

**Ramira Yuri Ribeiro**

**Papel das quinases PfPK7, PfNEK2, PfNEK3, PfMAP1 e PfeIK1  
na transdução de sinal de melatonina no desenvolvimento  
do ciclo celular intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2010

Ramira Yuri Ribeiro

Papel das quinases PfPK7, PfNEK2, PfNEK3, PfMAP1 e PfeIK1 na transdução de sinal de melatonina no desenvolvimento do ciclo celular intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Parasitologia

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina da Silva Garcia

São Paulo  
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA (VERSO DA PÁG ANTERIOR)**

# FOLHA DE APROVAÇÃO



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

---

**Of.CEPSH.185.09**

PMAZ/mcgn

São Paulo, 18 de agosto de 2009.

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 97ª reunião realizada em 18.08.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Uso de linhagens nocaute na caracterização do papel das quinases na transdução de sinal da melatonina em Plasmodium falciparum"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi considerado *isento por não existir manipulação diretamente com seres humanos*.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma Sra.  
Ramira Yuri Ribeiro  
Departamento de Parasitologia  
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Regina da Silva Garcia pela oportunidade oferecida e acolhimento em seu laboratório, pelas discussões e credibilidade ao me oferecer um projeto tão interessante e desafiador.

Aos colegas e amigos de laboratório por todo ensinamento, paciência e momentos de descontração ao longo do mestrado: Dr. Dario Passos, Dr<sup>a</sup>. Laura Cruz, Dr. Piero Bagnaresi, Dr. Robson Sartorello, Dr<sup>a</sup>. Wania Lima, Eduardo Alves, Márcio Lima e Dr<sup>a</sup>. Myna Nakabashi. Em especial Msc Desireé Schuck, pelo auxílio nos experimentos de citometria, Fernanda Koyama e Dr<sup>a</sup>. Miriam Moraes, por toda a ajuda ao longo do mestrado, Dr. Júlio Garcia e Alexandre Budu, pelo auxílio nos experimentos de cálculo.

Ao Prof. Christian Doerig pelos nocautes de *P. falciparum* testados neste trabalho.

A toda minha família, em especial aos meus pais, sempre apoiando e dando força, não só em relação ao mestrado, mas em diversos outros aspectos importantes da minha vida.

Aos novos amigos, ao Eduardo, e, ao Marco Antônio que participou de minha vida em momentos tão especiais e dolorosos nestes oito anos de convivência.

Aos amigos afastados pela distância, mas sempre presentes no pensamento, no coração e algumas conversas por telefone. Ao Tadao, sempre prestativo, pela amizade, convivência, conversas, ajudas e caronas.

Ao Lucas, por todo apoio, compreensão, pela paciência e por suportar meu estresse nos momentos difíceis; além dos bons momentos que renovam a energia e fortalecem o espírito.

Ao Departamento de Parasitologia-ICB pela oportunidade.

A CAPES e ao departamento pela bolsa cedida durante a execução deste trabalho.

E ao Serviço de Hemoterapia do Hospital do Servidor Público pelas bolsas de sangue e plasma gentilmente cedidas ao nosso laboratório para execução de todos os trabalhos.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

Ribeiro RY. Papel das quinases PfPK7, PfNEK2, PfNEK3, PfMAP1 e PfeIK1 na transdução de sinal de melatonina no desenvolvimento do ciclo celular intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A melatonina modula o ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*, parasita da malária, promovendo uma sincronização para estágios tardios do parasita. Esta modulação é dependente do aumento da concentração citosólica de cálcio a partir de estoques intracelulares, e também de AMPc com consequente ativação da PKA. Uma vez que modificações pós-traducionais participam efetivamente de vias de sinalização, averiguamos o papel de cinco quinases do *Plasmodium* (PfPK7, PfNEK2, PfNEK3, PfMAP1 e PfeIK1) na modulação de ciclo intraeritrocítico em resposta a melatonina e derivados do triptofano. Foram realizadas análises da progressão do ciclo após incubação durante 24 horas com melatonina, N-acetilserotonina, triptamina e serotonina, para cada uma das quinases nocauteadas, através de contagens em esfregaços e análises por citometria de fluxo. Parasitas nocautes para os genes *pfpk7* e *pfeik1* perdem a capacidade de modulação de fases intraeritrocíticas após tratamento com o hormônio ou derivados quando comparados ao grupo controle parasitas selvagens tratados com as mesmas drogas. Análises comparativas em relação às células não tratadas com 1 $\mu$ M de melatonina nos mostraram que na cepa 3D7 selvagem observamos um aumento de no mínimo 23% em esquizontes enquanto que em parasitas nocautes para *pfeik1* houve um aumento de apenas 5,7% e em parasitas nocauteados para o gene *pkpk7* obtivemos redução de 34% em esquizontes. Por outro lado, parasitas deficientes para as proteínas PfNEK2, PfNEK3 e PfMAP1 apresentaram respostas similares ao parasita selvagem. Estes dados sugerem um envolvimento das quinases PfPK7 e PfeIK1 na via de transdução da melatonina para a modulação de ciclo em *Plasmodium falciparum*. Também foram realizados ensaios de medidas de cálcio intracelular para testar a capacidade dos parasitas *pfpk7* liberarem cálcio após estímulo com melatonina. Os resultados apontaram mais um ponto diferencial para o parasita nocauteado, que com o mesmo estímulo liberou uma quantidade menor de cálcio citosólico,

quando comparado ao parasita selvagem (52 nM para o parasita selvagem e 16 nM para os nocautes). Deste modo, nossos resultados ampliaram a compreensão sobre os mecanismos moleculares que regulam a resposta a melatonina, corroborando a hipótese da importância dos segundos mensageiros e de proteínas quinases para o controle do ciclo celular em *Plasmodium falciparum*.

**Palavras-chave:** *Plasmodium falciparum*. Melatonina. Quinases. PfPK7. PfNEK2. PfNEK3. PfMAP1. PfeIK1.



## ABSTRACT

Ribeiro RY. The role of the kinases PfPK7, PfNEK2, PfNEK3, PfMAP1 e PfeIK1 in signal transduction of melatonin in development of intraerythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum* [Master thesis (Parasitology)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Melatonin modulates intraerythrocytic cell cycle of *Plasmodium falciparum*, the malaria's parasite, promoting a synchrony of parasite late stages. This modulation is dependent of parasite cytosolic calcium rise from intracellular stocks as well as rise of cAMP concentration which activates PKA. Since post translational modifications participates actually in signaling pathways we analyzed the role of five kinases (PfPK7, PfNEK2, PfNEK3, PfMAP1 and PfeIK1) in intraerythrocytic cell cycle modulation in response to melatonin and tryptophan derivatives. We analyzed the intraerythrocytic stages modulation after incubation for 24 hours with melatonin, N-acetylserotonin, tryptamine and serotonin for each one of the knocked out kinases through blood smears and flow cytometry analyzes. The pfpk7 and pfeik1 knock-outs were unable to modulate the intraerythrocytic cycle in response to melatonin when compared to the control parasites, wild type, treated with the same drugs. Comparative analysis of melatonin 1 $\mu$ M show that wild type 3D7 increase at least 23% schizont stages while the knock out pkeik1 increase only 5,7% and knock out pfpk7 reduced schizonts in 34%. However parasites deficient in proteins like PfNEK2, PfNEK3 and PfMAP1 showed similar responses to the wild type. This data suggest the involvement of the kinases PfPK7 and PfeIK1 in melatonin transduction for cell cycle modulation in *Plasmodium falciparum*. We also analyzed intracellular calcium measure assays to test the ability of parasites pfpk7 of releasing calcium after melatonin stimulus. pfpk7 diminished the ability of melatonin in rise cytosolic calcium concentration in comparison to the wild type (52 nM for the wild type and 16 nM for the knock out). Thus, our results expand the understanding about molecular mechanisms that regulate melatonin dependent cell cycle modulation, corroborating the hypothesis of the importance of cell second messengers and protein kinases for the *Plasmodium falciparum* cell cycle control.

**Key words:** *Plasmodium*. Melatonin. Kinases. PfPK7. PfNEK2. PfNEK3. PfMAP1. PfeIK1.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – adenilato ciclase  
ADP – adenosina difosfato  
ANOVA – análise de variância  
ATP – adenosina trifosfato  
Bapta/AM – 1,2-Bis(2-etano)aminofenoxy-N,N,N',N'-tetrakis tetraacetic (éster ácido acetometil)  
cAMP – adenosina monofosfato cíclico  
DG – diacilglicerol  
EGTA – *ethylene glycol tetraacetic acid*  
ER – retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)  
GPCR – receptor acoplado à proteína G (*G-protein coupled receptors*)  
GTP – guanosina trifosfato  
H89 – N-[2-(p-bromocinnamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida dihidroclorida  
IBMX – 3-isobutil-1-metylantina  
InsP<sub>3</sub> – inositol 1,4,5-trifosfato  
kDa – quilodalton (unidade de massa atômica)  
KO – nocaute (*knock out*)  
M – molar  
Mel – melatonina  
mg/mL – miligramas por mililitro  
MOPS – ácido 3-N-morfolino propanosulfônico  
OMS – organização mundial de saúde  
PBS – solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)  
PDE – fosfodiesterase  
Pf – *Plasmodium falciparum*  
pH – medida da acidez ou basicidade de uma solução  
PIP2 – fosfoinositol bifosfato  
PLC – fosfolipase C  
PQ – proteína quinase  
RNA – ácido ribonucléico  
RPMI – meio de cultura RPMI 1640  
SERCA – *sarco/endoplasmic reticulum ca<sup>2+</sup>-ATPase*  
UA – unidades arbitrárias  
UDP – uridina bifosfato  
UTP – uridina trifosfato  
WHO – *world health organization*  
m – mili  
μ – micro (10<sup>-6</sup>)  
n – nano (10<sup>-9</sup>)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Distribuição mundial da malária em 2008 .....	17
Figura 1.2- Mapa do risco de transmissão da malária nos estados brasileiros.....	18
Figura 1.3- Ciclo de vida do <i>Plasmodium ssp.</i> ....	20
Figura 1.4- Esquema da via de sinalização por melatonina em <i>Plasmodium</i> .....	30
Figura 1.5- Estudos de genética reversa em proteínas quinases de <i>P. falciparum</i> .....	32
Figura 1.6- Árvore filogenética da proteína quinase PfPK7 .....	38
Figura 1.7- Esquema ilustrativo das quinases de <i>Plasmodium</i> .....	39
Figura 4.1- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de <i>Plasmodium falciparum</i> em parasitas selvagens e parasitas nocaute para o gene <i>pfpk7</i> tratados com melatonina.....	50
Figura 4.2- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de <i>Plasmodium falciparum</i> em parasitas selvagens e parasitas nocaute para <i>pfpk7</i> complementados com o gene tratados com melatonina.....	53
Figura 4.3- Gráficos representativos de aumento de cálcio citosólico em resposta a melatonina .....	55
Figura 4.4- Aumento de concentração de cálcio citosólico causado por melatonina em cepa selvagem de <i>Plasmodium falciparum</i> , parasitas nocaute para o gene <i>pfpk7</i> e parasitas <i>pfpk7</i> <sup>-</sup> complementados com plasmídeo contendo o gene <i>pfpk7</i> .....	56
Figura 4.5- Gráfico dose-resposta de parasitas 3D7 <i>pfpk7</i> <sup>-</sup> estimulados com melatonina. ....	57
Figura 4.6- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de <i>Plasmodium falciparum</i> em parasitas selvagens e parasitas nocaute para o gene <i>pfnek2</i> tratados com melatonina.....	61
Figura 4.7- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de <i>Plasmodium falciparum</i> em parasitas selvagens e parasitas nocaute para o gene <i>pfnek3</i> tratados com melatonina.....	64
Figura 4.8- Análise de citometria de fluxo de cultura de eritrócitos parasitados com <i>Plasmodium falciparum</i> (cepa 3D7) sincronizados e marcados com YOYO-1. Populações enriquecidas com anel, trofozoíto e esquizonte .....	68
Figura 4.9- Análise de citometria de fluxo de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> (3D7) selvagens tratados com derivados de triptofano .....	69
Figura 4.10- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas jovens e tardias de <i>Plasmodium falciparum</i> em parasitas selvagens e parasitas nocaute para o gene <i>pfmap1</i> tratados com melatonina e outros derivados do triptofano .....	71
Figura 4.11- Análise de citometria de fluxo de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> nocaute para <i>pfmap1</i> tratados com derivados de triptofano.....	72

Figura 4.12- Análise de citometria de fluxo de eritrócitos infectados com *P. falciparum* nocaute para pfeik1 tratados com derivados de triptofano .....75

Figura 4.13- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de parasitas *P. falciparum* nocaute para pfeik1 tratados com melatonina e outros derivados do triptofano .....77

## LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de cepas 3D7 selvagem e pfpk7 <sup>-</sup> tratados com melatonina.....	49
Quadro 4.2- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de cepas 3D7 selvagem e nocaute para pfpk7 complementadas com o gene pfpk7 tratados com melatonina.....	52
Quadro 4.3- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de cepas 3D7 selvagem e pfnek2 <sup>-</sup> tratados com melatonina.....	60
Quadro 4.4- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de cepas 3D7 selvagem e pfnek3 <sup>-</sup> tratados com melatonina.....	63
Quadro 4.5- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de cepas 3D7 e pfmap1 <sup>-</sup> tratados com derivados do triptofano.....	70
Quadro 4.6- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de pfeik1 <sup>-</sup> tratados com derivados do triptofano.....	76
Quadro 6.1- Resumo dos efeitos das quinases nocauteadas na transdução de sinal do hormônio melatonina para modulação de ciclo intraeritrocítico de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	89

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Malária.....	15
1.2	Ciclo do <i>Plasmodium</i> .....	18
1.3	Sinalização celular.....	21
1.3.1	<i>Melatonina</i> .....	22
1.3.2	<i>Cálcio e a sinalização celular</i> .....	25
1.4	Proteínas Quinases .....	30
2	OBJETIVO.....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1	Manutenção de <i>P. falciparum</i> em cultura .....	41
3.2	Análise da modulação de ciclo intraeritrocítico .....	41
3.3	Sincronização, isolamento e marcação de parasitas .....	42
3.4	Citometria de fluxo .....	43
4	RESULTADOS.....	46
4.1	PfPK7, uma proteína quinase atípica com características de MAPKK e PKA de mamíferos, participa na modulação via melatonina do ciclo intraeritrocítico de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	46
4.2	PfPK7 modula o aumento de cálcio citosólico via melatonina em <i>P. falciparum</i> .....	54
4.3	As proteínas PfNEK2e PfNEK3, cujos homólogos em mamíferos controlam progressão do ciclo celular, não são fundamentais para a modulação via melatonina do ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> .....	58
4.4	A proteína PfMAP1, homóloga à MAPK de mamíferos, não é fundamental para a modulação por melatonina e derivados de triptofano do ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> .....	65
4.5	A proteína PfeIK1 é fundamental para a sincronização do ciclo de <i>P. falciparum</i> por algumas moléculas derivadas do triptofano .....	73
5	DISCUSSÃO .....	78
6	CONCLUSÕES .....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Malária

Doenças tropicais infecciosas, incluindo infecções por protozoários, helmintos, além de outras doenças tal como, anemia falciforme, foram recentemente classificadas pela Organização Mundial de Saúde como negligenciadas ou extremamente negligenciadas (Beyrer et al., 2006; Hotez et al., 2006). afetando regiões de extrema pobreza. A malária é um grave problema de saúde com mais de um milhão de mortes, as quais ocorrem principalmente entre crianças e mulheres grávidas na África sub-saariana (Snow et al., 2005; Greenwood, 2008).

O parasita da malária (gênero *Plasmodium*) é um eucarioto unicelular pertencente ao filo Apicomplexa e família Plasmodiidae. O filo apicomplexa é caracterizado pela presença de organelas chamadas micronemas e roptrias na membrana apical, e, estas estruturas desempenham um importante papel na invasão das células hospedeiras pelo parasita (Singh et al., 2010). Estima-se que haja ao menos 172 espécies deste parasita, 89 ocorrendo em répteis (Telford, 1994), 32 em aves (van Riper et al., 1994), e 51 em mamíferos (Collins e Aikawa, 1993). Quatro espécies infectam humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*, apenas o último não ocorrendo no Brasil. Recentemente foi encontrado um *Plasmodium* de símios infectando também humanos: *Plasmodium knowlesi* (Cox-Singh, 2009). *P. falciparum* e *P. vivax* são os principais causadores de infecções, onde *P. vivax* designa uma forma mais branda da doença enquanto que o *P. falciparum* desencadeia formas mais graves da doença, devido à multiplicação mais rápida dentro dos eritrócitos e, conseqüente destruição de maior número de hemácias, podendo assim levar à morte. A nova espécie infectante de humanos tem gravidade intermediária, apresentando-se menos severa que *P. falciparum*, no entanto, sendo mais grave que todas as outras (Kantele e Jokiranta, 2010).

O protozoário é transmitido por um inseto vetor pertencente à ordem díptera e ao gênero *Anopheles*. Este gênero possui cerca de 400 espécies, ocorrendo cerca de 60 no

Brasil. O principal vetor no Brasil é o *A.darlingi*, conhecido popularmente por muriçoca, mosquito-prego ou bicuda, possui comportamento extremamente antropofílico, distribuindo-se por todo o país, com exceção de regiões de elevada altitude, sertão nordestino e estado do Rio Grande do Sul. Procria-se em águas profundas, límpidas e de preferência sombreadas, possuindo atividade intensa nos períodos de alvorecer e crepúsculo, podendo também ter atividade noturna (Ministério da Saúde, 2009).

O quadro clínico da malária é caracterizado por febres altas podendo atingir 41 °C, sensações de calafrio, sudorese, cefaléia. Os sintomas ocorrem em padrões clínicos que variam de acordo com o ciclo de vida da espécie infectante. Em alguns casos podem ocorrer náuseas, vômitos, fadiga e anorexia (Ministério da Saúde, 2009).

Na década de 40, dois terços da população estavam expostos ao risco de infecção malárica. Deste modo, em 1955 a Organização Mundial da Saúde iniciou um programa de erradicação da endemia que diminuiu acirradamente os números da doença e interrompeu sua transmissão na maioria das regiões temperadas (Governo do Estado de São Paulo, 2010).

No ano de 2003 foram estimados entre 350 a 500 milhões de casos e mais de um milhão de mortes no mundo, atingindo principalmente crianças de até cinco anos de idade residentes na região africana. Dados estatísticos contam que, a cada 30 segundos, uma criança no mundo morre com a doença. Sabe-se que em 2006, cerca de 3,3 bilhões de pessoas viviam expostas em áreas de risco e, em 2007, nove milhões de crianças com menos de cinco anos morreram infectadas com malária. Apesar de ocorrer em 109 países do mundo, 35 deles são responsáveis pela maioria das mortes, e, destes, cinco (Nigéria, República Democrática do Congo, Uganda, Etiópia e Tanzânia) somam 50% do total de mortes e 47% do número de casos (Figura 1.1) (World Health Organization, 2009).



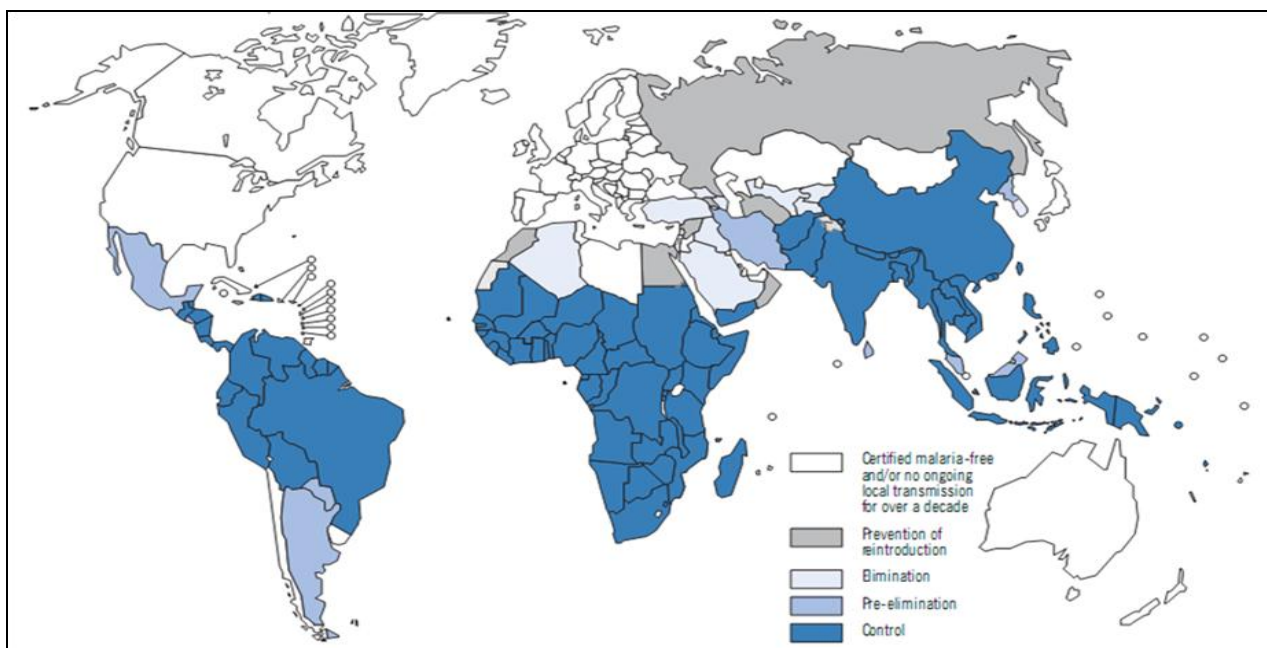


Figura1.1- Distribuição mundial da malária em 2008. Países em fase de controle, pré-eliminação, eliminação e prevenção de reintrodução da epidemia.  
 FONTE: Modificado de WHO(2009)

No Brasil, a malária também é um problema de grande relevância, respondendo por grande parte dos casos da América. A maioria deles se concentra na chamada Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins e responde por 99,8% dos casos brasileiros (Figura 1.2). A transmissão nestes locais está diretamente ligada à alta incidência de casos, condições ambientais favoráveis e questões socioculturais (Ministério da Saúde, 2007, 2008). Apesar do maior número de registros da doença pertencer à região amazônica, é na região extra-amazônica que se encontra o maior número de mortes por causa da doença, seja pelo diagnóstico tardio, seja pelo manejo clínico inadequado.

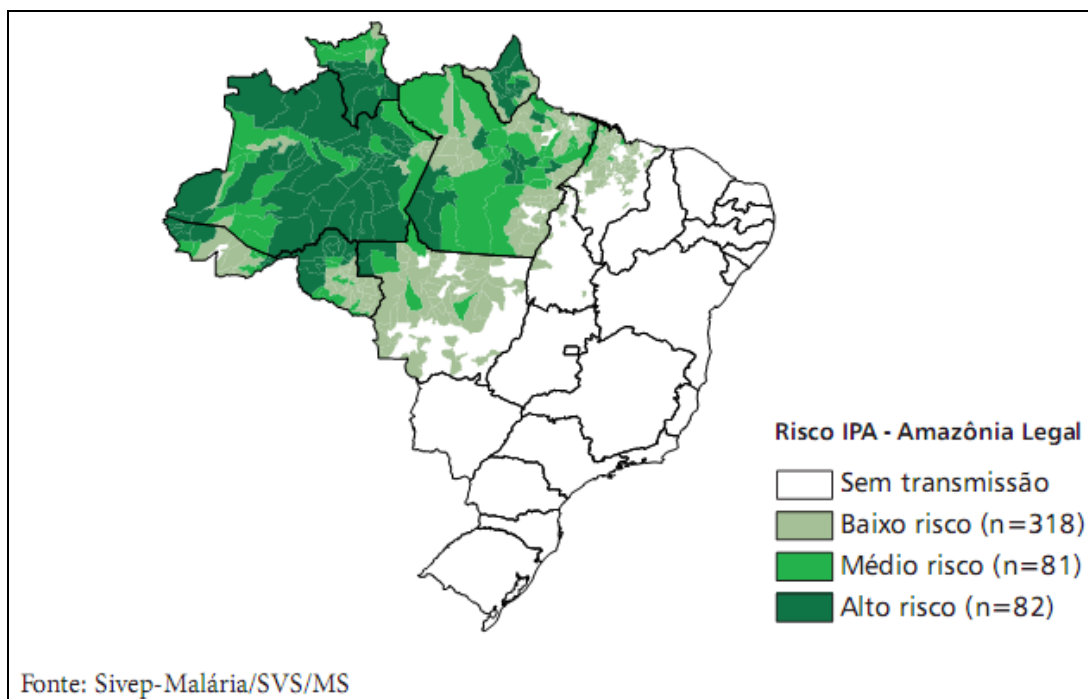


Figura 1.2- Mapa do risco de transmissão da malária nos estados brasileiros.

FONTE: Ministério da Saúde(2008).

### 1.2 Ciclo do *Plasmodium*

O ciclo da malária é didaticamente dividido em duas fases: a fase assexuada, que ocorre no hospedeiro intermediário vertebrado, e a fase sexuada, que se desenvolve no hospedeiro definitivo do parasita, o mosquito *Anopheles*.

O ciclo assexuado se inicia com a picada da fêmea anofelina, infectada com *Plasmodium*, em um indivíduo onde, através da saliva do mosquito, formas do parasita conhecidas por esporozoítos são inoculados na derme do hospedeiro, por onde migram até que atinjam algum vaso e, sequencialmente o fígado. Inicia-se a fase exoeritrocítica da infecção malárica, onde os esporozoítos invadem os hepatócitos e começam a reproduzir-se assexuadamente até que os merozoítos formados nos hepatócitos sejam liberados. Para obterem sucesso, estes merozoítos devem atravessar diversas barreiras esquivando-se de células defensivas do sistema imune, até que consigam atingir a corrente sanguínea. Com este intuito, os parasitas modificam os hepatócitos induzindo-os a apoptose para que não sinalizem o recrutamento de células fagocíticas (Sturm et al., 2006). Duas espécies de parasitas, *P.vivax* e *P.ovale*, podem desenvolver formas latentes, onde alguns indivíduos

permanecem nos hepatócitos num estado de dormência, tornando-se ativos após algum tempo e reiniciando o ciclo do parasita, são os chamados hipnozoítos (Westenberger et al., 2010 ; Rey, 1991; White, 1996).

Uma vez na corrente sanguínea, estes merozoítos precisam invadir os eritrócitos para dar continuação ao ciclo, iniciando a fase intraeritrocítica da infecção, devido a qual aparecem as manifestações clínicas da malária. Detalhes do complexo processo de invasão foram relatados por meio de imagens gravadas em cultura de *P.knowlesi* e eletromicroscopia de amostras fixadas (Dvorak et al., 1975; Bannister e Dluzewski, 1990). O processo de invasão dos eritrócitos pode então, ser dividido em sete fases: 1) adesão inicial; 2) contato entre o ápice do merozoíto e os eritrócitos, levando a formação da junção apical; 3) formação do vacúolo parasitóforo (PVM- *Parasitophorous Vacuole Membrane*); 4) movimento do merozoíto para dentro do PVM; 5) isolamento do parasita no PVM; 6) descarga de grânulos densos dentro do PVM; e, 7) transformação de merozoíto para o estágio de anel (Garcia et al., 2008).

O merozoíto pode aderir à célula a ser invadida de qualquer ponto do parasita; em seguida ocorre um rolamento do parasita pela superfície do eritrócito até que o ápice do parasita toque a célula hospedeira e esta inicie a invaginação da membrana, para onde o parasita migra antes de ser isolado dentro do eritrócito (Bannister e Mitchell, 2003; Garcia et al., 2008). Então, após a invasão, por meio de esquizogonia o parasita se desenvolve em três diferentes estágios de maturação: anel, trofozoíto e esquizonte, em ordem crescente de maturação. O esquizonte, que é o último estágio, se caracteriza por sucessivas divisões mitóticas, sem ocorrência de citocinese, contendo deste modo, os merozoítos que, com a ruptura do esquizonte, serão liberados na corrente sanguínea, reiniciando o ciclo intraeritrocítico (Bannister e Mitchell, 2003).

Por algum processo ainda não bem descrito, nem todos os merozoítos que invadem as células sanguíneas completam o ciclo e reiniciam uma nova invasão. Em um determinado momento do ciclo, alguns parasitas se desenvolvem em gametócitos femininos ou masculinos que, durante repasto sanguíneo de uma nova fêmea anofelina, serão ingeridos pelo inseto e, no intestino do invertebrado, darão início ao estágio sexuado de

desenvolvimento. No estômago do mosquito, após mudança de pH e de temperatura, os eritrócitos se rompem liberando assim os gametócitos neles contidos (Rey, 1991). Os gametócitos masculinos ou microgametócitos sofrerão modificações como a exflagelação, induzida pela queda na temperatura e por uma molécula sinalizadora do mosquito vetor, o ácido xanturênico (Billker et al., 1998), originando deste modo os gametas masculinos que irão fecundar os macrogametas, dando origem a um zigoto com mobilidade, chamado oocineto. O oocineto se desloca até a parede do intestino médio do mosquito, dando origem ao oocisto, que se dividirá, amadurecerá e se romperá liberando esporozoítos na hemocele do vetor. Estes esporozoítos migrarão para as glândulas salivares do mosquito, onde, numa próxima picada pela fêmea, serão liberados na derme, reiniciando o ciclo no hospedeiro intermediário (Figura 1.3) (Rey, 1991).

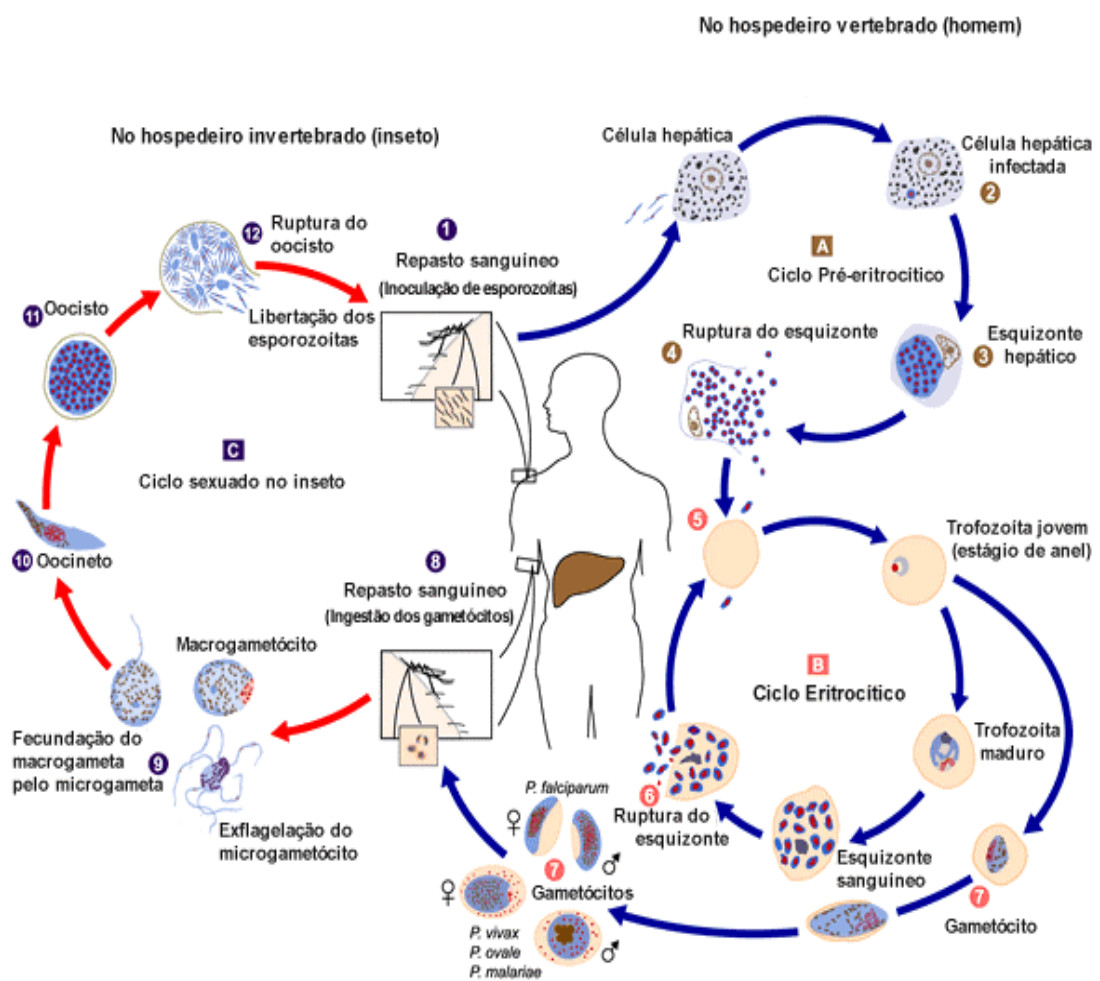


Figura 1.3- Ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

FONTE:Modificado de Centers for Disease Control & Prevention (2010)

### 1.3 Sinalização celular

Devido ao seu complexo ciclo de vida, o *Plasmodium* deve ser capaz de lidar com grandes variações ambientais, o que sugere mecanismos complexos de sinalização celular. O genoma de *Plasmodium* codifica para diversas moléculas sinalizadoras (Gardner et al., 2002), as quais permitem ao parasita interagir com a célula hospedeira e ajustar seu complexo ciclo de vida às mudanças ocasionadas pelas alterações nos hospedeiros vertebrados e mosquitos. Apesar de ser conhecido que *Plasmodium* pode utilizar proteína G do hospedeiro para sinalização celular (Harrison et al., 2003) e também que altera a fosforilação de proteínas do citoesqueleto de eritrócitos durante a infecção (Ward et al., 1994), as vias de sinalização do parasita permanecem pouco caracterizadas.

Em *P. falciparum* e *P. chabaudi*, os trabalhos de Hotta et al e Beraldo et al (Hotta et al., 2000; Beraldo e Garcia, 2005) já demonstraram que a melatonina, hormônio do hospedeiro vertebrado, é capaz de induzir mudanças no ciclo dos parasitas bem como uma liberação de cálcio de estoques intracelulares, sugerindo assim que o hormônio seja capaz de transpassar não só a membrana do eritrócito mas também do vacúolo parasitóforo, atingindo possíveis receptores de membrana para o hormônio.

Em *P. berghei* sabe-se que semelhante à melatonina, outro derivado do triptofano, o ácido xanturênico (XA), circulante no mosquito vetor, desencadeia efeitos no parasita sexuado, promovendo uma exflagelação dos microgametócitos e permitindo assim a fecundação dos gametas (Billker et al., 1998). Billker reportou que o XA circulante no mosquito vetor promove um aumento de cálcio citosólico livre em *P. berghei*, e este cálcio, através da quinase dependente de cálcio CDPK4 (*Calcium Dependent Protein Kinase 4*), promoverá a regulação do ciclo celular do gametócito masculino, uma vez que nocautes para CDPK4 não foram capazes de formar microgametócitos com os flagelos (Billker et al., 2004).

Sabe-se que receptores de sete domínios transmembrana (7-TM), também conhecidos por receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (apesar desta interação não ser uma regra) medeiam respostas a diversos estímulos, tais como hormônios, neurotransmissores, pequenos peptídeos, proteínas, lipídeos e íons e também estímulos sensoriais como luz,

feromônios, odores, sabores. Estas proteínas correspondem à maior classe de moléculas de superfície no genoma de mamíferos, e, de acordo com a idéia clássica, estes receptores serpentinos são acoplados a proteínas efetoras como adenilato e guanilato ciclases, fosfolipases A2 ou C e canais iônicos, desencadeando uma sinalização intracelular (Hall et al., 1999). Apesar da arquitetura 7-TM ser altamente conservada, estes receptores possuem membros altamente divergentes, compartilhando apenas 25% dos aminoácidos (Pierce et al., 2002). Recentemente nosso laboratório identificou quatro GPCRs putativos do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*, bem como seus respectivos homólogos em outras cinco espécies de *Plasmodium*: duas de primatas (*P. vivax* e *P. knowlesi*) e três de roedores (*P. berghei*, *P. yoelii* e *P. chabaudi*) (Madeira et al., 2008).

Deste modo, fica evidente que i) sinais extracelulares desencadeiam uma complexa via de sinalização intracelular no parasita possibilitando o desenvolvimento deste dentro dos eritrócitos, ii) determinados compostos lipofílicos tais como melatonina, podem atravessar as barreiras que separam o parasita do meio extracelular, iii) possivelmente a ativação da sinalização celular por melatonina em *Plasmodium* ocorre via receptores acoplados à proteína G (GPCRs), uma vez que o hormônio ativa a PLC e adenilato ciclase, com formação de  $Ca^{2+}$  e cAMP como segundos mensageiros.

### **1.3.1 Melatonina**

A melatonina é o principal hormônio produzido pela glândula pineal e possui padrões característicos de secreção sazonal e diária. Este tem uma larga escala de efeitos no organismo, como por exemplo, efeitos sobre o ritmo circadiano hipotalâmico, sobre o sistema imune e na própria retina, além de propriedades antioxidantes e capacidade de modular neurotransmissores (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

A glândula pineal é um componente do sistema endócrino que permite aos mamíferos responderem por mudanças diárias ou sazonais do fotoperíodo através de adaptações de seu estado fisiológico, como por exemplo, ativação/desativação do eixo reprodutivo de alguns animais, fenômeno no qual a ação da pineal e do hormônio melatonina são essenciais. Diversos estudos têm relatado que a glândula pineal é um

transdutor neuroendócrino que recebe da retina e do oscilador circadiano do sistema nervoso central (SNC), o núcleo supraquiasmático do hipotálamo, informações sobre o fotoperíodo transmitindo-a para o sistema reprodutor através de um padrão particular de secreção de melatonina (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Por meio do sinal de neurotransmissores do núcleo supraquiasmático, a glândula pineal é estimulada a secretar melatonina, fazendo deste hormônio um importante modulador do ciclo circadiano, visto que sua secreção é sincronizada com o ciclo claro/escuro (Simonneaux e Ribelayga, 2003). Este padrão de síntese ocorre em todas as espécies de vertebrados, independente dos hábitos diurnos, crepusculares ou noturnos, a única diferença é que a liberação do hormônio ocorre enquanto o animal repousa ou enquanto está em atividade. Em invertebrados, onde a glândula pineal é ausente, a síntese da melatonina ocorre em outros órgãos ou células. Esta produção extrapineal também ocorre em vertebrados. Em humanos, o hormônio melatonina é conhecido como promotor do sono (Reiter, 1993; Korf et al., 1998).

A síntese da mesma ocorre a partir do aminoácido triptofano, um aminoácido adquirido via alimentação. O triptofano captado da corrente sanguínea pelos pinealócitos é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5HTP) na mitocôndria da glândula pineal com o auxílio da enzima triptofano-hidroxilase. O 5-hidroxitriptofano é transformado em serotonina (5-hidroxitriptamina), que, sequencialmente, é modificada a N-acetilserotonina, catalisada pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT). Finalmente, a N-acetilserotonina é O-metilada e convertida a melatonina, por meio da enzima hidroxiindol-O-metiltransferase (HIOMT) (Korf et al., 1998; Hardeland et al., 2006).

Devido à característica lipofílica desta molécula, a melatonina não é estocada nos pinealócitos. Imediatamente após sua síntese, atravessa os capilares dos pinealócitos e cai diretamente na corrente sanguínea. Deste modo, a secreção de melatonina, depende exclusivamente de sua biossíntese (Korf et al., 1998). Algumas das funções de melatonina são executadas através de receptores, enquanto outras são independentes de receptores (Reiter et al., 2007; Tan et al., 2007).

Previamente pensava-se que a produção noturna da melatonina era devido a variações diárias na atividade da última enzima da via biossintético do hormônio, a HIOMT. No entanto, estudos subsequentes relataram que mudanças na síntese e liberação do hormônio estavam altamente relacionadas às mudanças na produção e viabilidade da N-acetilserotonina, sendo, no entanto, a enzima AA-NAT o fator chave produzido no escuro que viabiliza a síntese de melatonina. Em ratos, foi reportada uma atividade de 70 a 100 vezes maior durante a noite (Korf et al., 1998).

Além de vertebrados, também foi verificada a presença deste hormônio em invertebrados, em uma variedade de plantas (Dubbels et al., 1995), em protozoários como dinoflagelados (Hardeland et al., 1995), *Trypanossoma cruzi* (Macias et al., 1999) e no ciliado não patogênico *Tetrahymena pyriformis* (Kohidai et al., 2002), bactérias (Manchester et al., 1995) entre outros. O parasita *Trypanossoma cruzi* sintetiza melatonina e esta influencia diretamente no ciclo celular e habilidade na infecção do parasita (Macias et al., 1999). Há ainda, trabalhos com parasita de malária em galinhas, *Plasmodium cathemerium*, indicando a influencia do ciclo claro/escuro no ciclo do parasita (Boyd, 1929).

Já foi reportado que alguns parasitas da malária como *P. falciparum* e *P. chabaudi*, *in vivo*, desenvolvem-se de maneira bastante sincronizada, isto é, com a grande maioria de seus parasitas num mesmo estágio de desenvolvimento. Esta sincronia, *in vitro*, é rapidamente perdida, o que sugere uma colaboração do hospedeiro com algum possível sinal que induz a modulação do ciclo do parasita. O aparecimento simultâneo de bilhões de parasitas recém-liberados na corrente sanguínea parece ser uma característica da estratégia evolucionária de escape das defesas do sistema imune do hospedeiro (Hotta et al., 2000).

Dados de nosso laboratório demonstraram que em *P. chabaudi*, parasita de malária de roedores, foi verificado *in vitro* tanto a modulação do ciclo quanto a mobilização de cálcio de estoques intracelulares do parasita induzidos por melatonina. Experimentos *in vivo* com camundongos pinealectomizados demonstraram que a sincronia era perdida e recuperada à medida que os mesmos animais com a pineal retirada eram tratados com doses de melatonina. O mesmo efeito da pinealectomia foi obtido com o inibidor de receptores de melatonina (luzindol) (Hotta et al., 2000; Bagnaresi, 2009).



Nosso laboratório reportou ainda que, em *P. falciparum*, não só a melatonina, mas também outros derivados do triptofano, tais como N-acetilserotonina, serotonina e triptamina, são capazes de modular o ciclo do parasita, sincronizando-o. Tais compostos são ainda, capazes de mobilizar cálcio de estoques intracelulares do parasita no estágio trofozoíto, efeito que foi inibido com o uso de inibidor de fosfolipase C (PLC) (U73122) ou um antagonista competitivo pelo receptor de melatonina, luzindol. Melatonina não foi capaz de induzir liberação de cálcio em estágio de anel ou esquizonte (Beraldo e Garcia, 2005).

No mesmo trabalho foi testada a capacidade da melatonina em modular a invasão de *P. falciparum* em cultura sincronizada, onde parasitas no estágio esquizonte foram tratados com o hormônio resultando em um aumento na proporção de anéis em relação ao controle. O efeito foi bloqueado com o uso do inibidor de PLC, U73122, sugerindo a importância da ativação das vias de cálcio pela melatonina no processo de invasão do parasita (Beraldo e Garcia, 2005).

Os produtos do catabolismo do triptofano estão envolvidos na modulação de diversos processos fisiológicos de variados tipos de organismos (Balzer e Hardeland, 1991) por mudarem os níveis de segundos mensageiros intracelulares tais quais cAMP, InsP<sub>3</sub>, cGMP, DAG e cálcio (Beraldo e Garcia, 2005). Trabalhos reportaram que em melanócitos de *Xenopus* e hamster, melatonina promoveu agregação de pigmentos por meio do segundo mensageiro fosfoinositol e entrada do íon cálcio na célula (Messenger e Warner, 1977; Eison e Mullins, 1993).

### **1.3.2 Cálcio e a sinalização celular**

Íon mais abundante nos vertebrados, o cálcio está em sua maior parte armazenado nos ossos e na forma de hidroxapatita, nos dentes. Devido a sua extrema importância, há mecanismos de controle da concentração de cálcio nos fluidos corpóreos a fim de evitar riscos de carência do íon (Pozzan et al., 1994). Dois hormônios atuam de modo antagônico, controlando a mobilização de cálcio dos ossos, a excreção do íon pelos rins e a absorção pelo intestino: o hormônio paratireoidiano (PTH) e a calcitonina. O primeiro é responsável pela retenção e absorção do cálcio e o segundo favorece sua excreção. Além destes hormônios, a vitamina D3 também executa importante papel frente à absorção intestinal de cálcio.

Embora este íon esteja presente em grande quantidade na dieta alimentar, o organismo desenvolveu inúmeras maneiras de poder tirar proveito e controlar a concentração do mesmo, tamanha a importância deste para o desempenho de nosso metabolismo (Beraldo, 2001).

O cálcio exerce papel fundamental em diversos processos fisiológicos dentro de células eucarióticas tais como controle de secreção, metabolismo, contração, fototransdução, e proliferação celular (Berridge e Irvine, 1984). Este íon também é importante por se ligar a algumas proteínas, tais quais calbindinas, calmodulinas e proteínas da família das S100, regulando processos metabólicos cálcio dependentes e ativando assim muitas das atividades celulares (Beraldo, 2001). Devido a esta versatilidade de respostas, o cálcio pode atuar de diversas maneiras a fim de induzir diferentes respostas fisiológicas. Na junção sináptica, por exemplo, a liberação do íon ocorre em microsegundos, enquanto que em outros tipos de respostas tais quais transcrição gênica ou proliferação celular, o tempo de ação do cálcio varia de alguns minutos até horas (Berridge et al., 2003).

Os níveis de cálcio intracelular variam de acordo com o balanço entre as reações que introduzem o íon no citoplasma e as reações que fazem com que o mesmo seja removido, como por exemplo, pela ação combinada de tampões, bombas e trocadores de íons. Devido a esta particularidade, cada tipo de célula expressa um conjunto único de componentes para sinalização por cálcio, com diferentes propriedades espaciais e temporais. (Berridge et al., 2003). Além das diferentes atuações em diversos tipos celulares, há ainda variação no padrão de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  em diferentes regiões celulares, onde o aumento de cálcio no núcleo desencadeia efeitos diferentes do aumento do mesmo íon no citosol (Gomes, 2006).

Apesar de sua extrema importância, em altas concentrações citosólicas, ainda que por curtos períodos, o cálcio é extremamente tóxico, podendo causar a morte celular. Desta maneira, sua concentração citoplasmática deve ser fortemente regulada. A fim de manter esta concentração citosólica baixa, em torno de nM, as células eucarióticas desenvolveram um mecanismo de captação do íon que excede no citosol, sequestrando o cálcio e armazenando-o em compartimentos celulares ou eliminando-o pela membrana através de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e trocadores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Garcia, 1999). Outros dois mecanismos

de bombeamento podem resultar em uma diminuição da concentração de cálcio citosólico na célula: a bomba SERCA de retículos sarco-endoplasmáticos e transportadores mitocondriais (Berridge et al., 2003).

Os sinais de cálcio intracelular podem ser originados de duas maneiras. Vindo do meio extracelular, através de diversos canais de membranas e, com diferentes estímulos, como por exemplo, despolarização da membrana, estímulos nocivos, agonistas extracelulares, mensageiros intracelulares ou da depleção de estoques internos. A outra fonte do cálcio citoplasmático são os estoques internos que armazenam cálcio, onde a liberação de cálcio é controlada pela própria concentração do cálcio ou ainda através de segundos mensageiros celulares, tais como 1,4,5-inositol trifosfato (InsP<sub>3</sub>), ADP-ribose cíclica, ácido nicotínico adenina dinucleotídeo fosfato (NAADP), e esfingosina-1-fosfato (S1P) (Berridge et al., 2003).

Uma vez que o cálcio esteja desempenhando o papel de mensageiro intracelular com resposta sustentada frente a um estímulo extracelular, há duas maneiras distintas do estímulo se propagar da superfície ao interior celular: por meio de reações moduladas por calmodulina ou via quinase sensível ao cálcio, a PKC. Afirma-se que a primeira resposta é a maior responsável pela iniciação do estímulo, enquanto que a segunda desempenha o papel de sustentar a resposta, em células onde o estímulo por cálcio deve ser sustentado. A proteína quinase C é importante por proporcionar à célula um controle do processo de ativação celular, uma vez que a resposta sustentada de cálcio é dependente da PKC (Rasmussen et al., 1984).

Em parasitas da malária, sabe-se que uma alta concentração de cálcio extracelular é fundamental para a invasão do parasita e consequente desenvolvimento do mesmo, uma vez que a depleção extracelular do íon impede o desenvolvimento intraeritrocítico de *P. falciparum in vitro* (McCallum-Deighton e Holder, 1992; Wasserman e Chaparro, 1996). O interior dos eritrócitos, onde o parasita se desenvolve, possui uma concentração muito baixa de cálcio (inferior a 100 nM) em comparação à condição encontrada extracelularmente pela maioria das células (em torno de mM). Sabe-se se que a deficiência do íon é prejudicial não só à invasão de eritrócitos por merozoítos, mas também ao funcionamento e sobrevivência

dos parasitas intracelulares (Beraldo, 2001; Gazarini et al., 2003).

Em 2003, um importante dado de nosso laboratório decifrou o modo pelo qual o parasita resolve o problema das baixas concentrações de cálcio no interior dos eritrócitos. Sugere-se que na hora da invasão pode haver uma entrada de cálcio simultânea à entrada do parasita, além de um constante abastecimento deste íon por meio de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases contidas na membrana dos eritrócitos, de modo que ocorra um bombeamento de cálcio para o então formado vacúolo parasitóforo, deixando a concentração vacuolar em torno de 40  $\mu\text{M}$ , o suficiente para um completo desenvolvimento de seu estágio intraeritrocítico (Gazarini et al., 2003).

Já foi demonstrado que a ação da melatonina em *Plasmodium* leva a liberação de cálcio de estoques intracelulares resultando em um aumento da concentração de cálcio citosólico, tanto em *P. falciparum* quanto *P. chabaudi*. Este efeito é inibido pela adição de luzindol, um antagonista de receptores de melatonina, e por u73122, um inibidor de fosfolipase C. A utilização de meio extracelular sem cálcio (quelado com EGTA) e a adição do inibidor da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco-endoplasmático, tapsigargina (THG), confirmaram que a o cálcio liberado é proveniente de estoques intracelulares (Hotta et al., 2000).

A melatonina é conhecida por induzir a produção de inositoltrifosfato ( $\text{InsP}_3$ ) em diferentes sistemas tais como dinoflagelados (Hardeland et al., 1995), cérebro de galináceos (Popova e Dubocovich, 1995) e melanoma de hamsters (Eison e Mullins, 1993). Em *Plasmodium*, sabe-se que esta é capaz de mobilizar cálcio de estoques internos (Hotta et al., 2000). Em 2005, Beraldo et al. reportou que em *P. falciparum*, não só a melatonina, mas também outros derivados do triptofano, como serotonina, N-acetil-serotonina e triptamina, são capazes de induzir a liberação de cálcio de estoques intracelulares causando um aumento na concentração de cálcio citosólico (Beraldo e Garcia, 2005). Outro trabalho reportou ainda que a adição de melatonina induz um aumento de AMP cíclico, cAMP, e consequentemente aumenta também a atividade da proteína quinase dependente de cAMP, PKA. No mesmo trabalho foi notado que as vias de cálcio e de cAMP estão correlacionadas, uma vez que, inibidor de fosfolipase C (PLC), quelante intracelular de cálcio (Bapta/AM) ou inibidor de calmodulina bloquearam o efeito do hormônio sobre os níveis de cAMP; efeito

recuperado com a adição do ionóforo ionomicina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ). Além disso, foi demonstrado que o cAMP também é capaz de modular o ciclo do parasita, sincronizando-o. De fato, este segundo mensageiro já demonstrou estar relacionado com o desenvolvimento do parasita, como no caso da gametogênese e maturação de merozoítos (Beraldo et al., 2005).

A modulação de ciclo de *Plasmodium* pelo hormônio melatonina é então mediada por dois segundos mensageiros que atuam combinadamente. De um lado o hormônio age por uma via clássica de ativação da PLC, provavelmente induzindo a formação de  $\text{InsP}_3$  e consequentemente, liberando cálcio do retículo endoplasmático. Uma vez que o cálcio foi liberado no citosol, inicia-se uma ativação da adenilato ciclase (AC) convergindo a favor da formação de cAMP que por sua vez, ativa a proteína quinase dependente, PKA, e assim novamente ocorre uma modulação de cálcio citosólico (figura 1.4) (Beraldo et al., 2005).

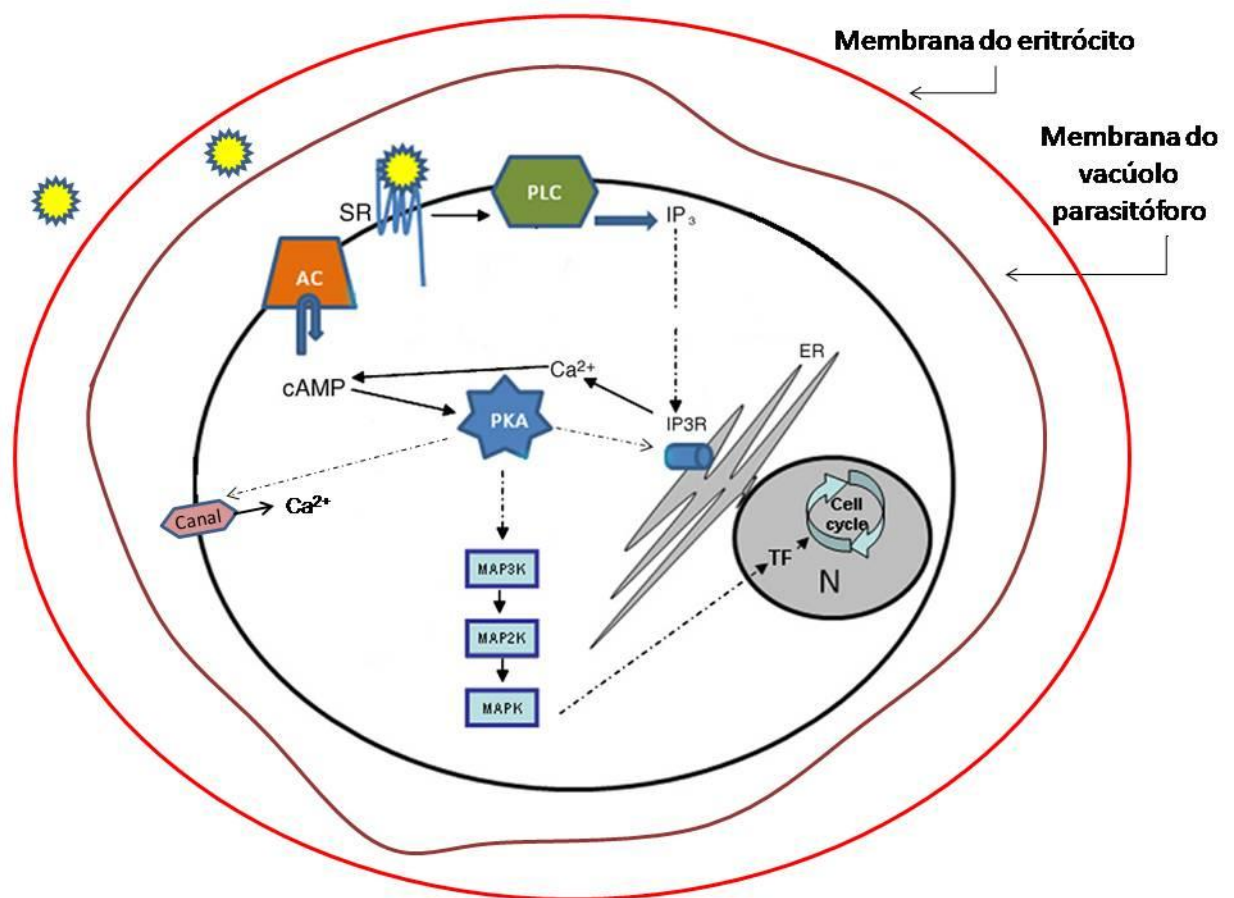


Figura 1.4-Esquema da via de sinalização por melatonina em *Plasmodium*. AC, adenilato ciclase; cAMP, adenosina monofosfato cíclica; ER,retículo endoplasmático; IP3, inositol trifosfato; IP3R, receptor de inositol trifosfato; N, núcleo; PLC, fosfolipase C; SR, receptor serpentina; TF, fatores de transcrição.

FONTE: Modificado de Koyama et al.(2009)

#### 1.4 Proteínas Quinases

Extremamente importantes para a sinalização celular, as proteínas quinases (PQs) são enzimas que modificam o substrato através de fosforilação, resultando em mudanças na proteína alvo que podem interferir em sua atividade, localização ou associação com outras proteínas. As quinases são essenciais para o controle do ciclo celular e diferenciação. Além disso, participam de eventos no metabolismo celular, na transcrição gênica, no rearranjo do citoesqueleto, no movimento celular e na apoptose. A fosforilação por proteínas quinases é conhecida como um dos principais mecanismos pelo qual a atividade celular de eucariotos é controlada (Hanks, 2003). Devido a esta importância, cerca de 2% de todo o genoma humano codifica para tais proteínas (Doerig, 2008). Mutações ou desregulação de proteínas

quinases podem causar diversas doenças (Manning et al., 2002).

Nos parasitas da malária, a capacidade de perceber o meio externo tem papel importante no seu ciclo celular e diferenciação de fases. As diferentes fases de desenvolvimento do parasita compreendem complexos ciclos de crescimento celular, dos quais se estima que as quinases sejam moduladores fundamentais (Koyama et al., 2009). Tanto no mosquito vetor quanto no hospedeiro vertebrado, as proteínas do parasita e do hospedeiro se comunicam em complexas estratégias de adaptação e sobrevivência (Anamika et al., 2005).

Já foi demonstrado que o uso de diversos inibidores de PQs impede a invasão e consequentemente, o desenvolvimento do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (Dluzewski e Garcia, 1996). A indústria farmacêutica tem desenvolvido programas objetivando a identificação de novos alvos para tratamentos da malária entre as quinases envolvidas em sinalização (Doerig, 2008). Por não haver muita homologia entre algumas PQs de patógenos, como o *Plasmodium*, e humanas e a participação em processos vitais para estes patógenos, estas proteínas quinases poderiam ser alvos de drogas contra estes parasitas (Koyama et al., 2009).

	Name	Group/Family	PlasmoDB	Phenotype
Essential for schizogony Potential targets for schizonticidal drugs	Pbcrk-1	CMGC/CDK	PF0865c	Essential for erythrocytic schizogony (repeated failure to knock-out the gene)
	Pfmap-2	CMGC/MAPK	PF11_0147	Essential for erythrocytic schizogony (Gene disruption only in the presence of a complementing episome)
	PfCK2	CMGC/CK2	PF11_0096	Essential for erythrocytic schizogony (Gene disruption only in the presence of a complementing episome)
	PfCDPK1	CaMK/CDPK	PFB0815w	Essential for erythrocytic schizogony (repeated failure to knock-out the gene)
	PfPKG	AGC	PF14_0346	Essential for erythrocytic schizogony (only non-loss of function genetic modifications possible) Block in male and female gametogenesis
Not essential for schizogony Potential targets for transmission-blocking drugs	PbCDPK4	CaMK/CDPK	PF07_0072	Block in male gametogenesis
	Pbmap-2	CMGC/MAPK	PF11_0147 PB000659.00.0	Block in male gametogenesis
	PbCDPK3	CaMK/CDPK	PFC0420w PB000341.03.0	Block in ookinete motility
	Pbnek-4	NIMA	MAL7P1.100 PB001094.00.0	Block in meiosis/ookinete development
	Pf/Pbnek-2	NIMA	PFE1290w PB000208.03.0	Block in meiosis/ookinete development
	PbCDPK6	CaMK/CDPK	PF11_0239 PB001122.01.0	Impairment of sporozoite infectivity
	PfPK7	Orphan	PFB0605w	Slow growth rate caused by lower number of nuclei per schizont Block in oocyst development
	PfeIK1	eIF2 $\alpha$ K	PF14_0423	No developmental block Abolition of starvation stress-responsive eIF2 $\alpha$ phosphorylation in asexual parasites
	Pfmap-1	CMGC/MAPK	PF14_0294	No developmental block Overexpression of Pfmap-2

Figura 1.5-Estudos de genética reversa em proteínas quinases de *P. falciparum* publicadas.  
FONTE: Modificado de Doerig (2010).

As proteínas quinases são normalmente classificadas em serina-treonina e tirosina quinases, onde o fosfato do ATP é transferido para resíduos de serina, treonina ou tirosina, respectivamente, podem ser divididas em subgrupos e famílias (Kappes et al., 1999).

A maioria das PQs anotadas em *Plasmodium* se distribui em grupos já caracterizados em mamíferos. A Figura 1.5 apresenta algumas quinases de *Plasmodium* que foram estudadas por genética reversa demonstrando seu papel na esquizogonia intraeritrocítica.

Existe nestes parasitas, um membro ortólogo de caseína quinase 1; cinco membros da família das NIMAs (*Never In Mitosis gene A*); cinco do grupo AGC (que inclui PKG, PKA e PKB, mas não homólogos a PKC) e diversos genes codificando membros de CamK, incluindo membros de quinases cálcio-dependentes (CDPKs), uma família de enzimas caracterizadas por um domínio de quinases acrescido de um domínio semelhante ao da calmodulina,



restrito a plantas e alveolados (ciliados, apicomplexos e dinoflagelados). Dezoito enzimas se encontram no grupo das CMGC, que inclui as MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos), CDKs (quinases dependentes de ciclinas), GSK3 (glicogênio sintase quinase), e CDK-like, relacionadas às quinases dependentes de ciclina (Kappes et al., 1999; Doerig et al., 2005).

No grupo das CK1 (caseína quinases) conhece-se apenas um membro que é capaz de fosforilar diversas proteínas do parasitas (Barik et al., 1997). Já no grupo das CMGC, dezoito enzimas foram encontradas em *P. falciparum*. Neste grupo estão as famílias das CDKs, MAPK, GSK3, e CDK-like, relacionadas às quinases dependentes de ciclinas (Kappes et al., 1999).

As quinases pertencentes à família das CDKs, comumente encontradas em eucariotos, estão ligadas à regulação do ciclo celular. A forma ativa é composta por uma subunidade catalítica, CDK e uma subunidade regulatória, a ciclina. Em *P. falciparum*, foram identificadas três proteínas relacionadas às CDKs: PfPK5, em que tanto a localização intracelular quanto o momento em que a proteína é expressa sugerem que a atividade desta proteína está relacionada a regulação do ciclo de divisão nuclear do *Plasmodium* (Holton et al., 2003). A Pfmrk, predominante em gametócitos, sugere sua participação na diferenciação de parasitas em estágios sexuais (Li et al., 1996). A Pfcrk1 é regulada pós-transcricionalmente, como sugerido pelo acúmulo de RNAm em gametócitos (Doerig et al., 1995).

Quinases do domínio das MAPK (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos) desempenham funções em diversos processos de transdução de sinal, como, por exemplo, indução da proliferação, parada do crescimento celular e apoptose. São ativadas por fosforilação de duas MAPKK específicas em resíduos de tirosina e treonina do motivo TXY (Kappes et al., 1999). Em *P. falciparum* são conhecidas apenas duas proteínas pertencentes ao grupo das MAPK.

A PfMAP1 encontra-se presente em isoformas distintas, com peso molecular variando entre 40, 80 ou 150 kDa, sendo a de 40 kDa presente em todo o estágio intraeritrocítico, enquanto que as duas isoformas maiores são detectadas somente em

formas maduras do parasita (Graeser et al., 1997; Kappes et al., 1999). O nocaute do gene codificante para a quinase PfMAP1 levou a um aumento da atividade de PfMAP2, o que sugere que a superexpressão da MAP2 pode estar sendo necessária para suprir de alguma maneira a ausência da MAP1 (Dorin-Semblat et al., 2007). Já a PfMAP2 foi reportada como uma proteína essencial para que se complete o ciclo assexuado nos parasitas, embora estudos em *Plasmodium berghei* tenham descrito o ortólogo como dispensável para o desenvolvimento do ciclo assexuado e gametocitogênese, mas essencial para a gametogênese no mosquito vetor e exflagelação dos microgametócitos (Dorin-Semblat et al., 2007).

As enzimas PfPK6 e Pfcrk4 possuem características semelhantes às CDKs e MAPK, de acordo com análises da sequência de aminoácidos (Ward et al., 2004). O nocaute da CDPK6 em *P. berghei* mostra a participação desta quinase na infectividade do esporozoíto nas células hepáticas (Coppi et al., 2007).

Em *P. falciparum*, a PfPK1 compartilha uma sequência de aminoácidos similar à da GSK3 (Kappes et al., 1999) e tem expressão estágio-específica, bem como sua localização celular, que, durante o estágio eritrocítico, muda do citosol para uma fração da membrana do parasita (Kappes et al., 1995). Entretanto ainda não se conhece nenhum homólogo para a CK2, uma enzima ubiquitária, embora existam fortes evidências de sua existência em *Plasmodium* (Kappes et al., 1999).

As CaMK (calmodulina quinases) são conhecidas por serem ativadas por uma ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina em uma região do domínio catalítico (Hanks e Hunter, 1995). Existem 13 PQs deste grupo em *P. falciparum*, destacando um dos papéis do cálcio no parasita da malária (Ward et al., 2004). A família das CDPKs possuem cinco proteínas anotadas em *P. falciparum* (Ward et al., 2004). Essas PQs são caracterizadas pela presença de dois domínios funcionais, um domínio catalítico de proteínas quinase e outro de regulação por meio de ligação do cálcio, sendo ativadas diretamente pelo mesmo, sem necessitar da calmodulina como proteína mediadora (Kappes et al., 1999). São encontradas em plantas (Hrabak et al., 1996) e alguns protozoários como os cilados *Tetrahymena thermophila* (Hegyesi e Csaba, 1994), *Paramecium sp* (Kim et al., 1998) e os apicomplexas *Eimeria máxima* (Dunn et al.,

1996) e *Plasmodium sp* (Billker et al., 2004). Em plantas ainda não foram encontrados homólogos funcionais da PKC ou CaMK, enquanto que em animais e fungos, ainda não foram identificados homólogos de CDPK, o que sugere que, em plantas, as CDPKs podem substituir a função das PKC em eucariotos (Satterlee e Sussman, 1998). Interessantemente *P. falciparum* também não possui nenhuma PKC anotada no genoma.

A PfCDPK1 é indispensável para invasão de eritrócitos, mobilidade do parasita e citocinese. Expressa durante a esquizogonia do ciclo eritrocítico e esporogonia no mosquito, recentemente foi descrita como essencial para que se complete o ciclo assexuado intraeritrocítico, uma vez que o tratamento com inibidores de CDPK1 (purfalcamina) promoveu um bloqueio do ciclo no estágio de esquizontes (Kato et al., 2008). Já a CDPK3 é importante para o ciclo sexuado do parasita, pois o nocaute do gene que codifica esta proteína diminui cerca de duas vezes a habilidade de oocineto infectar o intestino do mosquito (Ishino et al., 2006). A CDPK4 está relacionada à exflagelação do gametócito masculino em resposta ao aumento de cálcio induzido pelo ácido xanturênico do mosquito vetor (Billker et al., 2004). A PfPK2 é expressa de maneira estágio-específica, localizando-se principalmente na membrana do parasita (Zhao et al., 1992) mas ainda não tem função descrita. Apresenta homologia a CaMK, PKA e PKC, pertencendo então, tanto ao grupo das CaMK, quanto das AGC.

O grupo das AGC inclui a família das proteínas com atividade dependente de nucleotídeos cíclicos, como por exemplo, AMPc e GMPc. Em *Plasmodium*, cinco PQs pertencem ao grupo das AGC, três delas já caracterizadas: PfPKA, PfPKG e PfPKB (Ward et al., 2004; Doerig et al., 2008). A PfPKA (proteínas quinases dependentes de AMPc) é essencial para a multiplicação do parasita no ciclo assexuado (Syin et al., 2001) além de estar envolvida na diferenciação sexual do parasita (Kaushal et al., 1980; Trager e Gill, 1989). A PfPKG (proteínas quinase dependentes de GMPc) de parasitas apicomplexos são notavelmente diferentes das dos hospedeiros mamíferos ou aves, sendo maiores e contendo um terceiro sítio de ligação de nucleotídeos. Este sítio é funcional e contribui com a cinética de ativação do nucleotídeo, característica exclusiva das PKGs de parasitas (Diaz et al., 2006).

A PKB de mamíferos é regulada por fosfatidilinositol (PI) gerados pela fosfatidilinositol

3 quinase (PtdIns-3) onde PI interage com o domínio de homologia à plecstrina (PH) de PKB. Já a PfPKB não possui o domínio PH e sua ativação ocorre via cálcio-calmodulina (Marte e Downward, 1997). A fosfolipase C (PLC) pode ser um regulador desta via por estar relacionada à liberação de cálcio de estoques intracelulares. Além disso, dados apresentados por P. Sharma no MAM 2008 (*Molecular Approaches to Malaria*) sugerem que o complexo cálcio-calmodulina-PfPKB poderia estar envolvido na invasão eritrocítica do parasita (Doerig et al., 2008).

Cinco proteínas quinases de *Plasmodium* se assemelham com o grupo de Tirosina-quinase-like (TirK-like), incluindo duas que apresentam máximo de homologia com MAPKKK-relacionadas, MAL6P1.191 e PFB0520w (Ward et al., 2004).

Um pequeno grupo de cinco proteínas quinases foram identificadas por análises de sequência de aminoácidos como relacionadas à família das NIMA/NEK, envolvidas na regulação de ciclo celular. PfNEK1 se assemelha a NEK2 de mamíferos, enquanto que as outras não possuem homologia clara com NEKs de mamíferos ou leveduras (Reininger et al., 2009). As NEKs desempenham papéis na divisão de células eucarióticas, tal como replicação do centrosomo. Análises de microarray demonstraram que a PfNEK1 é expressa tanto no estágio sexuado quanto assexuado, enquanto que as outras três NEKs são expressas predominantemente em gametócitos (Le Roch et al., 2003). A PfNEK1 tem um sítio de ativação semelhante às MAPKK, e experimentos demonstraram que de fato esta proteína *in vitro* fosforila a PfMAP2, no entanto não fosforila a PfMAP1, e nem MAPKs conhecidas de mamíferos (Dorin et al., 2001). APbNEK4 é fundamental para a maturação do oocineto, uma vez que o nocaute do gene, apesar de não interferir na formação dos gametas e fertilização, impede o desenvolvimento do zigoto em oocineto (Reininger et al., 2005). Além disso, tanto a proteína NEK2 de *P. falciparum* quanto de *P. berghei* são importantes para a formação de oocistos no mosquito vetor (Reininger et al., 2009). A proteína NEK3 ainda não tem função descrita em *Plasmodium*, além ser filogeneticamente distante das NIMA quinases de mamíferos. Expressa durante os estágios tardios do ciclo assexuado e em gametócitos, o que se sabe sobre esta quinase é sobre seu potencial para regular MAPK de *Plasmodium*, uma vez que esta é capaz de fosforilar PfMAP2, embora não fosforile a PfMAP1 nem a MAPK1

humana (Lye et al., 2006).

Outro grupo associado ao das NIMAs é formado por três enzimas, incluindo a já citada, PfPK4. São similares às quinases de fator de alongação em mamíferos (Ward et al., 2004), homólogas de PQs envolvidas na regulação da tradução por meio da fosforilação do fator-2 de iniciação da tradução em eucariotos (eIF2 $\alpha$ ). Em *P. falciparum*, a atividade de eIF2 $\alpha$  é heme-dependente (Surolia e Padmanaban, 1991; Anamika et al., 2005) e, sabe-se que estas quinases estão relacionadas à tradução em resposta ao estresse em outros organismos, como leveduras e metazoários (Fennell et al., 2009). APfeIK1, fosforila *in vitro*, a eIF2 $\alpha$  ortóloga de *P. falciparum* em resposta a privação de aminoácidos (Fennell et al., 2009). Em parasitas nocaute para a pfeik1, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  em resposta à privação de aminoácidos é abolida.

Diversas PQs não se assemelham a nenhum grupo pré-definido, ou então se agrupam em pequenos satélites. Essas proteínas são classificadas como família das OPKs (*Orphan Protein Kinases*). Como exemplo destas proteínas temos a PfKIN (PF140516), previamente classificada como da família das SNF e um grupo de três enzimas de *Plasmodium*, incluindo a PfPK4 (MAL6P1.146), previamente caracterizada como homóloga de quinases HRI; e diversas outras sequências isoladas (Ward et al., 2004). Quatro quinases órfãs de *P. falciparum* têm sido descritas como enzimas compostas, compartilhando características com mais de uma família, como por exemplo, as já mencionadas PfPK6 e Pfcrk-4, que possuem relação tanto com CDKs quanto com MAPK (Ward et al., 2004). Outro exemplo é a PfPK7 (PFB0605w) que apresenta o máximo de homologia com as MAPKK de mamíferos, no entanto, esta homologia se resume à parte C-terminal, onde, a região N-terminal é mais próxima da proteína quinase A (PKA) de fungos (Figura 1.6), contudo PfPK7 se mostrou insensível tanto a inibidores para a PKA quanto MAPKKs (Dorin et al., 2005). Apesar da semelhança com MEK de mamíferos, estudos *in vitro* mostraram que a PfPK7 não fosforila as MAPKs conhecidas de *P. falciparum*, PfMAP1 e PfMAP2 (Dorin et al., 2005). O nocaute do gene que codifica a PfPK7 resultou em parasitas apresentando fenótipo diferenciado no ciclo sexuado e assexuado. Estudos no mosquito vetor relataram que o parasita com o gene nocauteado foi incapaz de dar continuidade ao ciclo sexuado, uma vez que não produzia oocistos. No estágio

assexuado apresentou crescimento mais lento, cerca de duas vezes menor, devido à formação de menor número de merozoítos nos esquizontes em relação ao parasita selvagem, demonstrando o envolvimento desta quinase na regulação da proliferação e desenvolvimento do ciclo do *P. falciparum*.

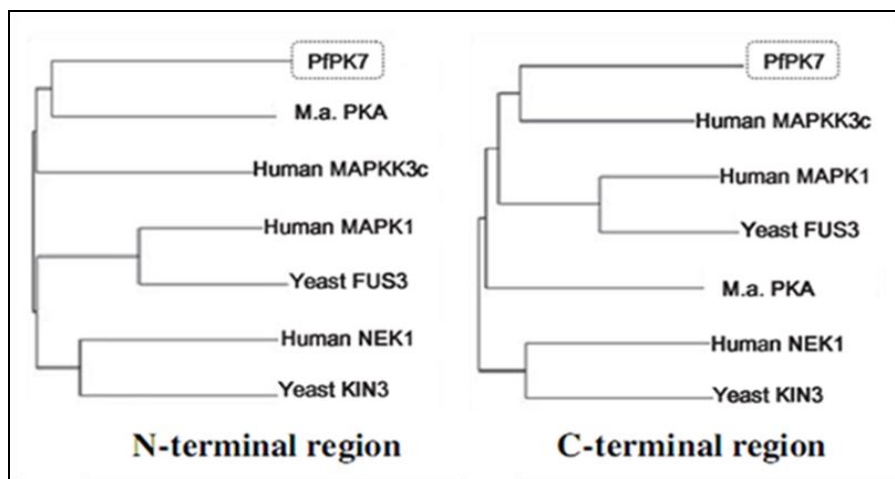


Figura 1.6- Árvore filogenética da proteína quinase PfPK7 baseada no alinhamento das regiões N-terminal entre os resíduos 28-187 e C-terminal, dos resíduos 142-321.  
 FONTE: Modificado de Dorin et al. (2005).

Outra quinase órfã é a PfPK9 (PF13\_0085) que fosforila a UBC13 (E2 ubiquitin-conjugating enzyme 13) e suprime a atividade conjugadora de ubiquitina (Philip e Haystead, 2007). Este fato indica que a proteína PfPK9 pode desempenhar um papel importante na regulação do proteossomo, e assim, em processos fundamentais como progressão celular (Doerig et al., 2008).

É notável o surgimento de uma nova família de quinases em organismos apicomplexos, denominada FIKK-quinases. Corresponde a um grupo de quinases com motivo conservado de aminoácidos, correspondente ao subdomínio II do domínio catalítico de PQ. Possuem a região N-terminal altamente variável e, com exceção da tríade glicina no subdomínio I, contém todos os resíduos importantes para fosfotransferência ou estabilidade estrutural das proteínas quinases. Cerca de 20 PQs desta família foram identificadas no genoma de *P. falciparum* e apenas uma de outra espécie de apicomplexas (Ward et al., 2004).

A Figura 1.7 esquematiza diversas quinases estudadas por genética reversa em

*Plasmodium* e as implicações já descobertas no ciclo do parasita.

Uma vez que inibidores de quinases e de fosfatases interferem no ciclo do *Plasmodium*, admite-se que são requeridas tanto fosforilação quanto desfosforilação de proteínas para o controle do ciclo do parasita (Li e Baker, 1998). A reversão da fosforilação é um mecanismo fundamental de regulação pós-traducional do funcionamento da proteína. Esta defosforilação é catalizada por proteínas fosfatases, classificadas em duas grandes famílias: as serina/treonina fosfatases e as tirosina fosfatases (Dobson et al., 2001). Tal procedimento tem sido reportado como um importante fator na invasão de eritrócitos por merozoítos e desenvolvimento do ciclo intraeritrocítico. Recentemente foram caracterizadas algumas fosfatases em *P. falciparum* tais quais PfPP-2A, PfPP-2B, PfPP-2C e duas fosfatases putativas do estágio sexuado PfPP- $\alpha$  e PfPP- $\beta$  (Li e Baker, 1998).

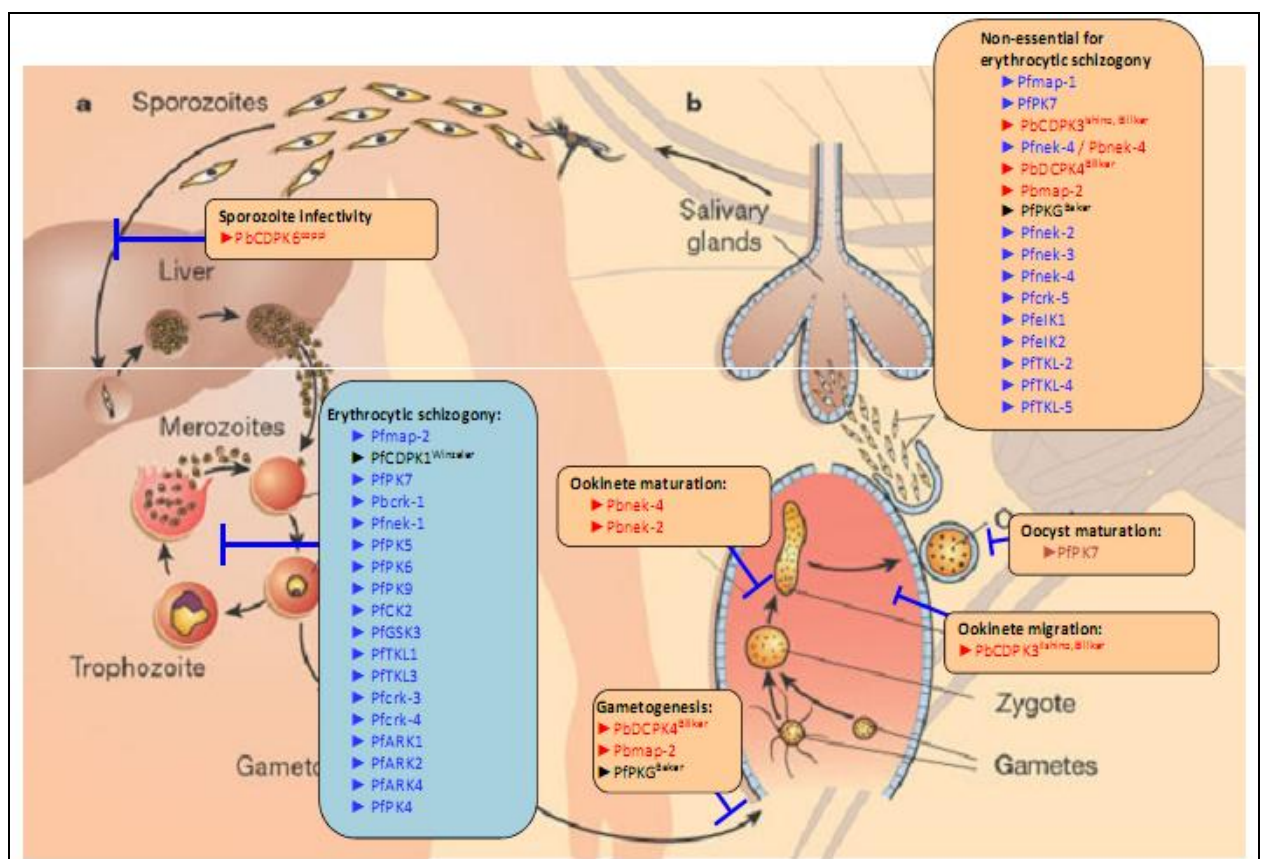


Figura 1.7- Esquema ilustrativo das quinases de *Plasmodium* e implicações no ciclo de vida do parasita.

FONTE: Modificado de Doerig et al. (2008) por C. Doerig.

## 2 OBJETIVO

---

Este trabalho tem por objetivo averiguar a importância das quinases PfPK7, PfMAP1, PfNEK2, PfNEK3 e PflK1 na regulação do ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* mediado pelo hormônio melatonina por meio da análise da progressão de *P. falciparum* pelos vários estágios do ciclo intraeritrocítico utilizando parasitas nocautes para estas proteínas.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 Manutenção de *P. falciparum* em cultura

Parasitas 3D7 foram mantidos em meio RPMI 1640 (GIBCO) com 0,04% de sulfato de gentamicina, 0,05% (SIGMA) de hipoxantina (SIGMA), 0,23% de bicarbonato de sódio (SIGMA) e suplementado com 10% de soro. Os parasitas nocautes foram mantidos da mesma forma com adição da droga blasticidina (SIGMA) (2,5 µg/mL) e, para os parasitas onde a função do gene foi restaurada (parasita complemento), além de blasticidina foi adicionado o antibiótico WR99210 (5 nM). Após a troca do meio as garrafas foram ventiladas com uma mistura de gás (7% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 88% de N<sub>2</sub>) (Trager e Jensen, 1976) e mantidas em estufa à 37 °C.

Bolsas de hemácias e plasma humano A+ foram doadas quinzenalmente pelo Centro de Hemoterapia do Hospital do Servidor para manutenção do hematócrito da garrafa a 5% e suplementação do meio de cultura, respectivamente.

O meio de cultura foi trocado diariamente e o ciclo do parasita foi acompanhado por esfregaço em lâmina coradapor panótico (RÁPIDO LB) para análise diária de parasitemia, e com Giemsa para contagem de fases dos parasitas em experimento para análise de modulação do ciclo.

Todos os parasitas nocautes e seus complementos utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Christian Doerig, da Escola Politécnica Federal de Lausana (Suíça).

#### 3.2 Análise da modulação de ciclo intraeritrocítico

Os experimentos foram realizados em placas de cultura de células contendo 24 poços, nos quais foi adicionado 1mL de eritrócitos infectados a 1% de parasitemia. Para cada tratamento foram utilizadas três concentrações do hormônio melatonina (100 nM, 1 µM e 10 µM) além do controle com solvente (etanol). A melatonina foi dissolvida primeiramente

em etanol e depois em meio completo resultando em estoques de 4mM, 1000µM, 100µM e 10µM.

Antes da incubação, os parasitas foram lavados 2X com RPMI completo para retirada da droga blasticidina, utilizada no crescimento dos parasitas nocauteados. A incubação foi feita no interior de uma câmara de acrílico, mantida em estufa à 37 °C e atmosfera de 7% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 88% de N<sub>2</sub> por 24h.

Foram realizados três experimentos independentes para cada parasita nocaute (pfpk7<sup>-</sup>, PfPK7 complemento, pfnek2<sup>-</sup>, pfnek3<sup>-</sup>, pfmap1<sup>-</sup> e pfeik1<sup>-</sup> e seus respectivos controles com o parasita selvagem, 3D7) e, cada tratamento foi incubado em triplicata experimental.

Após 24h, foram feitos esfregaços de cada poço, fixados com metanol e corados com Giemsa para posterior contagem. Para cada esfregaço foi contado um mínimo de 2000 eritrócitos e calculadas as respectivas porcentagens de cada estágio, bem como as parasitemias. Os dados foram normalizados em relação ao controle e analisados no programa GraphPad Prism 5. Para as análises estatísticas utilizou-se o teste One Way ANOVA, com pós-teste de Newman Keuls.

### **3.3 Sincronização, isolamento e marcação de parasitas**

Para os ensaios de medidas de cálcio, a cultura de parasitas foi sincronizada com sorbitol 10% (Lambros e Vanderberg, 1979) durante 15 minutos e, após centrifugação o pellet foi ressuscitado em meio completo. 18h pós-sincronização foram realizados os ensaios em trofozoítos maduros.

Os eritrócitos infectados foram então retirados da cultura e os parasitas foram isolados dos eritrócitos com saponina 0,02% em PBS (137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 4,3mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,4mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2), na presença de inibidores de protease: leupeptina, pepstatina A, antipaina e quimiostatina (10 µg/mL) e benzamidina (0,5mM). O isolamento dos parasitas das membranas lisadas foi feito por centrifugação a 10.000g por 10 min, a 4 °C. Após centrifugação, os parasitas foram lavados 3X com tampão M (116mM de NaCl, 5,4mM de KCl, 0,8mM de MgSO<sub>4</sub>, 5,5 mM de D-glicose, 50mM de MOPS, pH 7,2) acrescido de cálcio (2mM), benzamidina (0,5 mM) e coquetel inibidor de proteases (1µL/mL).

Os parasitas foram ressuspensos em tampão M com cálcio, acrescido de probenecid (40 $\mu$ M) (bloqueador de canal aniônico, impede que o Fluo-4 seja transportado para o meio extracelular) e Fluo-4 (5 $\mu$ M) e foram incubados por 50 min à 37 °C. Após este período, os parasitas foram lavados 3X com tampão M com cálcio acrescido de probenecid e ressuspensos no mesmo tampão. Os ensaios foram realizados no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301-PC. Foram feitas estimulações com melatonina na concentração 100nM e etanol, como controle negativo. Digitonina (25  $\mu$ M) e EGTA (100  $\mu$ M) foram usados para respectivamente lisar os parasitas e assim liberar todo cálcio e em seguida, quelar todo o cálcio. Este procedimento é utilizado para calcular a fluorescência máxima menos a mínima. A droga tapsigargina (10  $\mu$ M), inibidora de Ca-ATPase do retículo endoplasmático, foi utilizada quando necessária para comprovar a existência de cálcio em estoque intracelular.

Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram, respectivamente, 505nm e 530nm.

Os dados de concentração e fluorescência foram extraídos do espectrofluorímetro no formato de texto (.txt) para posteriores análises no programa GraphPad Prism 5. Os dados foram normalizados em relação à linha de base e analisados com One Way ANOVA, com pós-teste de Newman-Keuls.

### **3.4 Citometria de fluxo**

Diversos estudos propõem o uso da citometria de fluxo para avaliar tanto parasitemia como diferenciação dos estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum* usando marcadores fluorescentes de DNA (Shapiro e Ulrich, 2010). Diferentes marcadores fluorescentes já foram utilizados: iodeto de propídeo (Contreras et al., 2004), laranja de acridina (Bhakdi et al., 2007), Hoeschst 33258 (van Vianen et al., 1993), Picogreen® (Corbett et al., 2004), Dihidroetidina (van der Heyde et al., 1995) e YOYO-1 (Li et al., 2007) são alguns exemplos.

YOYO-1 é considerado um dos marcadores disponíveis mais sensíveis, sendo excitado com laser a 488nm (Li et al., 2007). A análise de DNA de diferentes espécies de *Plasmodium* mostrou que esse marcador foi capaz de separar completamente eritrócitos não infectados

de eritrócitos parasitados (Barkan et al., 2000; Sijwali et al., 2004). A utilização do YOYO-1 possibilita correlacionar o conteúdo de DNA a cada estágio intraeritrocítico, onde uma baixa quantidade de DNA relaciona-se ao anel e trofozoíto e um alto conteúdo de DNA com a fase esquizonte. Usando a citometria de fluxo e YOYO-1 podemos claramente separar fases jovens e maduras de *P. falciparum* como mostra a Figura 4.8. Já foi descrito para diferentes fluorocromos que a intensidade de fluorescência de parasitas no estágio esquizonte é em média 10 vezes maior que a encontrada em anel (Janse et al., 1987).

Similar aos experimentos de contagem com Giemsa para verificar modulação de ciclo de *P. falciparum* por melatonina, foram feitas incubações em placas de cultura de células contendo 24 poços com concentrações diferentes de melatonina (100 nM e 1 µM) em 1mL de meio RPMI completo. A parasitemia inicial estava entre 4% e 10% em 2,5% de hematócrito.

*P. falciparum* nocaute para os genes de quinases *pfmap1* e *pfeik1* também foram testadas para os derivados do triptofano: N-acetilserotonina (100 nM e 1 µM), triptamina (500nM e 1 µM) e serotonina (250 nM e 1 µM), além de melatonina (100 nM e 1 µM) e controle do solvente (etanol) bem como controle de eritrócitos não infectados e amostras de parasitas sincronizados em cada estágio, para demarcação das fases nas análises (Figura 4.11).

Após incubação em câmara de acrílico por 24h à 37 °C, as células foram ressuspensas e lavadas 1X em PBS, com centrifugação de 2.000g por 1 minuto e ressuspensas novamente em 1 mL de PBS com 2% de formaldeído, para fixação das células, em temperatura ambiente por 24h. Os experimentos foram feitos em duplicata e em três dias independentes.

Após a fixação, as células foram lavadas 2X com PBS para retirar completamente o formaldeído utilizado. Antes de serem levadas ao citômetro de fluxo, foram ressuspensas em solução contendo 0,1% de triton X-100 para permeabilizar as células, 500mg/mL de RNase e 10 nM do marcador de ácido nucléico, YOYO-1. Imediatamente após a marcação, as células foram analisadas no citômetro de fluxo.

A leitura foi feita no equipamento de citometria FACS Calibur, onde foram coletadas  $10^5$  células dentro do *gate* demarcado. A excitação do YOYO-1 foi feita utilizando laser de comprimento de onda 488nm e sua emissão em 509nm captada pelo filtro FL1-H (530/30).

Para demarcação dos *gates* dos estágios de parasitas foram utilizadas as culturas sincronizadas nos estágios de anel e esquizontes, além dos eritrócitos não infectados. As análises foram feitas utilizando o programa FlowJo 7.6.1.

## 4 RESULTADOS

---

### **4.1 Pfpk7, uma proteína quinase atípica com características de MAPKK e PKA de mamíferos, participa na modulação via melatonina do ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum***

A melatonina é um hormônio capaz de modular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* e *P. chabaudi* (Hotta et al., 2000). A incubação de parasitas em cultura com o hormônio durante 24 horas promove o aumento de fases tardias (esquizontes) e diminuição de formas jovens (anéis) em relação ao controle em *P. falciparum*, levando à sincronização das fases (Hotta et al., 2000; Beraldo et al., 2005). Além disso, quando esquizontes de *P. falciparum*, sincronizados pelo método do sorbitol, são incubados com melatonina há um aumento na invasão, sugerindo uma aceleração do ciclo intraeritrocítico (Beraldo e Garcia, 2005). Parasitas nocaute para o gene *pfpk7* crescem de maneira mais lenta que parasitas selvagens, formando um número menor de merozoítos por esquizonte no ciclo intraeritrocítico e não formando oocistos durante o ciclo sexuado (Dorin-Semblat et al., 2008).

A fim de verificar se a proteína Pfpk7 seria um dos efetores da via de sinalização da melatonina, hemácias infectadas com parasitas nocaute para o gene *pfpk7* foram incubadas com o hormônio em três concentrações distintas (100 nM, 1 µM e 10 µM), utilizando-se como controle positivo do ensaio hemácias infectadas com parasitas selvagens (cepa 3D7). Após 24 horas de incubação, esfregaços foram obtidos e expostos à coloração de Giemsa, possibilitando a contagem de parasitemia.

Como reportado anteriormente (Hotta et al., 2000), verificamos que parasitas *P. falciparum* selvagens dessincronizados (cepa 3D7) incubados com melatonina nas concentrações de 100 nM, 1 µM e 10 µM sofreram uma diminuição da porcentagem de formas jovens (anéis) e um aumento da porcentagem de formas maduras (esquizontes) em relação ao controle (incubação com solvente, etanol). Essas alterações ocorreram de maneira dose-dependente (Quadro 4.1 e Figura 4.1A). Especificamente, a média da

porcentagem da forma intraeritrocítica de anel foi 34% menor que o controle no tratamento com a concentração de 10  $\mu$ M de melatonina ao passo que a média da porcentagem de esquizontes para a mesma concentração do hormônio foi 233,7% maior que o controle (Quadro 4.1A). Quando submetemos os dados obtidos à análise estatística, verificamos que houve diferença significativa em relação ao controle para a porcentagem normalizada da forma de anéis e esquizontes, porém não foram observadas diferenças significativas para a forma trofozoíto (Figura 4.1A), cuja média foi 2,9% menor que o controle no tratamento com 10  $\mu$ M de melatonina (Quadro 4.1). A média da parasitemia foi 1,7% maior que o controle (Quadro 4.1) para uma concentração de melatonina de 10  $\mu$ M, valor que não foi estatisticamente diferente do controle (Figura 4.1B). Para concentrações menores de melatonina também foi verificado o efeito previamente reportado para parasitas 3D7 selvagens: na concentração de 100 nM, ocorreram mudanças estatísticas significativas com decréscimo de 19,6% da média da porcentagem de anéis e aumento de 133% da média da porcentagem de fases maduras em relação ao controle (Figura 4.1 A e Quadro 4.1), e, na concentração de 1 $\mu$ M a média da porcentagem de anéis foi reduzida em 31,0% ao passo que a média da porcentagem de esquizontes apresentou elevação em 191,8% em relação ao controle. A porcentagem de trofozoítos não apresentou alterações estatisticamente significativas para nenhuma das concentrações do hormônio, sofrendo aumentos de 5,0% e 0,6% em relação ao controle para as concentrações de 100 nM e 1 $\mu$ M de melatonina, respectivamente (Figura 4.1 A e Quadro 4.1). As parasitemias não foram estatisticamente diferentes do controle para as concentrações de 100 nM e 1  $\mu$ M de melatonina.

Os resultados obtidos com parasitas selvagens validam os dados obtidos em experimentos executados concomitantemente em parasitas dessincronizados nocaute para o gene *pfpk7*. Esses últimos apontam para uma perda da capacidade de sincronização do ciclo intraeritrocítico dependente de melatonina (Quadro 4.1 e Figura 4.1B). Verificamos que, para concentração de melatonina 10  $\mu$ M, a média da porcentagem de anéis nos parasitas nocauteados foi, 6,2% menor que o controle, enquanto a média da porcentagem de esquizontes foi 6,1% maior que o controle (Quadro 4.1). A média da parasitemia foi 1 % maior que parasitas tratados com solvente (Quadro 4.1) para uma concentração de melatonina de 10  $\mu$ M. Para uma concentração de 100 nM de melatonina, houve, nos

parasitas nocauteados, redução de 1,4% da média da porcentagem da fase de anel e redução de 8,8% da média do estágio esquizonte em relação ao controle; trofozoítos apresentaram aumento de 5,7% em relação ao controle (Quadro 4.1). Para a concentração de 1 $\mu$ M de melatonina, a média da porcentagem de anéis apresentou aumento de 7,2% em relação ao controle, mesmo aumento encontrado em trofozoítos para esta mesma concentração, ao passo que a média da porcentagem de esquizontes foi reduzida em 34,7% quando comparados com o controle (Quadro 4.1). Quando submetemos os dados à análise estatística verificamos que não houve diferença significativa em relação ao controle da porcentagem normalizada das fases para nenhuma das concentrações de melatonina utilizadas (Figura 4.1B). As parasitemias para as concentrações de 100 nM e 1  $\mu$ M de melatonina não foram estatisticamente diferentes do controle.

Os dados obtidos até o presente momento sugerem que a proteína PfPK7 participa na modulação, dependente de melatonina, do desenvolvimento intraeritrocítico de *P. falciparum*. A fim de fortalecer a hipótese, analisamos o parasita nocaute para o gene *pfpk7* transfectado com plasmídeo epissomal contendo o gene para *pfpk7* (*pfpk7*<sup>-</sup> complemento) utilizando a metodologia de microscopia para contagem de fases intraeritrocíticas do parasita após incubação com melatonina e empregando como controle positivo o parasita *P. falciparum* (cepa 3D7) selvagem.

Os resultados demonstram que parasitas com o gene *pfpk7* complementado são responsivos à melatonina, havendo uma recuperação da sincronização das fases intraeritrocíticas, o que pode ser percebido através do aumento da porcentagem de esquizontes e redução da porcentagem de anéis em relação ao controle com solvente (Quadro 4.2 e Figura 4.2B). Observamos que parasitas 3D7 selvagens (controle positivo) tiveram redução na média da porcentagem de anéis de até 66% e aumento da média da porcentagem de esquizontes de 139% em relação ao controle (estímulo com melatonina 10  $\mu$ M, Quadro 4.2), sendo que a redução da porcentagem normalizada de anéis e o aumento da porcentagem normalizada de esquizontes foram estatisticamente significativos (Figura 4.2A).



Quadro 4.1- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia normalizados pelo controle (solvente etanol) de cepas 3D7 selvagem e pfpk7- tratados com melatonina nas concentrações de 100 nM, 1 µM e 10 µM . Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média e são referentes a três experimentos independentes, cada qual em triplicata.

<b>3D7 selvagem</b>	<b>Solvente (Etanol)</b>	<b>Melatonina 100 nM</b>	<b>Melatonina 1 µM</b>	<b>Melatonina 10 µM</b>
Anel (%)	100	80,4 ± 5,1	69,0 ± 3,8	66,0 ± 2,6
Trofozoíto (%)	100	105,0 ± 6,1	100,6 ± 3,1	97,1 ± 1,7
Esquizonte (%)	100	233,0 ± 45,2	291,8 ± 49,9	333,7 ± 60,6
Parasitemia (%)	100	91,4 ± 4,3	102,6 ± 4,7	101,7 ± 4,3
<b>pfpk7-</b>	<b>Solvente (Etanol)</b>	<b>Melatonina 100 nM</b>	<b>Melatonina 1 µM</b>	<b>Melatonina 10 µM</b>
Anel (%)	100	98,6 ± 8,1	107,2 ± 10,9	93,8 ± 4,0
Trofozoíto (%)	100	105,7 ± 5,0	107,2 ± 5,7	106,2 ± 3,8
Esquizonte (%)	100	91,2 ± 19,7	65,3 ± 8,2	106,1 ± 10,5
Parasitemia (%)	100	112,9 ± 8,8	114,2 ± 5,9	101,0 ± 6,9

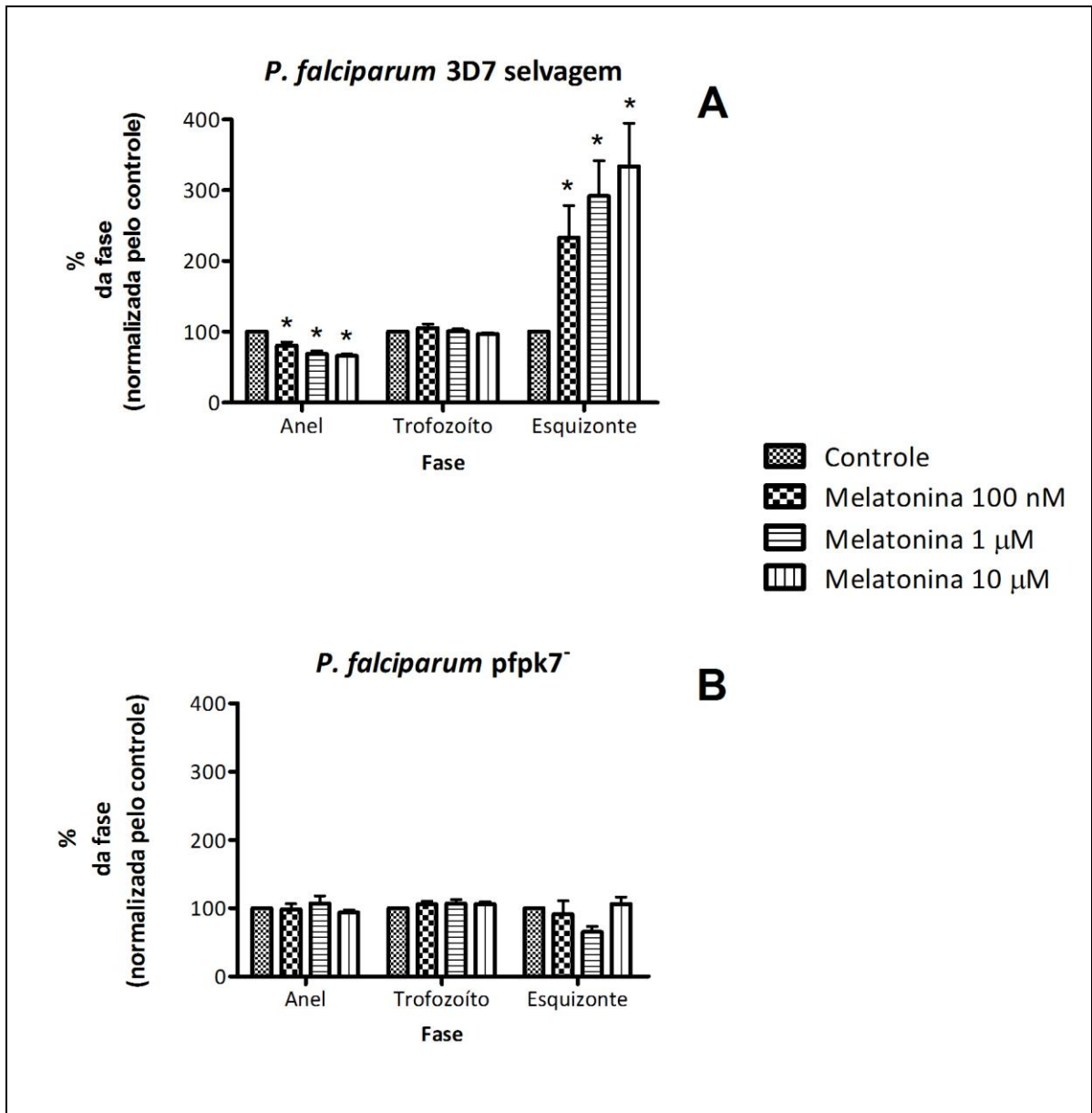


Figura 4.1- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum* em parasitas selvagens (A) e parasitas nocaute para o gene *pfpk7* (*pfpk7*<sup>-</sup>) (B) tratados com melatonina nas concentrações de 100 nM, 1 µM e 10 µM. O controle utilizado foi incubação com o solvente etanol. Os dados foram analisados pelo teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman Keuls. O símbolo \* aponta tratamentos significativamente diferentes do controle, com valor de  $p < 0,05$ . As barras estão no formato média  $\pm$  erro padrão da média.

Em concentrações menores, os parasitas selvagens também apresentaram respostas que indicam uma sincronização de estágios: com 100 nM de melatonina obtivemos queda na média do percentual de anéis (26,6%) e elevação na média do percentual de esquizontes, 64,9%, em relação ao controle com solvente (Quadro 4.2), variações estatisticamente significativas (Figura 4.2A). Para a concentração de melatonina 1µM, a queda na média da porcentagem de anéis em 3D7 foi de 42,3% e o aumento na média da porcentagem de esquizontes foi de 89,9%, em relação ao controle (Quadro 4.2). O estágio de trofozoítos não apresentou variações estatisticamente significativas nesses parasitas (Figura 4.2A), com diminuições da média em relação ao controle de 2,2%, 1,2% e 0,1% respectivamente para as concentrações de 100 nM, 1µM e 10µM de melatonina (Quadro 4.2). A parasitemia não foi significativamente diferente do controle para nenhuma das concentrações de melatonina utilizadas.

Em parasitas *pfpk7* complementados houve redução de 22,7%, 56,2% e 62,3% da média da porcentagem de anéis em relação ao controle em resposta a melatonina 100 nM, 1 µM e 10 µM, respectivamente (Quadro 4.2). Por outro lado, a média de esquizontes aumentou de maneira dose-dependente em parasitas *pfpk7* complementados: para concentrações de 100 nM, 1µM, e 10 µM, o aumento foi de 47,0%, 85,3% e 95,8% em relação ao controle, respectivamente (Quadro 4.2). Quando submetidos à análise estatística, verificamos que a porcentagem normalizada de anéis foi significativamente menor em relação ao controle para todas as concentrações testadas de melatonina, enquanto a porcentagem de esquizontes foi significativamente maior para as concentrações de 1 µM e 10 µM (Figura 4.2B). A parasitemia não foi estatisticamente diferente do controle para nenhuma das concentrações de melatonina testadas.

Esses resultados sugerem fortemente que a proteína PfPK7 está envolvida na via de sinalização por melatonina na modulação do ciclo de *P.falciparum*, uma vez que a ausência do gene codificante (*pfpk7*) bloqueou o efeito de modulação do ciclo (Figura 4.1B), e a reintrodução do gene permitiu uma resposta similar à do parasita selvagem (3D7), Figura 4.2B.

Quadro 4.2- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia normalizados pelo controle (solvente etanol) de cepas 3D7 selvagem e nocaute para pfpk7 complementadas com o gene pfpk7 tratados com melatonina nas concentrações de 100 nM, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e são referentes a três experimentos independentes, cada qual em triplicata.

<b>3D7 selvagem</b>	<b>Solvente (Etanol)</b>	<b>Melatonina 100 nM</b>	<b>Melatonina 1 <math>\mu</math>M</b>	<b>Melatonina 10 <math>\mu</math>M</b>
Anel (%)	100	73,4 $\pm$ 8,1	57,7 $\pm$ 7,5	34,0 $\pm$ 7,6
Trofozoíto (%)	100	97,8 $\pm$ 1,3	98,8 $\pm$ 2,1	99,9 $\pm$ 2,6
Esquizonte (%)	100	164,9 $\pm$ 16,8	189,9 $\pm$ 20,2	239,0 $\pm$ 31,4
Parasitemia (%)	100	131,2 $\pm$ 8,8	123,7 $\pm$ 5,4	124,9 $\pm$ 3,8
<b>pfpk7 complemento</b>	<b>Solvente (Etanol)</b>	<b>Melatonina 100 nM</b>	<b>Melatonina 1 <math>\mu</math>M</b>	<b>Melatonina 10 <math>\mu</math>M</b>
Anel (%)	100	77,3 $\pm$ 9,5	43,8 $\pm$ 6,4	37,7 $\pm$ 5,6
Trofozoíto (%)	100	91,6 $\pm$ 4,7	100,5 $\pm$ 3,1	99,0 $\pm$ 4,3
Esquizonte (%)	100	147,1 $\pm$ 16,8	185,3 $\pm$ 21,6	195,8 $\pm$ 22,1
Parasitemia (%)	100	110,8 $\pm$ 10,9	106,8 $\pm$ 8,8	121,5 $\pm$ 15,5

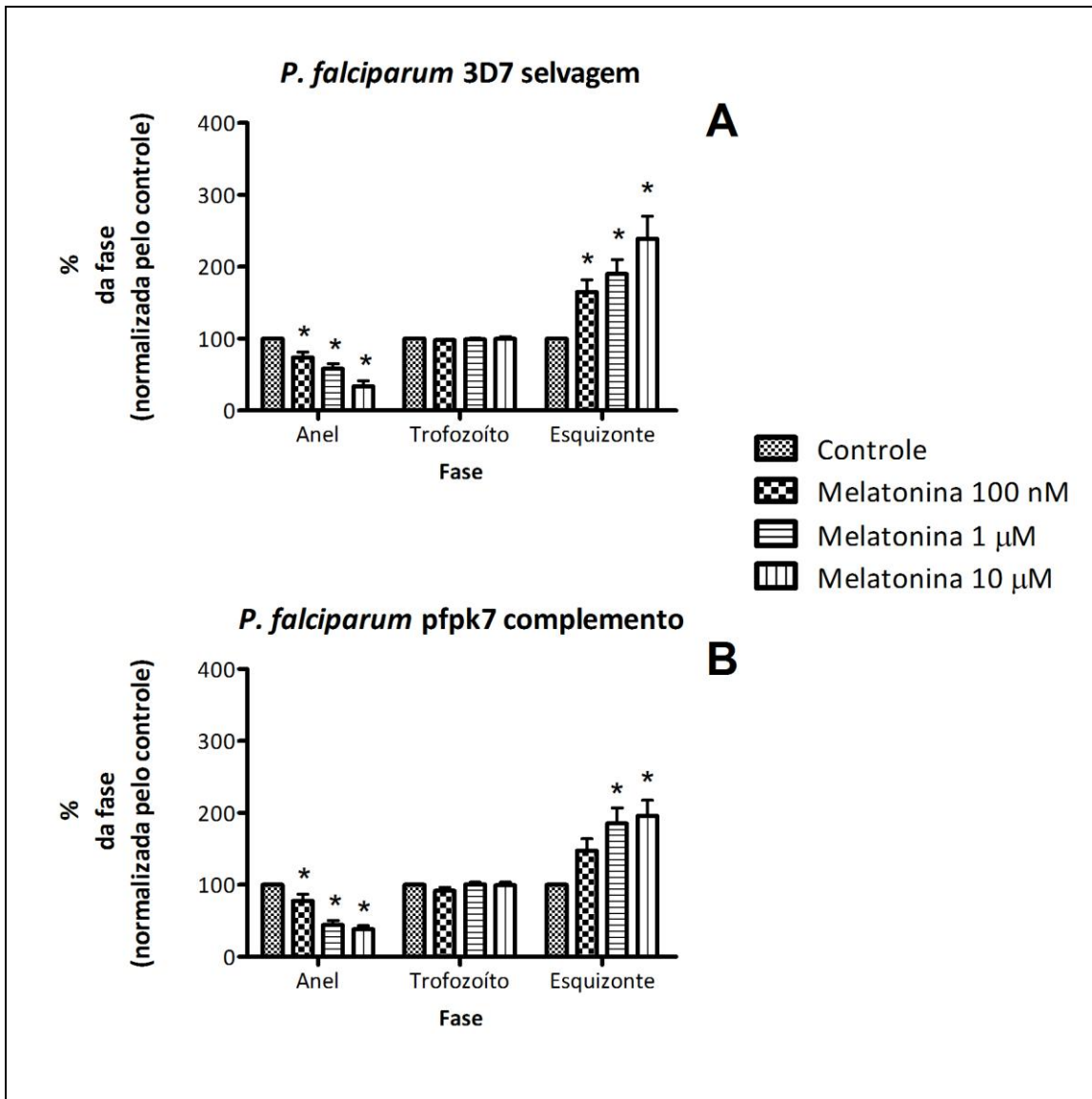


Figura 4.2- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum* em parasitas selvagens (A) e parasitas nocaute para *pfpk7* complementados com o gene (B) tratados com melatonina nas concentrações de 100 nM, 1 μM e 10 μM. O controle utilizado foi a incubação com o solvente etanol. Os dados foram analisados pelo teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman Keuls. O símbolo \* aponta tratamentos significativamente diferentes do controle, com valor de  $p < 0,05$ . As barras estão no formato média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.2 PfPK7 modula o aumento de cálcio citosólico via melatonina em *P. falciparum*

Uma vez que já tenha sido demonstrada a importância da percepção da melatonina pelo parasita para a modulação do ciclo via liberação de cálcio (Beraldo e Garcia, 2005) e que, parasitas *pfpk7*<sup>-</sup>, além de retardamento no desenvolvimento do ciclo assexuado (Dorin-Semlat et al., 2008), apresentaram incapacidade de sincronização do ciclo celular via melatonina, decidimos analisar a capacidade dos parasitas nocaute em aumentar cálcio citosólico após estímulo por melatonina.

A fim de verificar a concentração citosólica de cálcio utilizamos trofozoítos isolados de *Plasmodium falciparum* marcados com indicador de cálcio Fluo-4 com a fluorescência monitorada através de espectrofluorímetro. Como controle positivo utilizamos a cepa 3D7 selvagem, que possui um aumento transiente de cálcio citosólico quando estimulada por melatonina (Beraldo et al., 2007). A figura 4.3A mostra que a adição do hormônio na concentração de 100 nM promove aumento citosólico de cálcio de parasitas no estágio de trofozoíto em meio contendo cálcio extracelular. Em preparações obtidas concomitantemente ao controle positivo, estimulamos trofozoítos isolados de *Plasmodium falciparum* (3D7) nocaute para o gene *pfpk7* (*pfpk7*<sup>-</sup>) com melatonina 100 nM (Figura 4.3B). A análise do gráfico da figura 4.3B demonstra que a adição de melatonina em *P. falciparum* da cepa nocaute para o gene *pfpk7* (*pfpk7*<sup>-</sup>) não é capaz de promover um aumento de cálcio citosólico expressivo. Esse resultado nos levou a questionar se os estoques de cálcio internos do retículo endoplasmático estariam parcialmente depletados no parasita nocaute (*pfpk7*<sup>-</sup>) ou insensíveis à transdução de sinal promovida pelo hormônio. Para investigar essas hipóteses, utilizamos o inibidor de SERCA (cálcio-ATPase de retículo sarcoplasmático) tapsigargina (5 µM). A figura 4.3B mostra que a tapsigargina é capaz de promover a saída de cálcio do retículo endoplasmático em parasitas nocaute (3D7 *pfpk7*<sup>-</sup>) aumentando a concentração de cálcio no citosol do parasita e demonstrando que os estoques internos de cálcio não estavam depletados. De forma similar ao observado na figura 4.3A, a adição de melatonina (100 nM) a parasitas nocaute para *pfpk7* que foram complementados (3D7 *pfpk7*<sup>-</sup> complemento) demonstram que o hormônio é capaz de promover aumento de cálcio citosólico nestas células (Figura 4.3C).

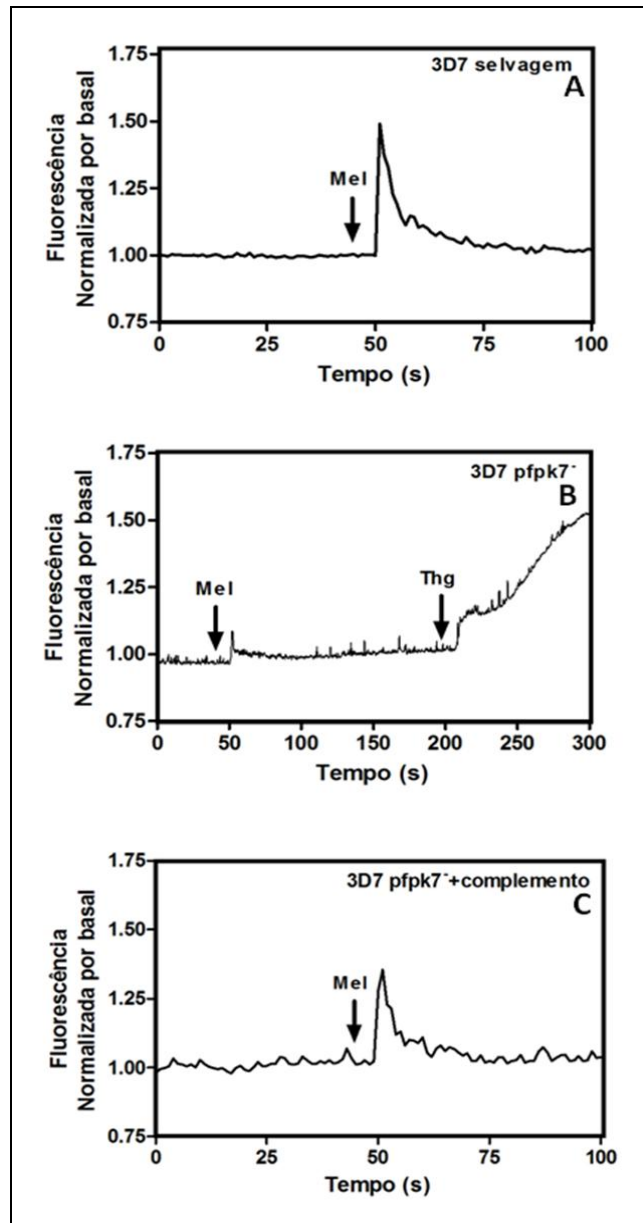


Figura 4.3- Gráficos representativos de aumento de cálcio citosólico em resposta a melatonina (Mel) 100 nM e tapsigargina (Thg) 5  $\mu$ M. A: cepa 3D7 selvagem; B: parasita nocaute para o gene codificante de PK7 (3D7 pfpk7<sup>-</sup>); C: parasita nocaute para PK7 com o gene de PK7 complementado. As setas indicam o momento da adição dos compostos.

Quantificamos o aumento da concentração de cálcio citosólico em resposta à melatonina 100 nM para a cepa 3D7 selvagem, para o nocaute de *pfpk7* e para o complemento de *pfpk7* (Figura 4.4), obtendo valores (média  $\pm$  erro padrão) de  $52 \pm 7$  nM (n=9) para 3D7 selvagem;  $16 \pm 3$  nM (n=12) para o nocaute de *pfpk7* e  $42 \pm 9$  nM (n=9) para o complemento de *pfpk7*. Não observamos aumento significativo de cálcio ao tratarmos os parasitas com o solvente do hormônio, etanol (Figura 4.4). Verificamos que houve uma tendência de diminuição do sinal de cálcio provocado por melatonina em parasitas nocaute para o gene *pfpk7*, enquanto parasitas complementados com *pfpk7* tiveram um aumento de cálcio citosólico provocado por melatonina semelhante a parasitas selvagens (Figura 4.4)

Esses dados sugerem que esta quinase modula, direta ou indiretamente, o aumento de cálcio provocado por melatonina em *P. falciparum*.

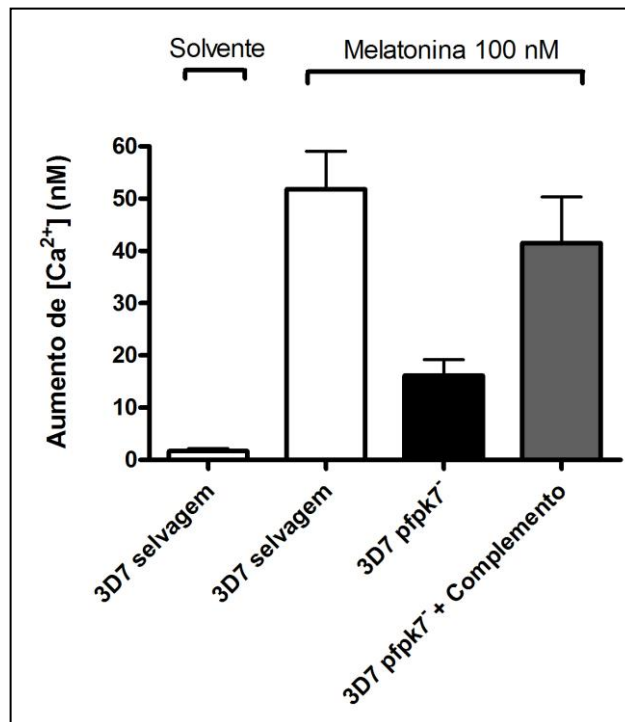


Figura 4.4- Aumento de concentração de cálcio citosólico causado por melatonina 100 nM em cepa selvagem de *Plasmodium falciparum* (3D7 selvagem), parasitas nocaute para o gene *pfpk7* (3D7 *pfpk7*<sup>-</sup>) e parasitas *pfpk7*<sup>-</sup> complementados com plasmídeo contendo o gene *pfpk7* (3D7 *pfpk7*<sup>-</sup> complemento). O solvente utilizado foi o etanol.



Concentrações mais altas do hormônio melatonina (1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) foram utilizadas a fim de se caracterizar a resposta ao hormônio nos parasitas nocaute (pfpk7<sup>-</sup>). Ao utilizarmos melatonina na concentração de 10  $\mu$ M, observamos um aumento de cálcio intracelular de  $148 \pm 42$  nM (n=8) (Figura 4.5). O aumento de concentração de cálcio causado pelo solvente não foi significativo, assim como melatonina na concentração de 100 nM (Figura 4.5), ao passo que observamos aumentos de  $36 \pm 5$  nM (n=7) de cálcio para melatonina na concentração de 1  $\mu$ M. Em conjunto, os dados das figuras 4.4 e 4.5 sugerem que a ausência do gene pfpk7 atenua, porém não abole o sinal de cálcio provocado por melatonina.

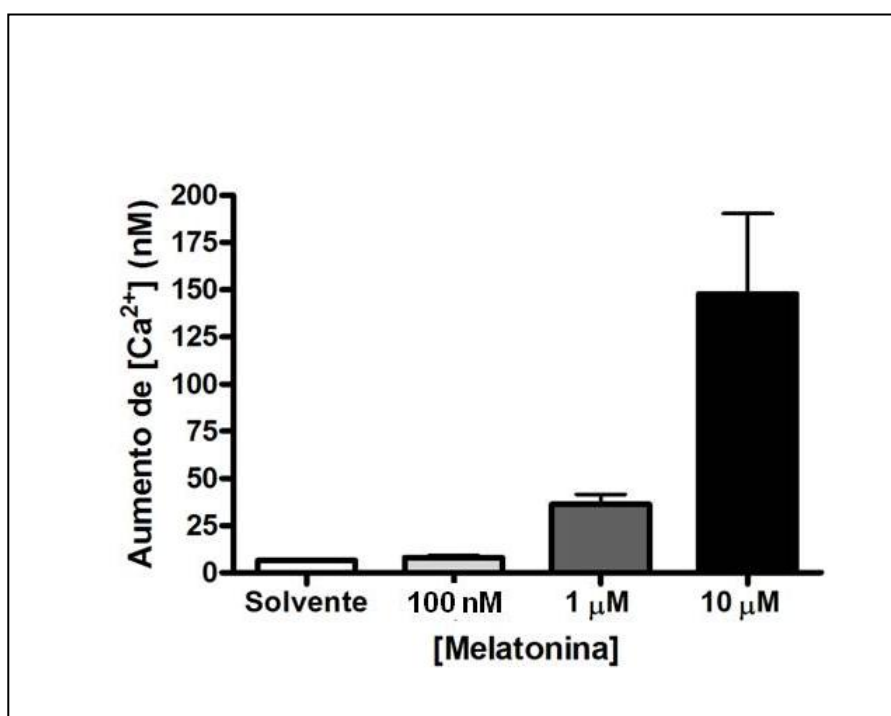


Figura 4.5- Gráfico dose-resposta de parasitas 3D7 pfpk7<sup>-</sup> estimulados com melatonina. O solvente utilizado foi o etanol. A concentração de cálcio foi obtida através de adição de digitonina e EGTA ao final do experimento e a resposta calculada através da diferença de concentração de cálcio no pico da resposta e concentração de cálcio basal.

### **4.3 As proteínas PfNEK2e PfNEK3, cujos homólogos em mamíferos controlam progressão do ciclo celular, não são fundamentais para a modulação via melatonina do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum***

Onze membros das NEKs (proteínas quinases relacionadas às NIMAs – *Never In Mitosis Aspergillus*) foram identificados em tecidos humanos e desempenham funções relacionadas ao ciclo celular (Reininger et al., 2009). Em *Plasmodium*, quatro NIMA quinases foram identificadas no genoma (Reininger et al., 2009).

As quinases NEK2 e NEK3 são importantes reguladoras de proteínas estruturais que controlam o processo de mitose em diferentes sistemas biológicos (O’Connelet et al., 2003). Em *Plasmodium falciparum* foi demonstrado um aumento de RNA mensageiro em estágios assexuais intraeritrocíticos de *pfnek2* (Reininger et al., 2009) e *pfnek3* (Llinas et al., 2006). Desta forma, averiguamos se estas proteínas quinases estariam envolvidas na via de sinalização e modulação do ciclo celular do parasita via melatonina.

A resposta de modulação de ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* frente ao estímulo de melatonina já está bem estabelecida por estudos anteriores (Hotta et al., 2000; Beraldo e Garcia, 2005). Assim, utilizamos em nossos estudos o hormônio melatonina nas concentrações de 100 nM e 1 µM, concentrações comumente empregadas anteriormente. A fim de validar os resultados, utilizamos como controle positivo parasitas selvagens da cepa 3D7.

Em experimentos com a cepa de *P. falciparum* dessincronizada e nocauteada para o gene *pfnek2* (*pfnek2<sup>-</sup>*), tratada durante 24h com hormônio e analisada por contagem de fases em lâminas coradas com Giemsa, observamos uma sincronização do ciclo provocada por melatonina (Figura 4.6B). Obtivemos, com 100 nM melatonina redução da média da porcentagem de anéis de 26,7% em relação ao controle tratado com solvente ao passo que, nos parasitas selvagens, houve redução de 16,7% (Quadro 4.3). O valor foi significativamente diferente do controle apenas para parasitas nocaute (Figura 4.6A e B). Ao utilizarmos 1 µM melatonina observamos redução de 39,8% da média da porcentagem anéis em relação ao controle em *pfnek2<sup>-</sup>*, e, em parasitas selvagens, redução 30,0% em relação ao controle com solvente (Quadro 4.3). Ambos valores foram significativamente diferentes dos controles

(Figura 4.6A e 4.6B). A porcentagem de esquizontes aumentou em ambas as cepas em relação ao controle, para as duas concentrações de hormônio testadas. Em parasitas 3D7 selvagens, o aumento da média da porcentagem de esquizontes foi de 98,5% no tratamento com 100 nM melatonina e 143,2% no tratamento com 1  $\mu$ M de melatonina e, em *pfnek2<sup>-</sup>*, a média da porcentagem de esquizontes aumentou em 59,3% em relação ao controle no tratamento com 100 nM melatonina e em 137,4% quando utilizamos 1  $\mu$ M do hormônio (Quadro 4.3). Todos os aumentos foram estatisticamente significativos em relação aos controles (Figura 4.6 A e B). A porcentagem de trofozoítos em relação ao controle modificou-se significativamente apenas para os parasitas 3D7 (Figura 4.6A), com redução da média da porcentagem de trofozoítos de 10,4% em relação ao controle para a concentração de 100 nM melatonina e 15,0% para a concentração de 1  $\mu$ M melatonina (Quadro 4.3). Em parasitas *pfnek2<sup>-</sup>* tratados com 100 nM de melatonina houve um aumento não estatisticamente significativo da média da porcentagem de trofozoítos (Figura 4.6B) em 1,8%. Para a concentração de 1  $\mu$ M do hormônio houve redução não estatisticamente significativa em 1% da média da porcentagem de trofozoítos em relação ao controle com solvente (Quadro 4.3). As parasitemias, tanto para a cepa 3D7 selvagem quanto para o nocaute (*pfnek2<sup>-</sup>*) não foram estatisticamente diferentes do controle (Quadro 4.3).

Quadro 4.3- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia normalizados pelo controle (solvente etanol) de cepas 3D7 selvagem e pfnek2<sup>-</sup> tratados com melatonina nas concentrações de 100 nM e 1 µM. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média e são referentes a três experimentos independentes, cada qual em triplicata.

<b>3D7 selvagem</b>	<b>Solvente (Etanol)</b>	<b>Melatonina 100 nM</b>	<b>Melatonina 1 µM</b>
Anel (%)	100	83,4 ± 9,0	70,0 ± 7,4
Trofozoíto (%)	100	89,6 ± 3,5	85,0 ± 2,5
Esquizonte (%)	100	198,5 ± 20,1	243,2 ± 25,5
Parasitemia (%)	100	98,8 ± 7,7	98,4 ± 6,4
<hr/>			
<b>pfnek2<sup>-</sup></b>	<b>Solvente (Etanol)</b>	<b>Melatonina 100 nM</b>	<b>Melatonina 1 µM</b>
Anel (%)	100	73,3 ± 7,8	60,2 ± 6,7
Trofozoíto (%)	100	101,8 ± 2,6	99,0 ± 2,3
Esquizonte (%)	100	159,3 ± 23,2	237,4 ± 27,1
Parasitemia (%)	100	111,2 ± 5,1	115,4 ± 6,4

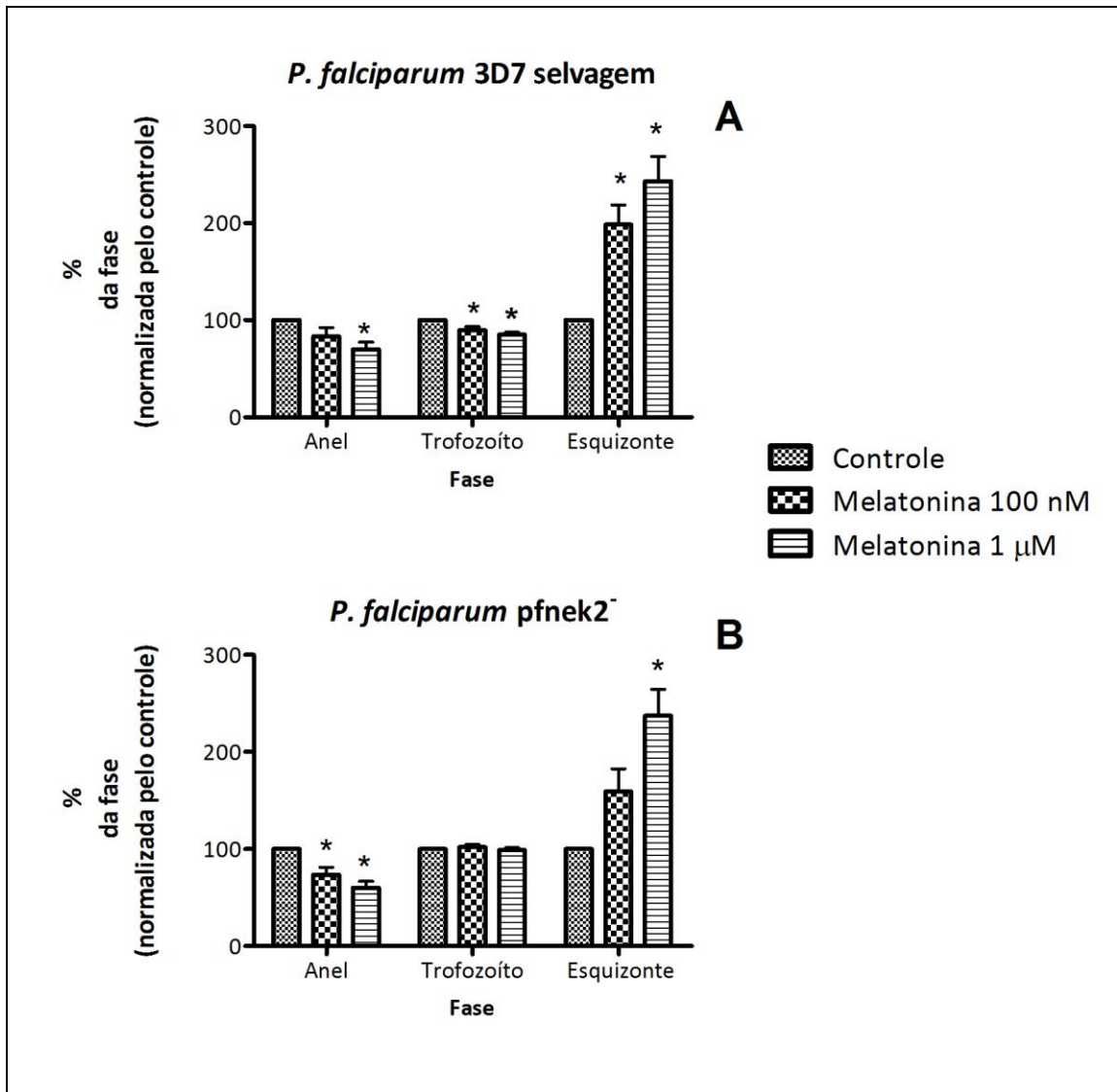


Figura 4.6- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum* em parasitas selvagens (A) e parasitas nocaute para o gene *pfnek2* (*pfnek2*<sup>-</sup>) (B) tratados com melatonina nas concentrações de 100 nM e 1 μM. O controle utilizado foi incubação com o solvente etanol. Os dados foram analisados pelo teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman Keuls. O símbolo \* aponta tratamentos significativamente diferentes do controle, com valor de  $p < 0,05$ . As barras estão no formato média ± erro padrão da média.

Em experimentos com parasitas *P. falciparum* nocaute para o gene *pfnek3* (*pfnek3*<sup>-</sup>), conduzidos da mesma maneira que experimentos com parasitas *pfnek2*<sup>-</sup>, observamos sincronização do ciclo intraeritrocítico provocada por melatonina (Quadro 4.4 e Figura 4.7B). Para a concentração de 100 nM de melatonina, o decréscimo da média da porcentagem de anel em relação ao controle foi de 44,7% em parasitas selvagens e 8,2% em parasitas nocaute (Quadro 4.4), sendo que a diferença foi significativa em relação ao controle para o parasita selvagem (Figura 4.7A), porém não para o parasita nocaute (Figura 4.7B). O aumento da média da porcentagem de esquizonte na mesma concentração, 100 nM, foi 109,3% nos parasitas selvagens e 118,9% em *pfnek3*<sup>-</sup>, em relação ao controle com solvente (Quadro 4.4), sendo que as diferenças foram significativas em relação ao controle (Figura 4.7A e B). Para a concentração de 1 μM de hormônio a redução da média da porcentagem de anéis de parasitas selvagens em relação ao controle foi de 54,9% e de 47,6% para os parasitas *pfnek3*<sup>-</sup>, enquanto que a formação de esquizontes aumentou 148,1% em 3D7 selvagem e 205,5% em *pfnek3*<sup>-</sup>, em relação aos respectivos controles (Quadro 4.4). Esses valores foram significativamente diferentes dos controles (Figura 4.7 A e B). A média da porcentagem de trofozoítos em 3D7 selvagem se manteve similar nas duas concentrações, reduzindo em 2% e 2,8% em relação ao controle para as concentrações de 100 nM e 1 μM de melatonina, respectivamente, valores não significativamente diferentes do controle (Figura 4.7 A). Nos parasitas nocaute para o gene *pfnek3* a redução da média da porcentagem de trofozoítos em relação ao controle foi de 11,0% para 100 nM melatonina e 18,2% para 1 μM do hormônio, sendo significativas as diferenças de ambas as concentrações em relação ao controle com solvente (Figura 4.7B). As parasitemias para a cepa *pfnek3*<sup>-</sup> e 3D7, em todos os tratamentos, não foram estatisticamente diferentes dos controles.

A partir dos resultados podemos sugerir que as proteínas PfNEK2 e PfNEK3 não são fundamentais para a modulação via melatonina do ciclo de *P. falciparum*, pois os efeitos do hormônio (*i.e.*, sincronização do ciclo intraeritrocítico) sobre as cepas nocaute para os genes *pfnek2* (*pfnek2*<sup>-</sup>) e *pfnek3* (*pfnek3*<sup>-</sup>) são similares aos efeitos do hormônio na cepa selvagem 3D7.

Quadro 4.4- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia normalizados pelo controle (solvente etanol) de cepas 3D7 selvagem e pfnek3<sup>-</sup> tratados com melatonina nas concentrações de 100 nM e 1  $\mu$ M. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão e são referentes a três experimentos independentes, cada qual em triplicata.

<b>3D7 selvagem</b>	<b>Solvente (Etanol)</b>	<b>Melatonina 100 nM</b>	<b>Melatonina 1 <math>\mu</math>M</b>
Anel (%)	100	55,3 $\pm$ 5,0	45,1 $\pm$ 7,0
Trofozoíto (%)	100	98,0 $\pm$ 1,5	97,2 $\pm$ 2,1
Esquizonte (%)	100	209,3 $\pm$ 20,3	248,0 $\pm$ 34,8
Parasitemia (%)	100	116,7 $\pm$ 4,0	115,7 $\pm$ 4,9
<b>pfnek3<sup>-</sup></b>	<b>Solvente (Etanol)</b>	<b>Melatonina 100 nM</b>	<b>Melatonina 1 <math>\mu</math>M</b>
Anel (%)	100	91,8 $\pm$ 11,3	52,4 $\pm$ 15,0
Trofozoíto (%)	100	89,0 $\pm$ 2,6	81,8 $\pm$ 1,9
Esquizonte (%)	100	218,9 $\pm$ 24,2	305,5 $\pm$ 15,9
Parasitemia (%)	100	86,6 $\pm$ 3,5	81,9 $\pm$ 3,3

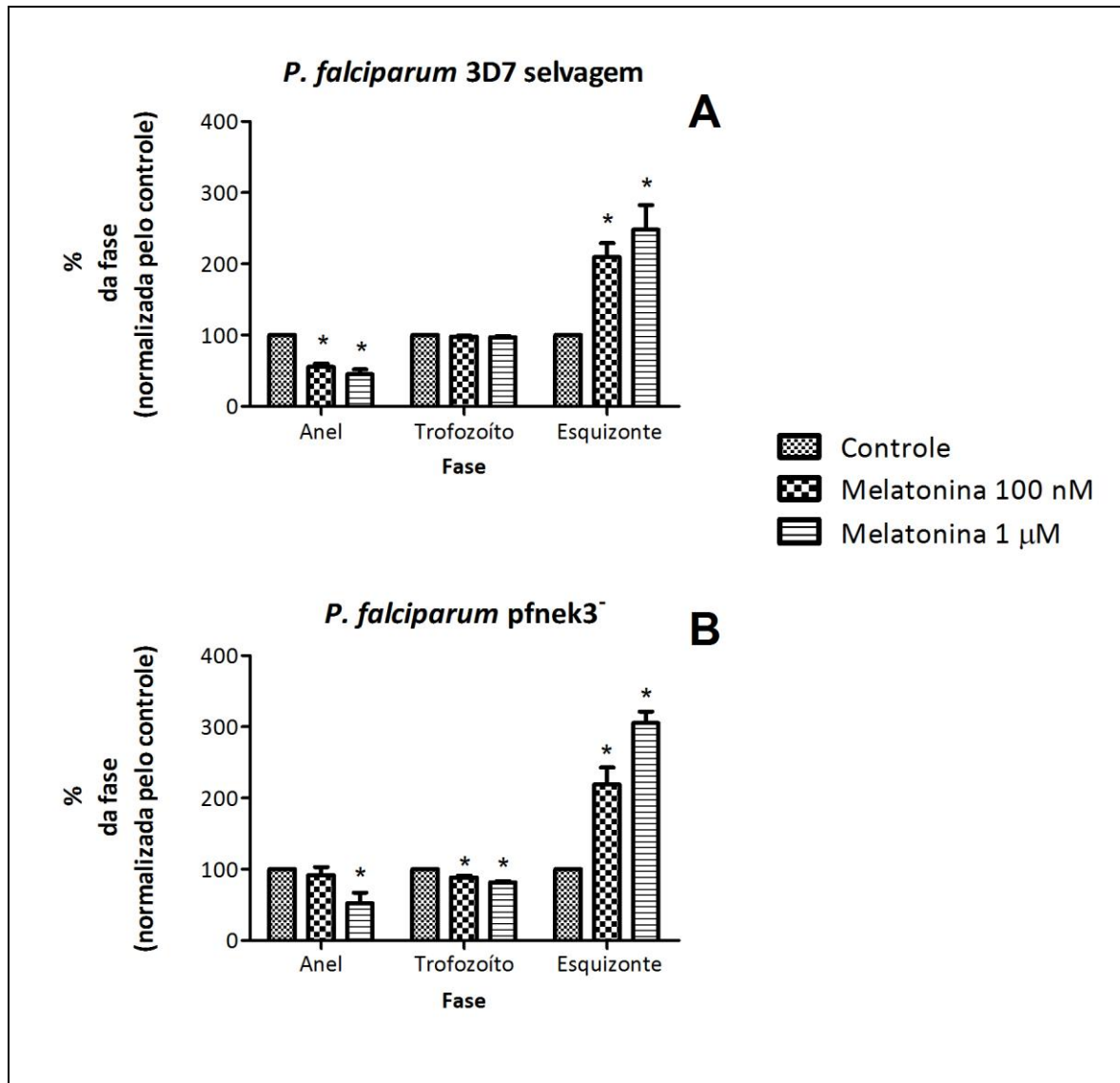


Figura 4.7- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de *Plasmodium falciparum* em parasitas selvagens (A) e parasitas nocaute para o gene *pfnek3* (*pfnek3*<sup>-</sup>) (B) tratados com melatonina nas concentrações de 100 nM e 1 µM. O controle utilizado foi incubação com o solvente etanol. Os dados foram analisados pelo teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman Keuls. O símbolo \* aponta tratamentos significativamente diferentes do controle, com valor de  $p < 0,05$ . As barras estão no formato média  $\pm$  erro padrão da média.



#### **4.4 A proteína PfMAP1, homóloga à MAPK de mamíferos, não é fundamental para a modulação por melatonina e derivados de triptofano do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum***

Uma vez que MAP quinases regulam crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular em diferentes sistemas (Bodart, 2010), investigamos se a via das MAP quinases estaria envolvida na modulação, via melatonina, do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Além da melatonina, utilizamos nos experimentos outros derivados do triptofano (N-acetilserotonina, serotonina e triptamina) conhecidos por promoverem aumento da concentração intracelular de cálcio em trofozoítos e sincronização do ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* (Beraldo e Garcia, 2005). Para esses experimentos, utilizamos a metodologia de citometria de fluxo e um marcador fluorescente de DNA (YOYO-1). O método de marcação com YOYO-1 foi validado para contagem de parasitemia em diversos estudos (Xie *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007, Jiménez-Díaz *et al.*, 2005). A diferenciação de fases jovens e fases maduras foi possível devido à maior quantidade de DNA presente nas últimas. Para delimitarmos janelas de fluorescência para as fases, passamos pelo citômetro amostras infectadas de eritrócitos com parasitas sincronizados nas fases de anel, trofozoíto ou esquizonte (Figura 4.8). Observamos que as fases de anel e trofozoíto têm intensidades de fluorescência com sobreposição considerável, porém parasitas na fase de esquizonte são facilmente distinguíveis das demais por não terem intersecção com as duas últimas (Figura 4.8). Assim, estabelecemos limites de fluorescência para fases jovens (anel e trofozoíto) e maduras (esquizonte), utilizados nos experimentos subseqüentes (Figura 4.8). A parasitemia foi calculada através da divisão do número total de parasitas (fases jovens e maduras) pelo número total de eritrócitos.

Os histogramas obtidos no citômetro de fluxo para parasitas *P. falciparum* da cepa 3D7 (selvagem), utilizados como controle positivo do experimento, indicaram um desvio para valores maiores de fluorescência, em relação ao controle com solvente, de parasitas tratados com derivados de triptofano, sugerindo que houve um aumento da porcentagem de parasitas maduros em resposta aos compostos utilizados (Figura 4.9).

Parasitas 3D7 selvagens apresentaram queda estatisticamente significativa de 11,4% na média da porcentagem de fases jovens ao passo que a média da porcentagem de fases maduras aumentou significativamente em 26,2% para concentração de 100 nM do hormônio melatonina em relação ao controle (Quadro 4.5 e Figura 4.10A). Para a concentração 1  $\mu$ M, o mesmo hormônio provocou redução de 9,1% na média da porcentagem de fases jovens e elevação em 18,5% na média da porcentagem de fases maduras, variações estatisticamente significantes em relação ao controle (Quadro 4.5 e Figura 4.10A). Para o derivado indólico N-acetilserotonina, nas concentrações de 250 nM e 1  $\mu$ M, observamos redução na média da porcentagem de fases jovens em 5,9% e 4,4%, respectivamente, e aumento na média da porcentagem de fases maduras de 25,9% e 13,7%, respectivamente (Quadro 4.5). Os aumentos na porcentagem de fases maduras foram estatisticamente significantes (Figura 4.10A). Ao estimularmos os parasitas com o derivado indólico triptamina, observamos redução de 8,6% na média da porcentagem de fases jovens e elevação em 20,9% na média da porcentagem de fases maduras, para a concentração de 500 nM. O aumento nas fases maduras foi estatisticamente significativo (Figura 4.10A). Para a concentração de 1  $\mu$ M triptamina, observamos diminuição de 4,6% na média da porcentagem de fases jovens e aumento de 20,2% na média da porcentagem de fases maduras em relação ao controle (Quadro 4.5). O aumento nas fases maduras foi estatisticamente significativo (Figura 4.10A). Para serotonina, observamos reduções de 7,5% e 3,9% na média da porcentagem fases jovens em relação ao controle para as concentrações de 250 nM e 1  $\mu$ M, respectivamente, ao passo a média da porcentagem de estágios maduros aumentou, em relação ao controle negativo, em 12,6% para 250 nM e em 21,8% para a concentração de 1  $\mu$ M de serotonina (Quadro 4.5). Os aumentos de nas fases maduras foram estatisticamente significativos para ambas as concentrações de hormônio testadas (Figura 4.10A). As parasitemias não apresentaram variações significativas quando comparadas a parasitas selvagens tratados com o solvente.

Os histogramas obtidos no citômetro de fluxo para parasitas *P. falciparum* nocaute para o gene que codifica para a proteína PfMAP1 (pfmap1<sup>-</sup>) indicaram um desvio para valores maiores de fluorescência, em relação ao controle, de parasitas tratados com

derivados de triptofano sugerindo que houve um aumento de fases maduras em resposta aos compostos utilizados (Figura 4.11).

Em parasitas nocaute para o gene *pfmap1* (*pfmap1*<sup>-</sup>), apesar da redução na porcentagem de fases jovens não ter sido estatisticamente significativa em todos os tratamentos (Figura 4.10B), o aumento na porcentagem de fases maduras foi estatisticamente significativo para todos os derivados de triptamina utilizados e em todas as concentrações empregadas.

Em experimentos realizados com parasitas *pfmap1*<sup>-</sup>, na presença de melatonina na concentração de 100 nM, o aumento da média da porcentagem de fases maduras foi de 50,2% em relação ao controle, ao passo que para a concentração de 1  $\mu$ M de melatonina o aumento foi de 50,0% em relação ao controle (Quadro 4.5). Ambos os aumentos foram estatisticamente significativos (Figura 4.10B).

Nos experimentos similares com parasitas *pfmap1*<sup>-</sup> e o composto N-acetilserotonina observamos que o aumento da média da porcentagem das fases maduras em relação ao controle foi menor do que o observado no tratamento com melatonina (29,2% para a concentração de 100 nM e 21,4% para a concentração de 1 $\mu$ M em relação ao controle), porém ainda assim, estatisticamente significativo (Figura 4.10B).

Em experimentos com parasitas *pfmap1*<sup>-</sup> e o indol serotonina, as elevações da média da porcentagem de fases maduras em relação ao controle foram similares às da N-acetilserotonina: 20,1% para a concentração 250 nM e 26,8% para a concentração de 1 $\mu$ M (Quadro 4.5). As mudanças no percentual de estágios tardios foram estatisticamente significativas (Figura 4.10B).

Nos experimentos realizados com parasitas *pfmap1*<sup>-</sup> e adição de triptamina, observamos que os aumentos da média da porcentagem de fases maduras foram, respectivamente, de 18,6% e 39,5% em relação ao controle para as concentrações de 500 nM e 1 $\mu$ M (Quadro 4.5), sendo estatisticamente significativos (Figura 4.10B).

As parasitemias não foram estatisticamente diferentes do controle em parasitas nocaute, *pfmap1*<sup>-</sup>, para todos os compostos em todas as concentrações utilizadas (Quadro 4.5).

Nossos resultados demonstraram que a ausência do gene *pfmap1* não impede a sincronização do ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* por derivados de triptofano, inferida através do enriquecimento de fases maduras (Figura 4.10B). Dessa maneira, podemos sugerir que a proteína PfMAP1 não é uma quinase fundamental para a sincronização, via melatonina e derivados de triptofano, do ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*.

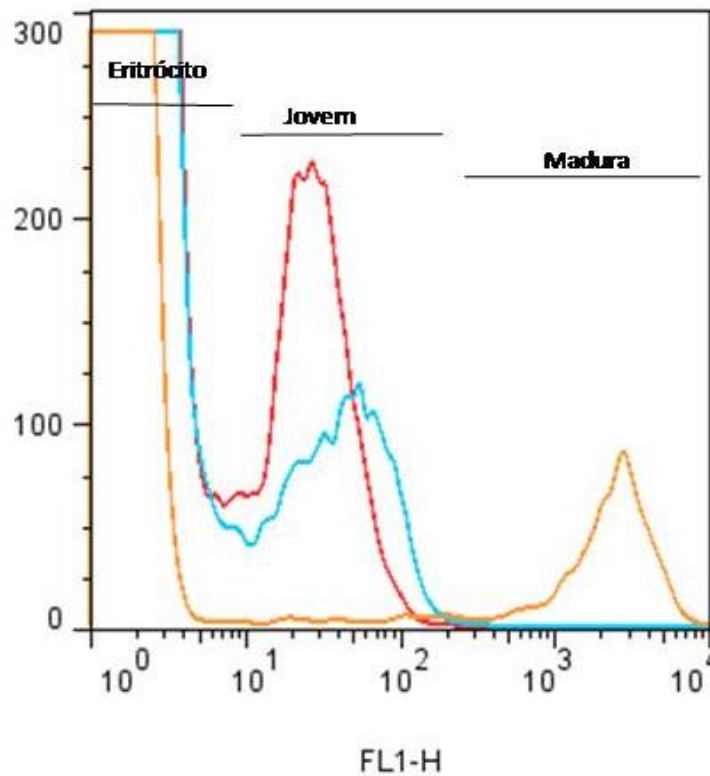


Figura 4.8- Análise de citometria de fluxo de cultura de eritrócitos parasitados com *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7) sincronizados com sorbitol e marcados com YOYO-1. Populações enriquecidas com anel (em vermelho), trofozoíto (azul) e esquizonte (laranja). Este controle (n=10) representa a padronização para o cálculo da porcentagem de fases de desenvolvimento do parasita nos próximos experimentos, utilizando os nocautes de *pfmap1* e *pfeik1* e parasitas selvagens cepa 3D7. FL-1-H: fluorescência em unidades arbitrárias (escala logarítmica) no eixo da abscissa, no eixo da ordenada é apresentado o número de eritrócitos.

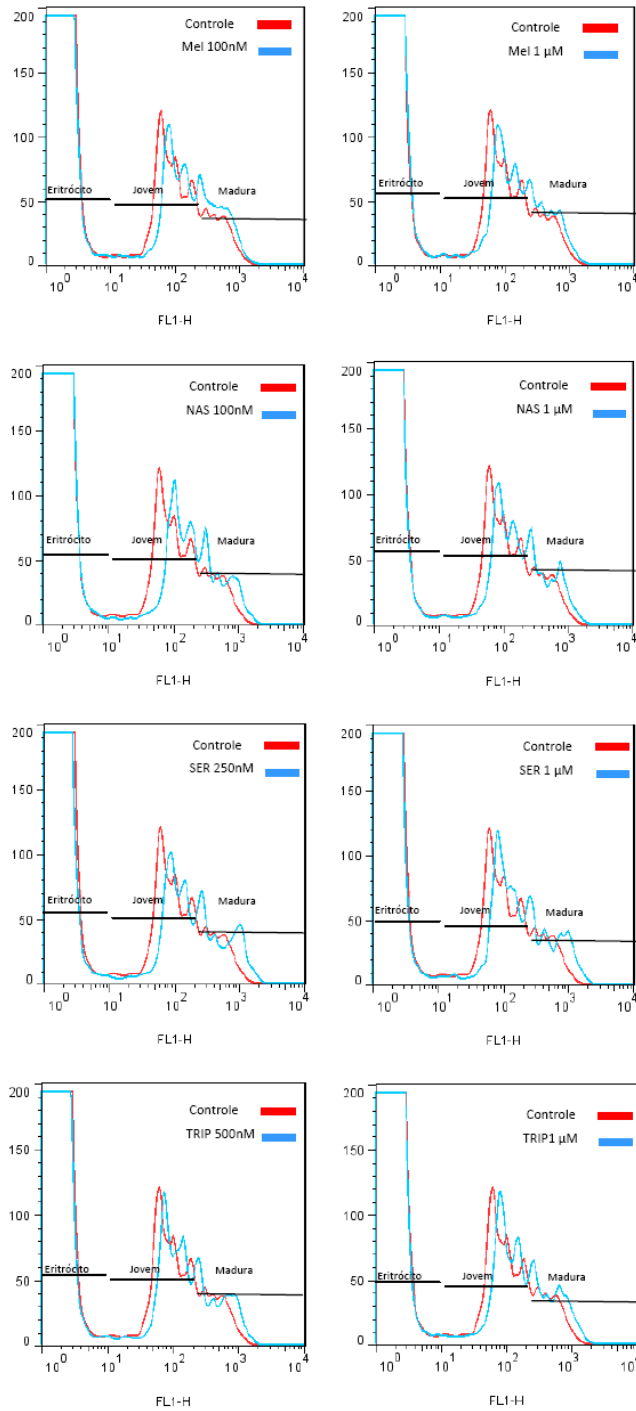


Figura 4.9- Análise de citometria de fluxo de eritrócitos infectados com *P. falciparum* (3D7) selvagens marcados com YOYO-1. Tratamento com derivados de triptofano nas concentrações indicadas, durante 24 horas. Mel: Melatonina, Nas: N-acetilserotonina, SER: Serotonina, TRIP: Triptamina. FL1-H: fluorescência em unidades arbitrárias. No eixo das ordenadas está indicado o número de eritrócitos.

Quadro 4.5- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia normalizados pelo controle (solvente etanol) de cepas 3D7 e pfmap1- tratados com derivados do triptofano nas concentrações indicadas. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão e são referentes a média das duplicatas experimentais, em um mínimo de três experimentos independentes.

<b>3D7 selvagem</b>	Fases Jovens (%)	Fases Maduras (%)	Parasitemia (%)	N
<b>Solvente (Etanol)</b>	100	100	100	6
<b>Melatonina 100 nM</b>	88,6 $\pm$ 2,4	126,2 $\pm$ 2,0	101,3 $\pm$ 1,5	6
<b>Melatonina 1 <math>\mu</math>M</b>	90,9 $\pm$ 0,6	118,5 $\pm$ 0,9	102,7 $\pm$ 1,3	6
<b>N-acetilserotonina 100 nM</b>	94,1 $\pm$ 2,8	125,9 $\pm$ 1,0	99,1 $\pm$ 1,8	6
<b>N-acetilserotonina 1 <math>\mu</math>M</b>	95,5 $\pm$ 4,1	113,7 $\pm$ 5,8	102,9 $\pm$ 1,5	6
<b>Serotonina 250 nM</b>	91,4 $\pm$ 1,3	120,9 $\pm$ 2,9	98,5 $\pm$ 1,9	6
<b>Serotonina 1 <math>\mu</math>M</b>	95,4 $\pm$ 2,0	120,2 $\pm$ 1,6	98,4 $\pm$ 0,8	6
<b>Triptamina 500 nM</b>	92,5 $\pm$ 1,9	112,6 $\pm$ 3,9	98,6 $\pm$ 1,7	6
<b>Triptamina 1 <math>\mu</math>M</b>	96,1 $\pm$ 2,3	121,8 $\pm$ 1,2	101,2 $\pm$ 1,5	6
<b>pfmap1-</b>				
<b>pfmap1-</b>	Fases Jovens (%)	Fases Maduras (%)	Parasitemia (%)	N
<b>Solvente (Etanol)</b>	100	100	100	5
<b>Melatonina 100 nM</b>	90,5 $\pm$ 2,2	150,2 $\pm$ 6,7	103,1 $\pm$ 2,2	4
<b>Melatonina 1 <math>\mu</math>M</b>	90,5 $\pm$ 2,4	150,0 $\pm$ 3,4	110,8 $\pm$ 4,1	4
<b>N-acetilserotonina 100 nM</b>	99,5 $\pm$ 3,0	129,2 $\pm$ 0,8	101,5 $\pm$ 0,7	3
<b>N-acetilserotonina 1 <math>\mu</math>M</b>	98,1 $\pm$ 3,3	121,4 $\pm$ 0,9	101,4 $\pm$ 3,8	3
<b>Serotonina 250 nM</b>	98,5 $\pm$ 2,6	120,1 $\pm$ 3,8	100,5 $\pm$ 3,8	3
<b>Serotonina 1 <math>\mu</math>M</b>	100,6 $\pm$ 5,1	126,7 $\pm$ 8,5	102,7 $\pm$ 1,6	3
<b>Triptamina 500 nM</b>	98,7 $\pm$ 3,4	118,6 $\pm$ 3,9	102,8 $\pm$ 1,2	3
<b>Triptamina 1 <math>\mu</math>M</b>	94,6 $\pm$ 0,3	139,5 $\pm$ 17,9	102,2 $\pm$ 1,1	3

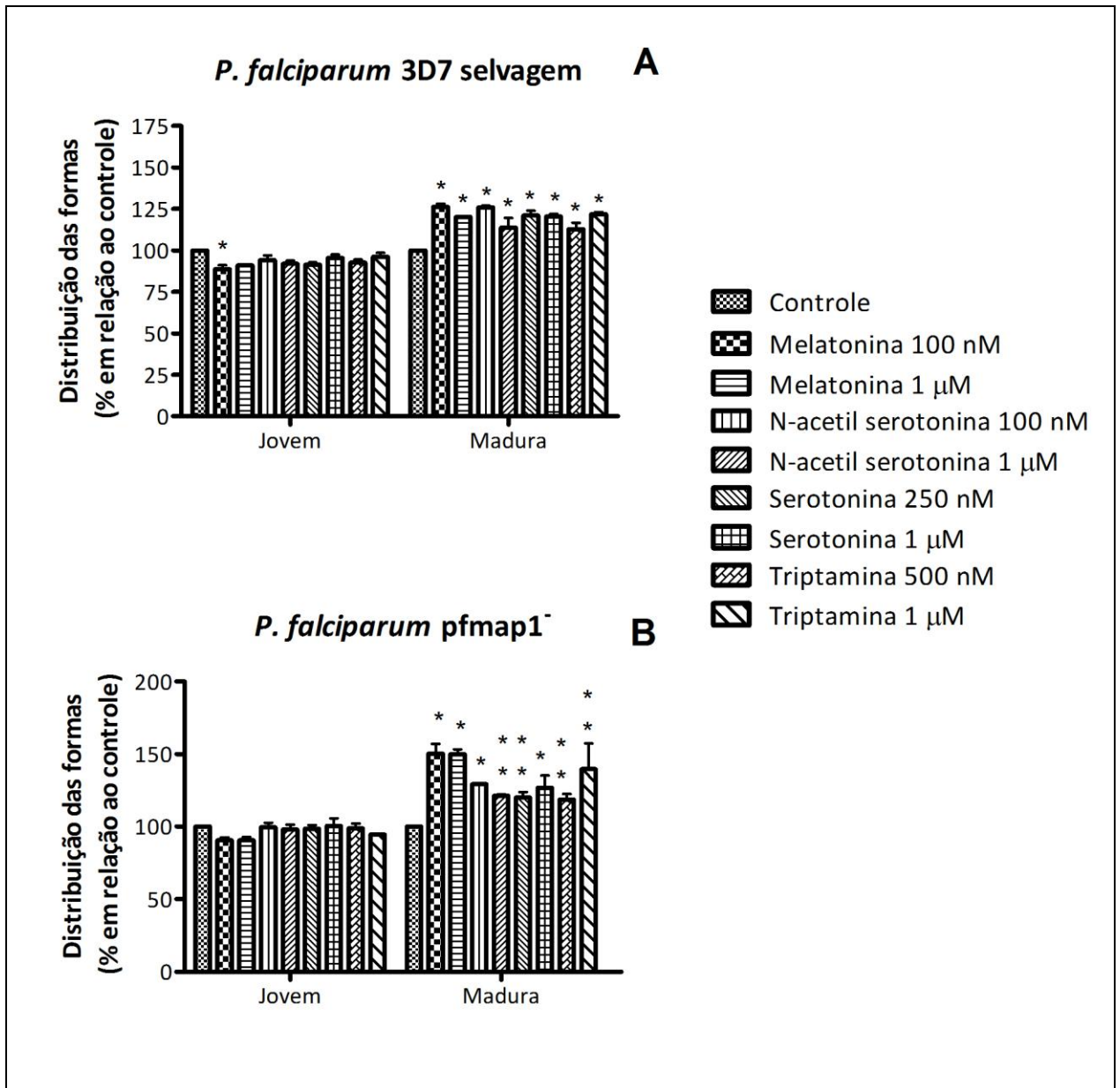


Figura 4.10- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas jovens e tardias de *Plasmodium falciparum* em parasitas selvagens (A) e parasitas nocaute para o gene *pfmap1<sup>-</sup>* (B) tratados com melatonina e outros derivados do triptofano nas concentrações indicadas. O controle utilizado foi incubação com o solvente etanol. Os dados foram analisados pelo teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman Keuls. As barras com dois símbolos \* aponta tratamentos significativamente diferentes do controle, com valor de  $p < 0,01$ . O símbolo único \* aponta tratamentos significativamente diferentes do controle, com valor de  $p < 0,05$ . As barras estão no formato média  $\pm$  erro padrão da média.

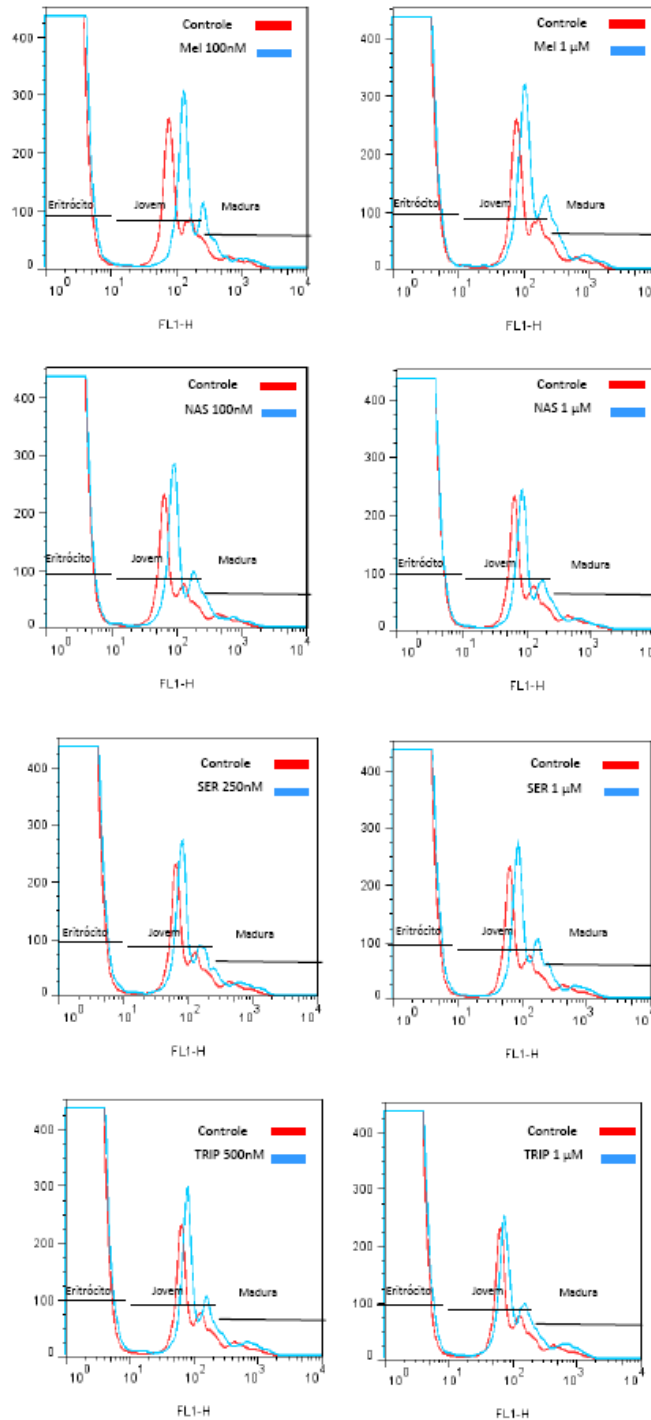


Figura 4.11- Análise de citometria de fluxo de eritrócitos infectados com *P. falciparum* nocaute para *pmap1* marcados com YOYO-1. Tratamento com derivados de triptofano nas concentrações indicadas, durante 24 horas. Mel: Melatonina, Nas: N-acetilserotonina, SER: Serotonina, TRIP: Triptamina. FL1-H: fluorescência em unidades arbitrárias. No eixo das ordenadas está indicado o número de eritrócitos.



#### **4.5 A proteína PfeIK1 é fundamental para a sincronização do ciclo de *P. falciparum* por algumas moléculas derivadas do triptofano**

Nossos estudos também envolveram o nocaute de outro gene codificante para quinase, a pfeik1, um fator de iniciação de transcrição da família das eIF2 $\alpha$  quinases, relacionadas à regulação do ciclo e diferenciação celular (Rhoads, 2001).

A cultura de *P. falciparum* nocaute para o gene pfeik1 foi tratada com melatonina e derivados de triptofano nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente e a contagem de parasitemia foi executada em citômetro de fluxo após marcação do DNA com composto fluorescente (YOYO-1).

Os histogramas obtidos no citômetro de fluxo para parasitas *P. falciparum* nocaute para a proteína pfeik (pfeik1<sup>-</sup>) tratados com derivados de triptofano foram similares aos histogramas do controle, tratados com o solvente etanol (Figura 4.12).

Nos parasitas nocaute para o gene pfeik1 (pfeik1<sup>-</sup>), para todos os compostos e em todas as concentrações utilizadas, não observamos aumento estatisticamente significativo de fases maduras em relação ao controle ou diminuição estatisticamente significativa de fases jovens em relação ao controle (Figura 4.13). A Quadro 4.6 mostra que, ao utilizarmos melatonina 100 nM, a média da porcentagem de fases jovens aumentou 0,02% e fases tardias aumentaram 2,9% em relação ao controle com solvente. Para o mesmo hormônio, a concentração de 1 $\mu$ M promoveu aumento de 2,2% na média da porcentagem de fases jovens e de 0,3% para fases maduras em relação ao controle (Quadro 4.6). N-acetilserotonina promoveu, na concentração de 100 nM, redução de 0,2% na média da porcentagem de fases jovens e redução de 0,3% para as fases maduras, em relação ao controle com solvente, e, para a concentração maior, 1 $\mu$ M, obtivemos aumento de 0,8% na média da porcentagem para as fases jovens e aumento de 1,5% para fases maduras, em relação ao controle (Quadro 4.6). Serotonina, utilizada na concentração de 250 nM resultou em decréscimo de 1,7% na média da porcentagem de fases jovens e elevação de 1,4% na média da porcentagem de fases maduras em relação ao controle com solvente (Quadro 4.6). Na concentração de 1  $\mu$ M a serotonina promoveu aumento na média da porcentagem de

estágios jovens (2,1%) e redução na média da porcentagem de estágios maduros (1,7%) (Quadro 4.6). Triptamina, na concentração de 500 nM, promoveu um aumento de 0,7% na média da porcentagem de estágios jovens e 0,5% na média da porcentagem de estágios maduros em relação ao controle com solvente (Quadro 4.6).

A análise dos resultados nos indica que a ausência do gene *pfeik1* impediu a sincronização dos parasitas por melatonina e outros derivados de triptofano que promovem a modulação do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (Beraldo e Garcia, 2005). Esses resultados indicam que tal qual a PK7, a proteína quinase PfeIK1 está envolvida na modulação do ciclo intraeritrocítico de *P.falciparum* via melatonina.

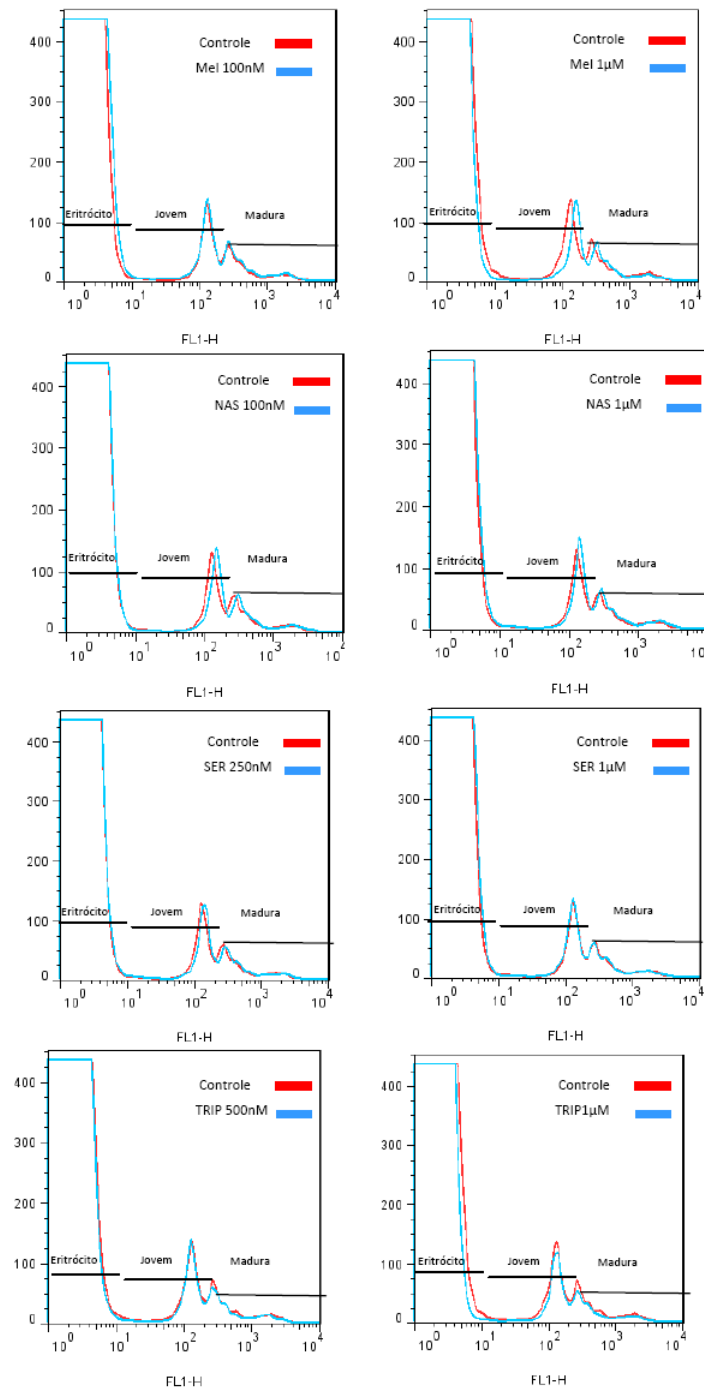


Figura 4.12- Análise de citometria de fluxo de eritrócitos infectados com *P. falciparum* nocaute para pfeik1 marcados com YOYO-1 após tratamento com derivados de triptofano nas concentrações indicadas, durante 24 horas. Mel: Melatonina, Nas: N-acetilserotonina, SER: Serotonina, TRIP: Triptamina. FL1-H: fluorescência em unidades arbitrárias. No eixo das ordenadas está indicado o número de eritrócitos.

Quadro 4.6- Porcentagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia normalizados pelo controle (solvente etanol) de pfeik1- tratados com derivados do triptofano nas concentrações indicadas. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e são referentes a média das duplicatas experimentais, em um mínimo de três experimentos independentes.

<b>pfeik1-</b>	Fases Jovens (%)	Fases Maduras (%)	Parasitemia (%)	N
<b>Solvente (Etanol)</b>	100	100	100	5
<b>Melatonina 100 nM</b>	100,0 $\pm$ 2,3	103,0 $\pm$ 3,3	98,0 $\pm$ 1,2	3
<b>Melatonina 1 <math>\mu</math>M</b>	102,2 $\pm$ 2,0	100,3 $\pm$ 2,3	98,9 $\pm$ 1,0	3
<b>N-acetilserotonina 100 nM</b>	99,8 $\pm$ 1,3	99,7 $\pm$ 2,6	95,1 $\pm$ 1,9	3
<b>N-acetilserotonina 1 <math>\mu</math>M</b>	100,8 $\pm$ 1,2	101,5 $\pm$ 1,5	94,0 $\pm$ 2,2	3
<b>Serotonina 250 nM</b>	101,7 $\pm$ 1,4	98,6 $\pm$ 0,9	95,0 $\pm$ 2,5	3
<b>Serotonina 1 <math>\mu</math>M</b>	102,1 $\pm$ 0,7	98,3 $\pm$ 1,1	96,3 $\pm$ 1,1	3
<b>Triptamina 500 nM</b>	100,7 $\pm$ 1,1	100,5 $\pm$ 0,4	96,7 $\pm$ 2,3	4
<b>Triptamina 1 <math>\mu</math>M</b>	101,7 $\pm$ 1,4	97,6 $\pm$ 2,3	93,2 $\pm$ 2,1	4

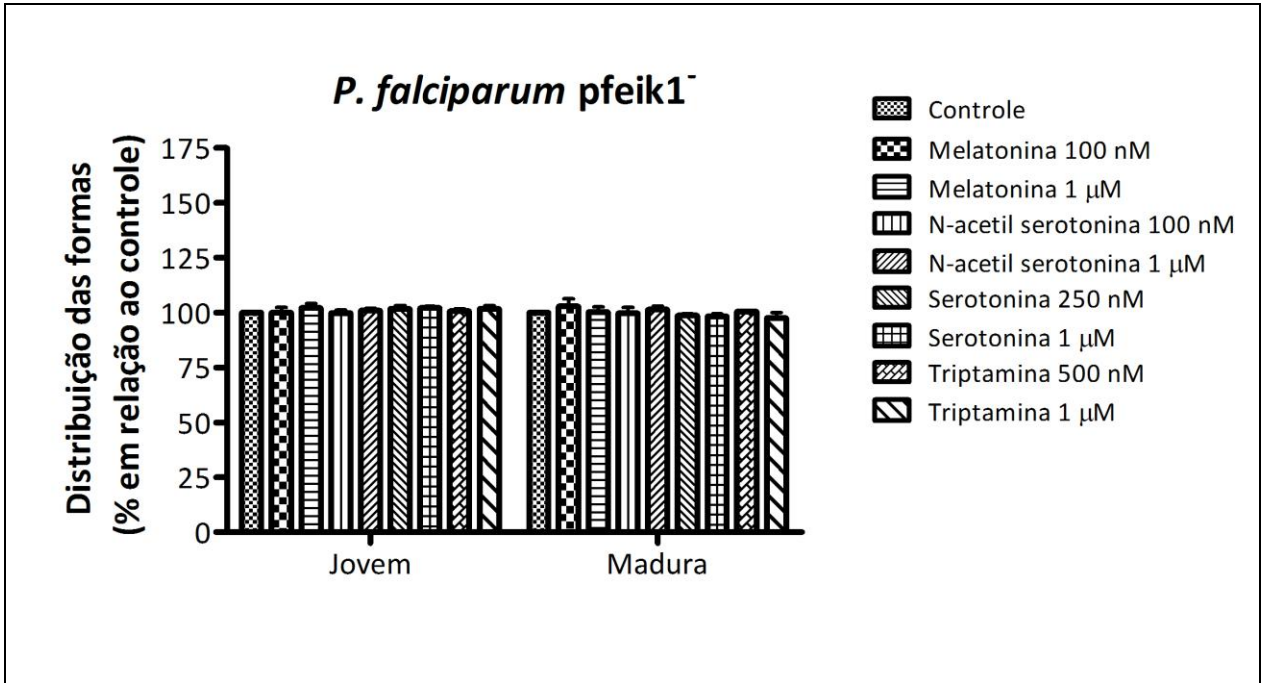


Figura 4.13- Gráfico de distribuição de fases intraeritrocíticas de parasitas *P. falciparum* nocaute para pfeik1 (pfeik1<sup>-</sup>) tratados com melatonina e outros derivados do triptofano nas concentrações indicadas. O controle utilizado foi incubação com o solvente etanol. Os dados foram analisados pelo teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman Keuls.

## 5 DISCUSSÃO

---

Os mecanismos moleculares e celulares que habilitam o *Plasmodium* a perceber e responder ao ambiente intra e extracelular constituem-se em elementos chaves para a proliferação e transmissão da malária. O desenvolvimento do *Plasmodium* ocorre em dois hospedeiros e nestes encontra uma grande diversidade em termos de ambiente, por exemplo: hepatócitos e circulação sanguínea de vertebrados ou no intestino e glândula salivar do inseto. Portanto, a fim de completar seu ciclo de vida o parasita precisa perceber as alterações que ocorrem em seu ambiente e responde de maneira rápida e adequada, por meio do estímulo ou inibição da maquinaria de divisão celular.

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um composto amplamente distribuído, secretado pela glândula pineal de todos os mamíferos, incluindo homem. Em adição, sua presença foi confirmada em muitas plantas (Dubbels et al., 1995; Chen et al., 2003; Paredes et al., 2009) e organismos unicelulares (Balzer e Hardeland, 1991; Hardeland et al., 1995). Melatonina participa do controle de diversas atividades no corpo, incluindo regulação do sono e ritmo circadiano, controle da resposta imune, neutralização de radicais livres e pode ter ainda ações anti-cancerígenas (Pandi-Perumal et al., 2006; Shiu, 2007; Jan et al., 2009; Reiter et al., 2009). Além disso, melatonina também protege os organismos contra infecções bacterianas e virais (Ben-Nathan et al., 1995; Wiid et al., 1999; Bonilla et al., 2004) e foi mostrada ter um papel benéfico na reversão dos sintomas em resposta ao choque térmico (Escames et al., 2006). Alguns dos efeitos de melatonina são mediados via receptor enquanto outros são independentes da ativação de receptores (Reiter et al., 1994; Tan et al., 2007).

Parasitas da malária percebem substâncias químicas ambientais que podem regular seu ciclo de vida. Algumas moléculas derivadas do hospedeiro/vetor podem ser reconhecidas pelo *Plasmodium* incluindo metabólitos derivados do triptofano, por exemplo, melatonina (Hotta et al., 2000; Hotta et al., 2003; Beraldo e Garcia, 2005; Budu et al., 2007) ou ainda o ácido xanturênico, derivado do mosquito vetor e conhecido por promover a indução da exflagelação em gametócitos masculinos (Billker et al., 1998). Dados de nosso

laboratório mostraram que melatonina é capaz de sincronizar o ciclo de vida de *P. falciparum* e *P. chabaudi* *in vitro* e que este efeito é abolido pela co-incubação com luzindol, um antagonista dos receptores MT1/MT2 de melatonina. A sincronia também é perdida *in vivo* em camundongos pinealectomizados e após a injeção de luzindol. Além disso, a administração de melatonina em camundongos pinealectomizados restaura a sincronia (Hotta et al., 2000). Estes dados sugerem que o hormônio melatonina circulante age como um sinal que modula o ciclo celular de *Plasmodium*.

Em contraste aos achados com *P. falciparum* e *P. chabaudi*, melatonina não foi capaz de modular o ciclo, nem promover a elevação na concentração de cálcio intracelular de *P. berghei* ou *P. yoelii*, dois parasitas de roedores que apresentam um desenvolvimento assincrônico *in vivo* (Bagnaresi et al., 2009). Além disso, melatonina não tem efeito sobre a infecção hepática por esporozoítos de *P. berghei*. Estes dados podem fornecer uma base para o entendimento da falta de sincronia nestes parasitas.

Melatonina é capaz de regular o ciclo celular em *P. falciparum* e esta regulação envolve  $Ca^{2+}$  e cAMP como mediadores da resposta (Beraldo et al., 2005). Além disso, foi demonstrado recentemente que melatonina exerce efeitos similares em *P. chabaudi*, um parasita de roedores (Gazarini *et al.*, no prelo). Neste modelo foi observado que melatonina promove o aumento de cAMP e cálcio e ativação de PKA. Em *P. falciparum*, a inibição de PKA usando H89 e/ou PKI bloqueia o crescimento do parasita, sugerindo um papel fundamental para PKA (Beraldo et al., 2005). A resposta de melatonina é acoplada a fosfolipase C a qual promove a liberação de cálcio a partir de estoques intracelulares. O aumento de cálcio dependente de melatonina também foi bloqueado por luzindol e U73122 (um inibidor de fosfolipase C). Tanto luzindol como U73122 inibiram completamente o aumento na parasitemia (Hotta et al., 2000; Hotta et al., 2003). No entanto, permanece a ser estabelecido se os receptores de melatonina presentes em *Plasmodium* estão acoplados a proteínas G, como em mamíferos, ou se outras vias de transdução de sinal estão envolvidas, e quais dos muitos eventos de sinalização que são controlados por cálcio estão envolvidos no processo de maturação de *Plasmodium*.

Alguns estudos têm investigado a fosforilação de proteínas em *Plasmodium* durante os vários estágios do ciclo de vida intraeritrocítico. Durante o desenvolvimento intraeritrocítico, foi verificado que *P. falciparum* induz a fosforilação de diversas proteínas, tanto proteínas próprias como proteínas do eritrócito (Zhao et al., 1994; Magowan et al., 1998). Tanto o processo de invasão como o desenvolvimento do parasita dentro das RBCs são bloqueados por inibidores de quinases (Dluzewski e Garcia, 1996).

O uso de nocautes permite o estudo funcional de genes e seus produtos em *Plasmodium falciparum* (e no modelo de roedores, *Plasmodium berghei*) estão oferecendo informações sobre proteínas quinases, fosfatases, outras proteínas e sobre moléculas que governam o metabolismo de nucleotídeos cíclicos e sinalização por cálcio. Por outro lado, estudos celulares e moleculares auxiliam na elucidação de etapas chave do desenvolvimento do parasita tais como invasão e saída dos merozoítos, controle da replicação do DNA durante o desenvolvimento sexual e assexual, produção de gametócitos no hospedeiro vertebrado e desenvolvimento do parasita no mosquito.

Redes de sinalização mediadas pela fosforilação de proteínas regulam várias respostas celulares a estímulos externos, e alterações nas quinases que controlam estas redes estão ligadas a múltiplos estados patológicos. Quinases são enzimas que transferem um fosfato a um aceptor, o qual pode ser carboidratos, lipídeos ou proteínas. A superfamília de proteínas quinases de eucariotos, responsável pela fosforilação específica de resíduos de tirosina, serina e treonina, é geralmente aceita como a principal reguladora de praticamente todas as atividades em células de eucariotos, incluindo, proliferação, expressão gênica, motilidade, transporte de vesículas, e morte celular programada (Hunter e Avalos, 2000).

Duas análises independentes das quinases de *P. falciparum* baseada em dados da sequência genômica (Gardner et al., 2002) revelaram 85 e 99 genes codificando pra proteínas contendo um domínio de quinase (Ward et al., 2004; Anamika et al., 2005). Apesar da maioria das quinases de *Plasmodium* poderem ser categorizadas em famílias de proteínas quinases bem estabelecidas em eucariotos, algumas são únicas para *Plasmodium*, não apresentando similaridade significativa além daquela presente nos motivos conservados de quinases. Nos últimos anos, várias quinases de *Plasmodium* foram caracterizadas (Dvorin et



al.,2010 ; Merckx et al., 2003; Billker et al., 2004; Kumar et al., 2004; Khan et al., 2005; Reininger et al., 2005; Tewari et al., 2005). Investigar a regulação de quinases específicas de *Plasmodium* e identificar seus alvos celulares pode revelar suas funções na sinalização celular do ciclo do parasita.

Apesar de inúmeros eventos de fosforilação ocorrerem no parasita *Plasmodium* após a invasão de RBCs, as vias de sinalização envolvidas ainda não se encontram bem caracterizadas. Somente recentemente, a função de algumas quinases foi elucidada. O desenvolvimento de nocautes em *P. falciparum*, possibilitará a caracterização bioquímica de quinases específicas de *Plasmodium* e a subsequente identificação de seus alvos celulares nos dará informações valiosas sobre as vias de sinalização do parasita.

Inicialmente, escolhemos como alvo de nossos estudos Pfpk7, uma proteína quinase atípica, com homologia às MEK 3/6 na porção C-terminal, sendo a porção N-terminal similar as PKAs de fungos, tornando-a um alvo interessante se levarmos em consideração tanto a ausência de resposta na modulação de ciclo de *pfpk7* quanto a similaridade da porção N-terminal de Pfpk7 com PKA. Além disso, Dorin-Semblat e colaboradores, demonstraram que Pfpk7 interfere no ciclo de vida intraeritrocítico do *Plasmodium*, uma vez que o nocaute da proteína faz com que os parasitas nocauteados cresçam mais devagar em relação ao grupo controle devido a um desenvolvimento de menor número de merozoítos durante formação dos esquizontes (Dorin-Semblat et al., 2008).

Nossos dados demonstraram por meio de análises de estágios de parasitas após incubação de 24h com melatonina, que o nocaute desta proteína impediu o efeito da transdução do sinal do hormônio melatonina já conhecido para a modulação do ciclo do parasita da malária: sincronização dos estágios nas fases mais maduras do ciclo com consequente redução de estágios mais jovens, acelerando assim, o ciclo de desenvolvimento do parasita. Além disso, estes parasitas quando estimulados com melatonina apresentaram um aumento na concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  menos eficiente que parasitas selvagens, tendo respostas mais expressivas somente em concentrações mais altas do hormônio. Contudo mesmo em concentrações mais altas de melatonina, apesar do aumento dose-dependente de cálcio, ainda assim, não observamos a sincronização dos parasitas no estágio

de esquizonte, sugerindo que além de cálcio, PfPK7 está ativando outro efector que é importante para a sincronização. Estes resultados nos levam a sugerir que esta quinase está envolvida na modulação da resposta de cálcio por melatonina. Estes dados são reforçados pelo fato de que parasitas nos quais a atividade de PfPK7 foi reconstituída apresentaram resposta de sincronia e aumentos similares na concentração de cálcio quando comparado ao parasita selvagem, reforçando a importância desta proteína na sinalização por melatonina.

Ao observarmos os resultados obtidos anteriormente (Beraldo et al., 2005; Gazarini, dados não publicados) verificamos que a resposta de cálcio por melatonina é composta por duas fases: uma dependente de PLC, na qual ocorre liberação de cálcio de estoques intracelulares através do segundo mensageiro IP<sub>3</sub> e outra dependente da ativação de PKA, a qual resulta em uma nova liberação de cálcio tanto de estoques internos quanto influxo, potenciando a resposta de melatonina. Tomando-se com base estes resultados poderíamos sugerir dois cenários que poderiam explicar a participação de PfPK7 na resposta induzida por melatonina.

No primeiro cenário, a ligação de melatonina ao seu receptor, ativaria PLC, resultando em um aumento no cálcio citosólico o qual, ativaria adenilato ciclase levando a um aumento de cAMP, e conseqüente ativação de PfPK7. Lembrando-se que PfPK7 tem um domínio de PKA, a ativação desta resultaria em um feedback positivo que levaria a um incremento na resposta de cálcio, culminando na resposta de sincronização. Contudo, conforme relatado por Beraldo (2005), a atividade de PKA observada após estímulo de *P. falciparum* (cepa 3D7) com melatonina é bloqueada pelos inibidores PKI e H89, porém é sabido que a atividade de PfPK7 não é inibida por estes inibidores, sugerindo que PfPK7, não deve ser a PKA que está sendo ativada por melatonina. Foi identificada em *P. falciparum* uma PKA (PfPKAc) que é inibida tanto por PKI como por H89, levantando a possibilidade de que PfPKAc é a PKA que está envolvida na resposta a melatonina (Syn et al., 2001; Wurtz et al., 2009).

Um cenário alternativo, mas não mutuamente exclusivo, que poderia contribuir para a ação de melatonina é que o aumento de cálcio promovido por PfPK7 é um resultado secundário. Somente o aumento na concentração de cálcio não seria suficiente para a sincronização dos parasitas, PfPK7 pode estar modulando a atividade de uma proteína

efetora, via fosforilação, que é fundamental para que a resposta seja estabelecida, daí a ausência de sincronização nos parasitas nocauteados em *pfpk7*. Isto pode ser corroborado pelo fato que o inibidor de PKA utilizado na cepa 3D7, apesar de bloquear a sincronização dos parasitas, não bloqueia a resposta de cálcio, via melatonina, sugerindo que estas funções estão sendo exercidas por alvos diferentes.

Apesar de termos estabelecido que PfPK7 é um importante efetor de melatonina, a pergunta que permanece em aberto é por qual mecanismo PfPK7 exerce este papel. A identificação de substratos endógenos pode nos ajudar a estabelecer um potencial papel fisiológico para PfPK7 no controle do ciclo celular mediado por melatonina.

Dados de nosso laboratório ainda não publicados sugerem que PfPK7 desempenha um importante papel no controle de proteínas da maquinaria de ubiquitinação. Estudos recentes em leveduras e células de mamíferos têm implicado fosforilação como um mecanismo regulatório importante para algumas E2s (UBC2, UBC3 e UBC6) (Sarcevic et al., 2002; Oh et al., 2006). Em *P. falciparum*, foi demonstrado que a fosforilação da E2 - PfUBC13 - pela quinase PfPK9 regula negativamente a atividade desta, a qual está envolvida no controle de vias não proteolíticas (Philip e Haystead, 2007). Apesar de ubiquitinação estar envolvida na modificação da função de proteínas e também no nível de expressão em eucariotos (Dikic et al., 2009), pouco é sabido sobre estas proteínas em *Plasmodium*.

Em *P. falciparum*, ocorre uma ativação na expressão de genes do sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) predominantemente em esquizontes (Bozdech et al., 2003) o que sugere um importante papel do UPS no desenvolvimento do parasita na fase de esquizogonia, o que é confirmado com o bloqueio do desenvolvimento tanto de *P. falciparum* quanto *P. berghei* pelo inibidor de proteossoma, bortezomibe (Lindenthal et al., 2005; Reynolds et al., 2007; Kreidenweiss et al., 2008). Além disso, foi reportado que em *P. falciparum* a expressão do gene da poliubiquitina (PfpUB, PFL0585w) aumenta nos estágios maduros assim como a ubiquitinação de proteínas em resposta a choque térmico (Horrocks e Newbold, 2000). Estes dados abrem a possibilidade de PfPK7 estar envolvida na resposta de melatonina por meio do controle de proteínas do sistema ubiquitina-proteossoma, podendo regular uma extensa variedade de processos celulares, tais como reparo de DNA e ciclo celular.

Duas MAPKs atípicas estão presentes em *P. falciparum* (PfMAP1 e PfMAP2), mas a ausência de MAPKKs típicas indica que seu modo de ativação difere daquele observado para MAPKs de outros eucariotos (Dorin et al., 2005). Apesar de PfPK7 apresentar máxima homologia a MAPKK3/6 em sua porção C-terminal e como uma enzima recombinante ser capaz de fosforilar uma variedade de proteínas, PfPK7 não foi capaz de fosforilar as duas MAPKs plasmodial, o que torna improvável que PfPK7 seja um homólogo funcional de MAPKK.

No contexto de nossas investigações sobre a importância das quinases nos mecanismos que regulam a multiplicação do parasita, investigamos o papel de PfMAP1 no controle da resposta por melatonina em *P. falciparum*. A proteína PfMAP1 é expressa durante todos os estágios assexuado e em gametócitos (Doerig et al., 1996; Lin et al., 1996; Graeser et al., 1997), tornando-a um alvo interessante em nossos estudos. Assim como PfMAP2, PfMAP1 foi descrita originalmente como um membro da subfamília ERK1/2, as quais estão envolvidas na regulação da proliferação celular/diferenciação em resposta a um estímulo externo. Contudo, análises posteriores (Ward et al., 2004) sugerem que PfMAP1 preferencialmente relaciona-se a ERK-8, e não a ERK1/2. Como ERK7/8 comumente não são ativadas no típico sistema de três componentes (MAPKKK, MAPKK, MAPK)(Abe et al., 2002), a adição de PfMAP1 nesta subfamília parece adequada uma vez que não foram caracterizadas MAPKKs (ou MAPKKKs) típicas em *P. falciparum* (Dorin et al., 2005).

Nossos resultados demonstraram que o estímulo de parasitas deficientes em PfMAP1 com 0,1  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M melatonina, não resultou em uma alteração significativa da resposta quando comparada a cepa 3D7 selvagem, após análise por citometria. Estes resultados sugerem que PfMAP1 é dispensável para a sinalização via melatonina. Embora classicamente MAPKs estejam envolvidas em processos de proliferação ou diferenciação, esta resposta não é surpreendente uma vez que já foi demonstrado que em parasitas nocauteados para esta quinase, pode ocorrer uma compensação através de PfMAP2. Tanto PfMAP1 como PfMAP2 estão presentes em todos os estágios do ciclo assexuado, tornando a complementação mútua uma possibilidade. Estudos de Dorin et al. (2008), demonstraram que parasitas *pfmap1*<sup>-</sup> apresentam concentração elevada de PfMAP2, o que, portanto, abre a possibilidade

de que PfMAP1 pode estar desempenhando alguma função no ciclo celular de *P. falciparum* em resposta à melatonina (Dorin-Semblat et al., 2007). Na ausência de PfMAP1 esta função seria complementada pela enzima PfMAP2. Experimentos adicionais precisariam ser realizados para de fato definir o papel de PfMAP1 na resposta à melatonina em *P. falciparum*.

As proteínas NEKs estão envolvidas no controle da divisão celular e quatro membros estão presentes em *P. falciparum* PfNEK1 – 4 (Anamika et al., 2005). Este fato levantou nosso interesse em investigar a possibilidade destas quinases modularem a sinalização via melatonina. De acordo com nossos resultados de transição no ciclo assexuado, podemos observar que tanto o nocaute para pfnek2 como o nocaute para pfnek3 comportam-se de modo semelhante ao parasita selvagem após tratamento com melatonina, em quaisquer concentrações do hormônio estudado neste trabalho. Estas observações nos levam a concluir que PfNEK2 e PfNEK3 não estão implicadas na resposta desencadeada por melatonina. Estudos realizados por Reininger e colaboradores (Reininger et al., 2009) demonstram que PfNEK2 não é requerida para o processo de esquizogonia intraeritrocítica de *P. falciparum* e *P. berghei*, corroborando os resultados obtidos para este nocaute. Por outro lado, foi demonstrado que a proteína PfNEK3 é capaz de fosforilar PfMAP2 *in vitro* (Low et al., 2009).

Em estudos anteriores, utilizando parasitas deficientes em PfMAP2, foi encontrado que esta é essencial para que *P. falciparum* complete o desenvolvimento intraeritrocítico (Dorin-Semblat et al., 2007). Contudo deve ser lembrado, que PfNEK1 (Dorin et al., 2001) também mostrou-se capaz de fosforilar PfMAP2 em experimentos realizados *in vitro*, o que levanta a possibilidade de que PfNEK1 possa agir como um regulador de MAPK, o que poderia explicar o fato de nocautes para pfnek3 terem respondido de forma similar quando culturas de *P. falciparum* foram submetidas ao tratamento com melatonina. Contudo, não podemos excluir a possibilidade de que a atividade de cada uma destas quinases, quando ausente, possa estar sendo compensada por um aumento da atividade de outro membro da família estudada.

Ampliamos nossos estudos incluindo a análise de parasitas nocauteados no gene *pfeik1*. Em *P. falciparum*, a transição de um estágio do ciclo de vida para o outro deve ser extremamente regulado, a fim de assegurar que os processos de proliferação e diferenciação ocorram de modo apropriado, o que requer um controle fino da síntese de proteínas. A fosforilação de proteínas é um importante método de controle traducional. Um dos mecanismos de controle envolve a fosforilação da subunidade  $\alpha$  do fator de iniciação de tradução de eucariotos 2 - eIF2 $\alpha$  (Dever, 2002).

Foram identificadas três quinases responsáveis pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  em *P. falciparum*: PfeIK1, PfeIK2 e PfPK4 (Ward et al., 2004). IK1 e PK4 são transcritas principalmente durante o ciclo assexuado intraeritrocítico, enquanto que IK2 é pouco expressa durante esta fase. Resultados obtidos por Fennell e colaboradores (Fennell et al., 2009) demonstraram que PfeIK1 fosforila PfeIF2 $\alpha$  em resposta a retirada de aminoácidos do meio de cultura. Além disso, em parasitas nocauteados para *pfeik1* não ocorreu a fosforilação de PfeIF2 $\alpha$ , o mesmo não sendo observado para os nocautes de *pfeik2*, mas uma vez demonstrando a não sobreposição de atividades entre estas proteínas. Neste trabalho é sugerido que a quinase PfeIK1 seria importante em respostas de estresse e que portanto não seria essencial para o ciclo assexuado.

*P. falciparum* cepa 3D7 deficiente em PfeIK1 foi estimulado com melatonina e analisado pela metodologia de citometria de fluxo. Parasitas deficientes em PfeIK1 não apresentaram aumentos similares no número de esquizontes após tratamento por 24 horas com melatonina como já observado para os parasitas 3D7 selvagem e também nos nocautes de *pfnek2*, *pfnek3* e *pfmap1*. Estes resultados nos levam a presumir que PfeIK1 está envolvida na regulação do ciclo celular de *P. falciparum* por melatonina, e que esta proteína possa desempenhar um papel fundamental uma vez que a presença das duas outras quinases, PfeIK2 e PfPK4, não compensou a ausência desta.

Nossos resultados levantam a possibilidade que a fosforilação de PfeIF2 $\alpha$ , a qual em células de mamíferos é usada em resposta a estresse (Proud, 2005), regule a transição de estágios em *P. falciparum* estimulada por melatonina. A utilização de vias que normalmente são induzidas em resposta a estresse em mamíferos, para regulação do ciclo de vida sob

condições normais não é exclusiva de *Plasmodium*. Como exemplo pode ser citado a transformação de taquizoítos de *Toxoplasma* em bradizoítos latentes, a qual é regulada pela fosforilação de TgIF2 $\alpha$ , indicando uma possível função para estas proteínas no processo de diferenciação (Sullivan et al., 2004).

Por outro lado, foi demonstrado que a latência em esporozoítos na glândula salivar e a transformação nos hepatócitos é dependente da regulação da fosforilação de eIF2 $\alpha$  por IK2 em *P. falciparum*. Neste caso a fosforilação de eIF2 $\alpha$  mediada por IK2 não está, aparentemente, relacionada a qualquer tipo de estresse, ao contrário, IK2 é altamente transcrita quando esporozoítos entram na glândula salivar do mosquito, como parte do ciclo normal do parasita (Zhang et al., 2010). Portanto, a fosforilação de eIF2 $\alpha$ , que é usada em células de mamíferos em resposta a estresse, regula a transição entre os estágios em *P. falciparum*.

Beraldo e Garcia (2005) observaram que os precursores de melatonina, N-acetilserotonina, serotonina e triptamina, são capazes de modular o ciclo celular de *P. falciparum* e liberar cálcio de estoques intracelulares como já observado para melatonina. Além disso, estudos realizados por Locher e colaboradores (Locher et al., 2003) relatam que o agonista 8-OHDPAT, o qual é seletivo para o receptor de serotonina 1A, inibe o crescimento de *P. falciparum* *in vitro*. Deste modo, nosso próximo passo foi averiguar como os clones de *P. falciparum* deficientes em PfMAP1 ou PfeIK1, respondiam a N-acetilserotonina, serotonina e triptamina.

Como já mostrado para melatonina, nos parasitas nocautes para pfmap1 ou pfeik1 não houve diferença significativa entre a resposta observada após tratamento com triptamina, serotonina ou N-acetilserotonina e a obtida para estes mesmos nocautes na presença do hormônio melatonina. Deste modo, o nocaute para pfmap1 respondeu com um aumento na porcentagem de esquizonte, enquanto que, no nocaute para pfeik1 não houve um aumento em esquizonte em qualquer um dos compostos observados, mais uma vez reforçando a importância desta quinase na via de sinalização de melatonina.

Beraldo e Garcia (2005) observaram que os efeitos destas indolaminas sobre a modulação do ciclo de *P. falciparum* foi bloqueada pelo uso do antagonista luzindol,

sugerindo que estes compostos estão atuando por um mecanismo de ação via receptor, o qual aparentemente é o mesmo pelo qual melatonina atua.

Com base nos resultados relatados, ampliamos os dados anteriormente publicados para a via de sinalização de melatonina em *P. falciparum* (Hotta et al., 2000; Hotta et al., 2003; Beraldo et al., 2005; Beraldo e Garcia, 2005). Este estudo demonstrou que além da importância já anteriormente demonstrada de segundos mensageiros e PKA na sincronização de *P. falciparum* dependente de melatonina, PfPK7 e PfeIK1 desempenham papel fundamental nesta resposta. Os resultados discutidos acima resumem a complexidade da regulação do ciclo celular de *P. falciparum*.

Propõe-se que o efeito da sincronia do parasita *in vivo* poderia ser uma estratégia do parasita para driblar o sistema imunológico (Hotta et al., 2000), uma vez o aparecimento simultâneo de milhares de merozoítos na corrente sanguínea dificulte a ativação dos mecanismos de defesa do organismo em conseguirem combater eficientemente a cada um destes novos indivíduos infectantes.



## 6 CONCLUSÕES

---

O controle molecular da divisão celular e desenvolvimento de parasitas da malária estão longe de ser compreendidos. Anteriormente nós mostramos que melatonina é capaz de regular o desenvolvimento assexuado de *P. falciparum* e este processo envolve os segundos mensageiros cálcio e AMPc, além de quinases, neste caso PKA. Nesta dissertação nós mostramos que outras quinases, além daquelas sensíveis ao inibidor H89, estão envolvidas na resposta de melatonina: PfPK7 uma quinase órfã que apresenta um domínio de homologia N-terminal a PKA e um domínio C-terminal a MEK3/6 e PfeIK1, a qual tem como alvo a proteína PfeIF2 $\alpha$ .

Quadro 6.1- Resumo dos efeitos das quinases nocauteadas na transdução de sinal do hormônio melatonina para modulação de ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*.

Proteína quinase	Família	Participação evidente na modulação do ciclo intraeritrocítico por melatonina
<b>PfPK7</b>	<b>Órfã</b>	<b>Sim</b>
<b>PfNEK2</b>	<b>Neks/NIMA</b>	<b>Não</b>
<b>PfNEK3</b>	<b>Neks/NIMA</b>	<b>Não</b>
<b>PfMAP1</b>	<b>MAPK</b>	<b>Não</b>
<b>PfeIK1</b>	<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	<b>Sim</b>

Embora nossa compreensão sobre os efetores que regulam a resposta à melatonina no ciclo celular de *P. falciparum* tenha progredido com os estudos aqui relatados, o conhecimento a respeito da sequência em que estas proteínas são ativadas ainda requer maiores estudos. Deste modo, dissecar o mecanismo de atuação destas quinases ampliará nossa compreensão a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na especificidade da transdução de sinal por melatonina para a modulação do ciclo intraeritrocítico em *Plasmodium falciparum*.

## REFERÊNCIAS\*

---

Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, Rosner MR. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16733-43.

Anamika K, Srinivasan N, Krupa A. A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. *Proteins.* 2005;58(1):180-9.

Bagnaresi P. Inter-relação do ritmo e da ação de drogas antimaláricas na infecção da malária de roedores [tese]. São Paulo:Departamento de Fisiologia da Universidade de São Paulo; 2009.

Bagnaresi P, Alves E, da Silva HB, Epiphanyo S, Mota MM, Garcia CR. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med.* 2009;2:47-55.

Balzer I, Hardeland R. Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science.* 1991;253(5021):795-7.

Bannister L, Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol.* 2003;19(5):209-13.

Bannister LH, Dluzewski AR. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells.* 1990;16(2-3):257-92; discussion 293-7.

Barik S, Taylor RE, Chakrabarti D. Identification, cloning, and mutational analysis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Stage-specific expression of the gene. *J Biol Chem.* 1997;272(42):26132-8.

Barkan D, Ginsburg H, Golenser J. Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in *plasmodium*-infected mice. *Int J Parasitol.* 2000;30(5):649-53.

Ben-Nathan D, Maestroni GJ, Lustig S, Conti A. Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. *Arch Virol.* 1995;140(2):223-30.

\*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Beraldo FH. Aspectos comparativos da transdução de sinal na relação parasita hospedeiro [dissertação]. São Paulo:Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo; 2001.

Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol.* 2005;170(4):551-7.

Beraldo FH, Garcia CR. Products of tryptophan catabolism induce Ca<sup>2+</sup> release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res.* 2005;39(3):224-30.

Beraldo FH, Mikoshiba K, Garcia CR. Human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the *P. falciparum* cell cycle. *J Pineal Res.* 2007;43(4):360-4.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):517-29.

Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 1984;312(5992):315-21.

Beyrer C, Suwanvanichkij V, Mullany LC, Richards AK, Franck N, Samuels A, Lee TJ. Responding to AIDS, tuberculosis, malaria, and emerging infectious diseases in Burma: dilemmas of policy and practice. *PLoS Med.* 2006;3(10):e393.

Bhakdi SC, Sratongno P, Chikka P, Rungruang T, Chuncharunee A, Neumann HP, Malasit P, Pattanapanyasat K. Re-evaluating acridine orange for rapid flow cytometric enumeration of parasitemia in malaria-infected rodents. *Cytometry A.* 2007;71(9):662-7.

Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell.* 2004;117(4):503-14.

Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.* 1998;392(6673):289-92.

Bonilla E, Valero N, Chacin-Bonilla L, Medina-Leendertz S. Melatonin and viral infections. *J Pineal Res.* 2004;36(2):73-9.

Boyd GH. Induced variations in the asexual cycle of *Plasmodium cathemerium*. Am. J. Hyg. 1929;9:181-187.

Bozdech Z, Llinas M, Pulliam BL, Wong ED, Zhu J, DeRisi JL. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. PLoS Biol. 2003;1(1):E5.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília:Ministério da Saúde, 2009. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf). Acesso em: 2010 mar 28.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília:Ministério da Saúde, 2007. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder\\_malaria\\_2007\\_web.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2007_web.pdf). Acesso em: 2010 mar 22.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília:Ministério da Saúde, 2008. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder\\_malaria\\_2008\\_final.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf). Acesso em: 2010 mar 20.

Budu A, Peres R, Bueno VB, Catalani LH, Garcia CR. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. J Pineal Res. 2007;42(3):261-6.

Centers for Disease Control & Prevention. Division of Parasitic Diseases. Life Cycle of *Plasmodium* spp. Disponível em: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Malaria_il.htm). Acesso em: 2010 mar 3. Figura.

Chen G, Huo Y, Tan DX, Liang Z, Zhang W, Zhang Y. Melatonin in Chinese medicinal herbs. Life Sci. 2003;73(1):19-26.

Collins WH, Aikawa M. Plasmodia of non-human primates. Parasitic protozoa. 1993;5:105–133.  
Contreras CE, Rivas MA, Dominguez J, Charris J, Palacios M, Bianco NE, Blanca I. Stage-specific activity of potential antimalarial compounds measured in vitro by flow cytometry in comparison to optical microscopy and hypoxanthine uptake. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(2):179-84.

Coppi A, Tewari R, Bishop JR, Bennett BL, Lawrence R, Esko JD, Billker O, Sinnis P. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. Cell Host Microbe. 2007;2(5):316-27.

Corbett Y, Herrera L, Gonzalez J, Cubilla L, Capson TL, Coley PD, Kursar TA, Romero LI , Ortega-Barria E. A novel DNA-based microfluorimetric method to evaluate antimalarial drug activity. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(2):119-24.

Cox-Singh J. Knowlesi malaria in Vietnam. *Malar J.* 2009;8:269.

Dever TE. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell.* 2002;108(4):545-56.

Diaz CA, Allocco J, Powles MA, Yeung L, Donald RG, Anderson JW , Liberator PA. Characterization of *Plasmodium falciparum* cGMP-dependent protein kinase (PfPKG): antiparasitic activity of a PKG inhibitor. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;146(1):78-88.

Dikic I, Wakatsuki S , Walters KJ. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(10):659-71.

Dluzewski AR , Garcia CR. Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of *Plasmodium falciparum* by kinase inhibitors. *Experientia.* 1996;52(6):621-3.

Dobson S, Bracchi V, Chakrabarti D , Barik S. Characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase (PfPPJ) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115(1):29-39.

Doerig C. Malaria: Targeting parasite and host cell kinomes. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804:604-612.

Doerig C, Billker O, Haystead T, Sharma P, Tobin AB , Waters NC. Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends Parasitol.* 2008;24(12):570-7.

Doerig C, Billker O, Pratt D , Endicott J. Protein kinases as targets for antimalarial intervention: Kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1754(1-2):132-50.

Doerig C, Doerig C, Horrocks P, Coyle J, Carlton J, Sultan A, Arnot D , Carter R. Pfcrk-1, a developmentally regulated cdc2-related protein kinase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;70(1-2):167-74.

Doerig CD. Stopping malaria parasites dead in their tracks. *Nat Chem Biol.* 2008;4(6):334-5.

Doerig CM, Parzy D, Langsley G, Horrocks P, Carter R , Doerig CD. A MAP kinase homologue from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Gene. 1996;177(1-2):1-6.

Dorin-Semblat D, Quashie N, Halbert J, Sicard A, Doerig C, Peat E, Ranford-Cartwright L , Doerig C. Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by reverse genetics. Mol Microbiol. 2007;65(5):1170-80.

Dorin-Semblat D, Sicard A, Doerig C, Ranford-Cartwright L , Doerig C. Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Eukaryot Cell. 2008;7(2):279-85.

Dorin D, Le Roch K, Sallicandro P, Alano P, Parzy D, Pouillet P, Meijer L , Doerig C. Pfnek-1, a NIMA-related kinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* Biochemical properties and possible involvement in MAPK regulation. Eur J Biochem. 2001;268(9):2600-8.

Dorin D, Semblat JP, Pouillet P, Alano P, Goldring JP, Whittle C, Patterson S, Chakrabarti D , Doerig C. PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 2005;55(1):184-96.

Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW , Schloot W. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. J Pineal Res. 1995;18(1):28-31.

Dunn PP, Bumstead JM , Tomley FM. Sequence, expression and localization of calmodulin-domain protein kinases in *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. Parasitology. 1996;113 ( Pt 5):439-48.

Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC , Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. Science. 1975;187(4178):748-50.

Dvorin JD, Martyn DC, Patel SD, Grimley JS, Collins CR, Hopp CS, Bright AT, Westenberger S, Winzeler E, Blackman MJ, Baker DA, Wandless TJ , Duraisingh MT. A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. Science. 2010;328(5980):910-2.

Eison AS , Mullins UL. Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in Syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells. Life Sci. 1993;53(24):PL393-8.

Escames G, Acuna-Castroviejo D, Lopez LC, Tan DX, Maldonado MD, Sanchez-Hidalgo M, Leon J , Reiter RJ. Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(9):1153-65.

Fennell C, Babbitt S, Russo I, Wilkes J, Ranford-Cartwright L, Goldberg DE , Doerig C. PfelK1, a eukaryotic initiation factor 2alpha kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, regulates stress-response to amino-acid starvation. *Malar J*. 2009;8:99.

Garcia CR. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol Today*. 1999;15(12):488-91.

Garcia CR, de Azevedo MF, Wunderlich G, Budu A, Young JA , Bannister L. *Plasmodium* in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2008;266:85-156.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM , Barrell B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002;419(6906):498-511.

Gazarini ML, Thomas AP, Pozzan T , Garcia CR. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol*. 2003;161(1):103-10.

Gomes DA. Funções do cálcio nuclear e citossólico na sinalização celular [tese]. Belo Horizonte:da Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

Governo do Estado de São Paulo Superintendência do Controle de Endemias, SUCEN. Portal do Governo do Estado de São Paulo. Malária. 2010. Disponível em <http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/malari.html> Acessado em: 2010 mar 22.

Graeser R, Kury P, Franklin RM , Kappes B. Characterization of a mitogen-activated protein (MAP) kinase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 1997;23(1):151-9.

Greenwood B. Progress in malaria control in endemic areas. *Travel Med Infect Dis*. 2008;6(4):173-6.

Hall RA, Premont RT , Lefkowitz RJ. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol*. 1999;145(5):927-32.

Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* 2003;4(5):111.

Hanks SK , Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J.* 1995;9(8):576-96.

Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, Wolf R, Meyer TJ , Reiter RJ. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res.* 1995;18(2):104-11.

Hardeland R, Pandi-Perumal SR , Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(3):313-6.

Harrison T, Samuel BU, Akompong T, Hamm H, Mohandas N, Lomasney JW , Haldar K. Erythrocyte G protein-coupled receptor signaling in malarial infection. *Science.* 2003;301(5640):1734-6.

Hegyesi H , Csaba G. A calcium-dependent protein kinase is present in tetrahymena. *Cell Biochem Funct.* 1994;12(3):221-6.

Holton S, Merckx A, Burgess D, Doerig C, Noble M , Endicott J. Structures of *P. falciparum* PfPK5 test the CDK regulation paradigm and suggest mechanisms of small molecule inhibition. *Structure.* 2003;11(11):1329-37.

Horrocks P , Newbold CI. Intraerythrocytic polyubiquitin expression in *Plasmodium falciparum* is subjected to developmental and heat-shock control. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;105(1):115-25.

Hotez P, Ottesen E, Fenwick A , Molyneux D. The neglected tropical diseases: the ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. *Adv Exp Med Biol.* 2006;582:23-33.

Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, Varotti FP, Lopes C, Markus RP, Pozzan T , Garcia CR. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol.* 2000;2(7):466-8.

Hotta CT, Markus RP , Garcia CR. Melatonin and N-acetyl-serotonin cross the red blood cell membrane and evoke calcium mobilization in malarial parasites. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(11):1583-7.



Hrabak EM, Dickmann LJ, Satterlee JS , Sussman MR. Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol. 1996;31(2):405-12.

Hunter MG , Avalos BR. Granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in severe congenital neutropenia transforming to acute myelogenous leukemia confer resistance to apoptosis and enhance cell survival. Blood. 2000;95(6):2132-7.

Ishino T, Orito Y, Chinzei Y , Yuda M. A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. Mol Microbiol. 2006;59(4):1175-84.

Jan JE, Reiter RJ, Wasdell MB , Bax M. The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production, and circadian rhythm sleep disorders. J Pineal Res. 2009;46(1):1-7.

Janse CJ, van Vianen PH, Tanke HJ, Mons B, Ponnudurai T , Overdulve JP. *Plasmodium* species: flow cytometry and microfluorometry assessments of DNA content and synthesis. Exp Parasitol. 1987;64(1):88-94.

Kantele A , Jokiranta S. [*Plasmodium knowlesi*--the fifth species causing human malaria]. Duodecim. 2010;126(4):427-34.

Kappes B, Doerig CD, Graeser R. An overview of *Plasmodium* protein kinases. Parasitol Today. 1999;15(11):449-54.

Kappes B, Yang J, Suetterlin BW, Rathgeb-Szabo K, Lindt MJ , Franklin RM. A *Plasmodium falciparum* protein kinase with two unusually large kinase inserts. Mol Biochem Parasitol. 1995;72(1-2):163-78.

Kato N, Sakata T, Breton G, Le Roch KG, Nagle A, Andersen C, Bursulaya B, Henson K, Johnson J, Kumar KA, Marr F, Mason D, McNamara C, Plouffe D, Ramachandran V, Spooner M, Tuntland T, Zhou Y, Peters EC, Chatterjee A, Schultz PG, Ward GE, Gray N, Harper J , Winzeler EA. Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. Nat Chem Biol. 2008;4(6):347-56.

Kaushal DC, Carter R, Miller LH , Krishna G. Gametocytogenesis by malaria parasites in continuous culture. Nature. 1980;286(5772):490-2.

Khan SM, Franke-Fayard B, Mair GR, Lasonder E, Janse CJ, Mann M , Waters AP. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. Cell. 2005;121(5):675-87.

Kim K, Messinger LA , Nelson DL. Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases of *Paramecium*--cloning provides evidence of a multigene family. Eur J Biochem. 1998;251(3):605-12.

Kohidai L, Vakkuri O, Keresztesi M, Leppaluoto J , Csaba G. Melatonin in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*: effects of different lighting conditions. Cell Biochem Funct. 2002;20(3):269-72.

Korf HW, Schomerus C, Stehle JH. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. Adv Anat Embryol Cell Biol. 1998;146:1-100.

Koyama FC, Chakrabarti D , Garcia CR. Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in *Plasmodium*. Mol Biochem Parasitol. 2009;165(1):1-7.

Kreidenweiss A, Kremsner PG, Mordmuller B. Comprehensive study of proteasome inhibitors against *Plasmodium falciparum* laboratory strains and field isolates from Gabon. Malar J. 2008;7:187.

Kumar A, Vaid A, Syin C , Sharma P. PfPKB, a novel protein kinase B-like enzyme from *Plasmodium falciparum*: I. Identification, characterization, and possible role in parasite development. J Biol Chem. 2004;279(23):24255-64.

Lambros C , Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J Parasitol. 1979;65(3):418-20.

Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, Grainger M, Moch JK, Haynes JD, De La Vega P, Holder AA, Batalov S, Carucci DJ , Winzeler EA. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. Science. 2003;301(5639):1503-8.

Li JL , Baker DA. A putative protein serine/threonine phosphatase from *Plasmodium falciparum* contains a large N-terminal extension and five unique inserts in the catalytic domain. Mol Biochem Parasitol. 1998;95(2):287-95.

Li JL, Robson KJ, Chen JL, Targett GA , Baker DA. Pfmrk, a MO15-related protein kinase from *Plasmodium falciparum*. Gene cloning, sequence, stage-specific expression and chromosome localization. Eur J Biochem. 1996;241(3):805-13.

Li Q, Gerena L, Xie L, Zhang J, Kyle D , Milhous W. Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1. Cytometry A. 2007;71(5):297-307.

Lin DT, Goldman ND , Syin C. Stage-specific expression of a *Plasmodium falciparum* protein related to the eukaryotic mitogen-activated protein kinases. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;78(1-2):67-77.

Lindenthal C, Weich N, Chia YS, Heussler V , Klinkert MQ. The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of *Plasmodium* parasites. *Parasitology*. 2005;131(Pt 1):37-44.

Locher CP, Ruben PC, Gut J , Rosenthal PJ. 5HT1A serotonin receptor agonists inhibit *Plasmodium falciparum* by blocking a membrane channel. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(12):3806-9.

Low H, Chua CS , Sim TS. Regulation of *Plasmodium falciparum* Pfnek3 relies on phosphorylation at its activation loop and at threonine 82. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(18):3081-90.

Lye YM, Chan M , Sim TS. Pfnek3: an atypical activator of a MAP kinase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*. 2006;580(26):6083-92.

Macias M, Rodriguez-Cabezas MN, Reiter RJ, Osuna A , Acuna-Castroviejo D. Presence and effects of melatonin in *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res*. 1999;27(2):86-94.

Madeira L, Galante PA, Budu A, Azevedo MF, Malnic B , Garcia CR. Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. *PLoS One*. 2008;3(3):e1889.

Magowan C, Liang J, Yeung J, Takakuwa Y, Coppel RL , Mohandas N. *Plasmodium falciparum*: influence of malarial and host erythrocyte skeletal protein interactions on phosphorylation in infected erythrocytes. *Exp Parasitol*. 1998;89(1):40-9.

Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB , Reiter RJ. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell Mol Biol Res*. 1995;41(5):391-5.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T , Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298(5600):1912-34.

Marte BM , Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(9):355-8.

McCallum-Deighton N , Holder AA. The role of calcium in the invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;50(2):317-23.

Merckx A, Le Roch K, Nivez MP, Dorin D, Alano P, Gutierrez GJ, Nebreda AR, Goldring D, Whittle C, Patterson S, Chakrabarti D, Doerig C. Identification and initial characterization of three novel cyclin-related proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem. 2003;278(41):39839-50.

Messenger EA, Warner AE. The action of melatonin on single amphibian pigment cells in tissue culture. Br J Pharmacol. 1977;61(4):607-14.

Oh RS, Bai X, Rommens JM. Human homologs of Ubc6p ubiquitin-conjugating enzyme and phosphorylation of HsUbc6e in response to endoplasmic reticulum stress. J Biol Chem. 2006;281(30):21480-90.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? Febs J. 2006;273(13):2813-38.

Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ. Phytomelatonin: a review. J Exp Bot. 2009;60(1):57-69.

Philip N, Haystead TA. Characterization of a UBC13 kinase in *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(19):7845-50.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(9):639-50.

Popova JS, Dubocovich ML. Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. J Neurochem. 1995;64(1):130-8.

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. Physiol Rev. 1994;74(3):595-636.

Proud CG. eIF2 and the control of cell physiology. Semin Cell Dev Biol. 2005;16(1):3-12.

Rasmussen H, Kojima I, Kojima K, Zawalich W, Apfeldorf W. Calcium as intracellular messenger: sensitivity modulation, C-kinase pathway, and sustained cellular response. Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 1984;18:159-93.

Reininger L, Billker O, Tewari R, Mukhopadhyay A, Fennell C, Dorin-Semblat D, Doerig C, Goldring D, Harmse L, Ranford-Cartwright L, Packer J , Doerig C. A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *J Biol Chem*. 2005;280(36):31957-64.

Reininger L, Tewari R, Fennell C, Holland Z, Goldring D, Ranford-Cartwright L, Billker O , Doerig C. An essential role for the *Plasmodium* Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. *J Biol Chem*. 2009;284(31):20858-68.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. 1993;49(8):654-64.

Reiter RJ, Tan DX, Erren TC, Fuentes-Broto L , Paredes SD. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther*. 2009;8(4):354-60.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ , Koppisepi S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci*. 2007;52:11-28.

Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD , Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;719:1-12.

Rey. *Parasitologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1991.

Reynolds JM, El Bissati K, Brandenburg J, Gunzl A , Mamoun CB. Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Clin Pharmacol*. 2007;7:13.

Rhoads RE. Signaling pathways for translation: stress, calcium and rapamycin. New York, Springer. 2001.

Sarcevic B, Mawson A, Baker RT , Sutherland RL. Regulation of the ubiquitin-conjugating enzyme hHR6A by CDK-mediated phosphorylation. *Embo J*. 2002;21(8):2009-18.

Satterlee JS , Sussman MR. Unusual membrane-associated protein kinases in higher plants. *J Membr Biol*. 1998;164(3):205-13.

Shapiro HM , Ulrich H. Cytometry in malaria: from research tool to practical diagnostic approach? *Cytometry A*. 2010;77(6):500-1.

Shiu SY. Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. *J Pineal Res*. 2007;43(1):1-9.

Sijwali PS, Kato K, Seydel KB, Gut J, Lehman J, Klemba M, Goldberg DE, Miller LH, Rosenthal PJ. *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(23):8721-6.

Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*. 2003;55(2):325-95.

Singh S, Alam MM, Pal-Bhowmick I, Brzostowski JA, Chitnis CE. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000746.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005;434(7030):214-7.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313(5791):1287-90.

Sullivan WJ, Jr., Narasimhan J, Bhatti MM, Wek RC. Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. *Biochem J*. 2004;380(Pt 2):523-31.

Surolia N, Padmanaban G. Chloroquine inhibits heme-dependent protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(11):4786-90.

Syin C, Parzy D, Traincard F, Boccaccio I, Joshi MB, Lin DT, Yang XM, Assemat K, Doerig C, Langsley G. The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. *Eur J Biochem*. 2001;268(18):4842-9.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H, Reiter RJ. Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J Pineal Res*. 2007;43(4):317-20.

Telford SR. Plasmodia of reptiles. *Parasitic protozoa*. 1994;7:1-71.

Tewari R, Dorin D, Moon R, Doerig C, Billker O. An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol*. 2005;58(5):1253-63.

Trager W , Gill GS. *Plasmodium falciparum* gametocyte formation in vitro: its stimulation by phorbol diesters and by 8-bromo cyclic adenosine monophosphate. J Protozool. 1989;36(5):451-4.

Trager W , Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science. 1976;193(4254):673-5.

van der Heyde HC, Elloso MM, vande Waa J, Schell K , Weidanz WP. Use of hydroethidine and flow cytometry to assess the effects of leukocytes on the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Clin Diagn Lab Immunol. 1995;2(4):417-25.

van Riper C, Atkinson CT , Seed TM. Plasmodia of birds. Parasitic protozoa. 1994;7:73–140.

van Vianen PH, van Engen A, Thaithong S, van der Keur M, Tanke HJ, van der Kaay HJ, Mons B , Janse CJ. Flow cytometric screening of blood samples for malaria parasites. Cytometry. 1993;14(3):276-80.

Ward GE, Fujioka H, Aikawa M , Miller LH. Staurosporine inhibits invasion of erythrocytes by malarial merozoites. Exp Parasitol. 1994;79(3):480-7.

Ward P, Equinet L, Packer J , Doerig C. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. BMC Genomics. 2004;5(1):79.

Wasserman M , Chaparro J. Intraerythrocytic calcium chelators inhibit the invasion of *Plasmodium falciparum*. Parasitol Res. 1996;82(2):102-107.

Westenberger SJ, McClean CM, Chattopadhyay R, Dharia NV, Carlton JM, Barnwell JW, Collins WE, Hoffman SL, Zhou Y, Vinetz JM , Winzeler EA. A systems-based analysis of *Plasmodium vivax* lifecycle transcription from human to mosquito. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(4):e653.

White NJ. The treatment of malaria. N Engl J Med. 1996;335(11):800-6.

World Health Organization. Statistics 09. 2009. Disponível em [http://www.who.int/whosis/whostat/EN\\_WHS09\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS09_Full.pdf) Acessado em: 2010 mar 25.

World Health Organization. World Malaria Report. Geneva, Switzerland,WHO Press.2009.

Wiid I, Hoal-van Helden E, Hon D, Lombard C , van Helden P. Potentiation of isoniazid activity against *Mycobacterium tuberculosis* by melatonin. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(4):975-7.

Wurtz N, Desplans J , Parzy D. Phenotypic and transcriptomic analyses of *Plasmodium falciparum* protein kinase A catalytic subunit inhibition. Parasitol Res. 2009;105(6):1691-9.

Zhang M, Fennell C, Ranford-Cartwright L, Sakthivel R, Gueirard P, Meister S, Caspi A, Doerig C, Nussenzweig RS, Tuteja R, Sullivan WJ, Jr., Roos DS, Fontoura BM, Menard R, Winzeler EA , Nussenzweig V. The *Plasmodium* eukaryotic initiation factor-2alpha kinase IK2 controls the latency of sporozoites in the mosquito salivary glands. J Exp Med. 2010;207(7):1465-74.

Zhao Y, Franklin RM , Kappes B. *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase phosphorylates proteins of the host erythrocytic membrane. Mol Biochem Parasitol. 1994;66(2):329-43.

Zhao Y, Kappes B, Yang J , Franklin RM. Molecular cloning, stage-specific expression and cellular distribution of a putative protein kinase from *Plasmodium falciparum*. Eur J Biochem. 1992;207(1):305-13.