404.
- World Health Organization.; Aregawi, M.; Cibulskis, R. E.; Otten, M.; Williams, R.; WHO Global Malaria Programme. Surveillance Monitoring and Evaluation Unit., World malaria report 2009. World Health Organization: Geneva, 2009; p x, 190 p.
- Wright, A. D., H. Wang, et al. (2001). "Inhibition of heme detoxification processes underlies the antimalarial activity of terpene isonitrile compounds from marine sponges." J Med Chem **44**(6): 873-85.
- Wu, Y. and A. Craig (2006). "Comparative proteomic analysis of metabolically labelled proteins from *Plasmodium falciparum* isolates with different adhesion properties." Malar J **5**: 67.
- Wu, Y., M. M. Nelson, et al. (2009). "Identification of phosphorylated proteins in erythrocytes infected by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Malar J **8**: 105.

- Yang, T., P. Zhong, et al. (2006). "Preparation and identification of anti-2, 4-dinitrophenyl monoclonal antibodies." J Immunol Methods **313**(1-2): 20-8.
- Yang, Y. H., K. Lee, et al. (2009). "Low mass cutoff evasion with q(z) value optimization in ion trap." Anal Biochem **387**(1): 133-5.
- Yawata, Y. (2003). Cell Membrane. The Red Blood Cell as a Model. Darmstadt, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Yoo, M. S., H. S. Chun, et al. (2003). "Oxidative stress regulated genes in nigral dopaminergic neuronal cells: correlation with the known pathology in Parkinson's disease." Brain Res Mol Brain Res **110**(1): 76-84.
- Zhang, Z. and J. S. McElvain (2000). "De novo peptide sequencing by two-dimensional fragment correlation mass spectrometry." Anal Chem **72**(11): 2337-50.
- Ziady, A. G. and M. Kinter (2009). "Protein sequencing with tandem mass spectrometry." Methods Mol Biol **544**: 325-41.
- Zolg, J. W., A. J. Macleod, et al. (1984). "The accumulation of lactic acid and its influence on the growth of *Plasmodium falciparum* in synchronized cultures." In vitro **20**(3 Pt 1): 205-15.