FAHYME COSTA DA SILVA ALMEIDA

**Fatores de *Plasmodium falciparum* envolvidos na
fosforilação de eIF2 α em resposta a melatonina**

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
2015

FAHYME COSTA DA SILVA ALMEIDA

Fatores de *Plasmodium falciparum* envolvidos na fosforilação de eIF2 α em resposta a melatonina

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: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Célia Regina da Silva Garcia

Versão corrigida. Versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB.

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Almeida, Fahyme Costa da Silva.

Fatores de *Plasmodium falciparum* envolvidos na fosforilação de eIF2a em resposta a melatonina / Fahyme Costa da Silva Almeida. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular e celular de *Plasmodium*.

Versão do título para o inglês: *Plasmodium falciparum* factors involved in eIF2a phosphorylation in response to melatonin.

1. *Plasmodium falciparum* 2. Melatonina 3. Biliverdina 4. Quinase 5. Pfk1K1 6. eIF2a I. Garcia, Profa. Dra. Célia Regina da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0186/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fahyme Costa da Silva Almeida.

Título da Dissertação: Fatores de *Plasmodium falciparum* envolvidos na fosforilação de eIF2a em resposta a melatonina.

Orientador(a): Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 13 de novembro de 2014.

PARECER 1205/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, APROVOU o projeto intitulado: "*Papel da quinase Pfk1 na transdução de sinal da melatonina na sincronização de P. falciparum*" da Pesquisadora **Célia Regina.S. Garcia** e aluna **Fahyme Costa da Silva Almeida**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: icb.usp.br.

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 13.11.2015.

Atenciosamente,

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

À minha mãe, por sonhar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo suporte espiritual e esperança de vida.

À minha amada mãe, Kátia, por apoiar e partilhar das minhas escolhas.

À Vovozona Catarina por manter meu anjo da guarda em constante vigília.

À professora Célia pela orientação e oportunidade de fazer parte dessa excelente equipe. Equipe, a qual foi fundamental para desenvolvimento deste trabalho: Maneesh Singh, Lucas Borges, Kênia Lopes, Giulliana Tessarin, Myna Nakabashi, Julio Levano-Garcia, Gepoliano Chaves, Alexandre Budu, Paula Hernandez, Camila, Gabriela e Ricardo, minha gratidão pela convivência e experiências compartilhadas; especialmente à Miriam Moraes, pelos ensinamentos e conselhos, você é uma pessoa abençoada; à Laura Cruz e ao Pedro Scarpelli pela presteza durante alguns experimentos; e ao Mateus Pecenin pela companhia nos experimentos insanos.

Aos amigos Raphael e Vinicius por fazer de São Paulo um pedacinho de Minas Gerais.

A todos os funcionários do IB e ICB por tornarem essa caminhada possível.

À CAPES pelo financiamento do projeto de pesquisa.

E a todos os amigos que, mesmo de longe, ansiavam por esse momento, compartilho essa alegria com vocês. Done! Enfim, mestre!

RESUMO

ALMEIDA, F. C. S. **Fatores de *Plasmodium falciparum* envolvidos na fosforilação de eIF2 α em resposta a melatonina.** 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A malária é causada por parasitas do gênero *Plasmodium* (Filo Apicomplexa), e é considerada uma das doenças infecciosas que mais afeta seres humanos no mundo. O parasita apresenta um ciclo de vida complexo, sendo a fase intraeritrocítica responsável pela patogênese. A invasão do *Plasmodium* induz várias mudanças estruturais e bioquímicas na célula hospedeira. Embora vários aspectos da biologia do parasita ainda sejam desconhecidos, é sabido que a regulação do ciclo intraeritrocítico é crítica para a sua compreensão. Desvendar os mecanismos das vias de transdução de sinal gerados pelo parasita é uma questão fundamental, considerando-se a resistência à artemisinina e a urgência para o desenvolvimento de novas estratégias de combate à doença. A melatonina modula o ciclo de *P. falciparum* e *P. chabaudi*, pois promove a sincronização do parasita com o ciclo circadiano. Entretanto, o mecanismo de transdução de sinal pela molécula é parcialmente caracterizado e envolve variações citosólicas de cálcio, AMPc culminando com a ativação da PKA. Dado que modificações pós-traducionais participam efetivamente da via de sinalização, levam a crer que diversas proteínas do parasita que exibam atividade de quinase estejam envolvidas na sinalização por melatonina. A proteína quinase PfPK7, por exemplo, é essencial para a transdução do sinal de melatonina. Em eucariotos o controle da expressão gênica através de fosforilação por proteínas quinases pode interferir tanto na transcrição quanto na tradução de genes. Um mecanismo conhecido trata do fator eIF2 que, quando fosforilado em sua subunidade α , ativa a tradução de mRNAs em resposta a estímulos de situações desfavoráveis. Análises *in silico* mostraram que o genoma de *Plasmodium falciparum* codifica três proteínas quinases capazes de fosforilar a eIF2 α e, assim, modular a atividade eIF2 α : PfeIK1, PfeIK2 e PfPK4. Neste trabalho investigamos o papel da PfeIK1 na via de transdução de sinal de melatonina usando parasitas *P. falciparum* nocautes para PfeIK1. Além disso, os efeitos de metabólitos da degradação de heme sobre a fosforilação de eIF2 α foram analisados. Os resultados sugerem que os mecanismos de fosforilação e defosforilação de eIF2 α são relevantes para a resposta do parasita ao tratamento com hemina ou biliverdina; por outro lado, neste trabalho não se pode verificar a mesma relevância em relação à melatonina, uma vez que não verificamos um aumento de fosforilação de eIF2 α quando comparados aos níveis basais. Assim os dados observados indicam a PfeIK1, juntamente com a PfK7 e PKA, como quinases-chaves para o controle do desenvolvimento do parasita durante o ciclo intraintraeritrocítico.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*. Melatonina. Biliverdina. Quinase. PfeIK1. eIF2 α .

ABSTRACT

ALMEIDA. FCS. *Plasmodium falciparum* factors involved in eIF2 α phosphorylation in response to melatonin. 2015. 90 p. [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Malaria is caused by the Apicomplexan parasite *Plasmodium* and is considered one of the most lethal infectious diseases that affect human beings. The parasite has a complex life cycle, in which the intraerythrocytic phase is responsible for the pathogenesis and induces several biochemical and structural changes within host cell. Although some aspects of the biology of the parasite are still not clear, it is known that the intraerythrocytic cycle regulation is critical for understanding the *Plasmodium* life cycle. Unraveling the mechanisms of signal transduction pathways engendered by the parasite is a fundamental question, considering the resistance to artemisinin and the urgency for development of new strategies to combat the disease. Melatonin modulates the intraerythrocytic phase of *P. falciparum* e *P. chabaudi* promoting synchronization. Although, the signal transduction mechanism induced by melatonin is partially characterized, the role of calcium AMPc and PKA is now recognized. Since post translational modifications actively participate in signal transduction pathways, we have searched for the role of phosphorylation in this process as in addition of PKA, the PfPK7 kinase is also essential the melatonin signal transduction. In eukaryotes the control of gene expression via protein phosphorylation kinases can interfere with gene transcription and translation. The eIF2 α factor is able to activate translation of mRNAs in response to unfavorable situations. In silico analyzes showed that *Plasmodium falciparum* genome encodes three protein kinases that able to phosphorylate the eIF2 α and thus, modulate eIF2 α activity: PfeIK1, and PfeIK2 PfPK4. In this work, we have investigated the role of PfeIK1 in melatonin signal transduction using transgenic parasite (unable to express PfeIK1). Furthermore, we have also analysed the impact of heme and biliverdin, involved in heme metabolism in *Plasmodium* on their ability to phosphorylate eIF2 α . Our results suggest that the mechanism of phosphorylation and dephosphorylation of eIF2 α may be relevant to the response of the parasite to the treatment with haem or biliverdin, placing this factor as an important modulator of parasite cell cycle. On the other hand, we could not observed an increase of phosphorylation of eIF2 α in comparison to what was observed under basal conditions. In conclusion, PfeIK1, PfPK7 and PKA are key kinases for the development of the parasite during intraerythrocytic cycle.

Keywords: *Plasmodium falciparum*. Melatonin. Biliverdin. Kinase. PfeIK1. eIF2 α .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_{cit} – Cálcio citosólico

3D7 – *Plasmodium falciparum* 3D7

AC – Adenilato ciclase

AGC – Grupo de quinases que incluem PKA, PKG e PKC

AMPc – Adenosina monofosfato cíclica

ANOVA – Análise de variância

ATF4 – Fator ativador de transcrição 4 (*Activating Transcription Factor 4*)

ATP – *Adenosin Triphosphate*

BAPTA – *1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*

BSA – Albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)

CAM – Calmodulina

CamK – Quinase dependente de cálcio/calmodulina (*Calcium/calmodulin-dependent kinase*)

CDK – Quinase dependente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase*)

CP – Corpos de processamento

CHOP – Proteína homóloga a C/EBP (*C/EBP Homologous Protein*)

CIP – Fosfatase alcalina de intestino de bezerro (*Calf-intestinal alkaline phosphatase*)

CK1 – Caseína quinase 1 (*Casein Kinase 1*)

CLK – *CDC-Like Kinase*

CMGC – Grupo de quinases que incluem CDKs, MAPKs, GSK3s e CLK

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol (*4'6-diamidino-2-phenylindole*)

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

ECC – Entrada capacitativa de cálcio

ECL – *Enhanced Chemiluminescence*

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

eIF – *eukaryotic Initiation Factor* (Fator de Iniciação de Tradução eucariótico)

EGTA – *Ethylene glycol tetraacetic acid*

ER ou RE – *Endoplasmatic Reticulum* (Retículo endoplasmático)

FACS – *Fluorescence-activated cell sorting*

FDE – Fosfodiesterase (*PDE, Phosphodiesterase*)

GADD34 – *Growth-arrest- and DNA-damage-induced transcript 34*

GDP – Guanosina difosfato (*Guanosin Diphosphate*)

GE – Grânulos de estresse

GEF – *Guanine nucleotide exchange factor*

GNC2 – *General control non-derepressible 2*

GSK3 – *Glycogen synthase kinase 3*

GPCR – Receptor acoplado à proteína G (*G-Protein-coupled Receptor*)

GTP – *Guanosin Triphosphate*

HEPES – *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HRI – *Heme-regulated eIF2 α kinase*

HRP – *Horseradish peroxidase*

hsp – *Heat Shock Protein*

IgG – Imunoglobulina G

IP – Imunoprecipitação

IP3 – *Inositol triphosphate*

IP3R – *Inositol triphosphate Receptor*

ISR – Resposta Integrada ao Estress (*Integrated Stress Response*)

m/v – Massa/volume

MAPK – *Mitogen activated protein kinase*

ME – membrana do eritrócito

Mel/MEL – Melatonina

MP – Membrana plasmática

mRNA – RNA mensageiro

MVP – Membrana do vacúolo parasitóforo

N – Núcleo

NIMA/NEK – *Never in Mitosis gene A*

OMS – Organização Mundial da Saúde

ON – *Overnight*

PAB – Cauda Poli-A

PABP – Poli-(A) *binding protein*

Par – Parasita

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)

PCR – *polymerase chain reaction*

PERK – *PKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase*

P-eIF2 α – Fator de iniciação da tradução de eucarioto 2 α fosforilado

PfeIK1⁻ – *Plasmodium falciparum* nocaute para eIK1

pfsr 25 - *Plasmodium falciparum* serpentine receptor 25, proteína

PFSR25 - *Plasmodium falciparum* serpentine receptor 25, ORF

Pi – *Inorganic phosphate*

PK7 – Proteína quinase 7

PKA – *Protein kinase A*

PKB – *Protein kinase B*

PKC – *Protein kinase C*

PKG – *Protein kinase G*

PKI – *Protein kinase A inhibitor*

PLC – *Phospholipase C*

PLC β – *Phospholipase C beta*

PMCA – *Plasma membrane calcium ATPase*

PMSF – *Phenylmethanesulfonylfluoride*

Proteína G – Proteína ligante de nucleótídeos de guanina

PVDF – (*Polyvinylidene fluoride*)

PVM – *Parasitophorous vacuole membrane*

RBC – *Red Blood Cells* (eritrócitos)

RE – Retículo endoplasmático

RNA – *Ribonucleic acid*

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SDS – *Sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SERCA – *Sarco Endoplasmatic Reticulum Ca²⁺-ATPase*

T – Trofozoíto

TBS-T – (*Tris Buffered Saline – Tween 20*)

THG – Tapsigarnina

TKL – *Tyrosine-kinase-like*

tRNA – RNA transportador

UPR – *Unfolded protein response*

VA – Vacúolo ácido

v/v – Volume/volume

mg/mL – Miligramas por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de mortes (por 100.000) causadas por malária.....	17
Figura 2. Perfil epidemiológico da malária no Brasil.....	18
Figura 3. Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp</i>	21
Figura 4. Tradução em eucarioto	23
Figura 5. Quinases de fosforilam eIF2 α de mamíferos.	26
Figura 6. Representação de 91 proteínas quinases presentes no quinoma de <i>Plasmodium falciparum</i>	29
Figura 7. Sítios de fosforilação por serina, treonina e tirosina quinases em <i>P. falciparum</i>	30
Figura 8. Proteínas quinases segundo os sítios de fosforilação	35
Figura 9. Proteínas quinases de <i>Plasmodium</i> : funções e localizações já descritas.....	36
Figura 10. Quinases de <i>P. falciparum</i> , PfeIK2 e PK4, regulam o ciclo do parasita através da fosforilação de eIF2 α	39
Figura 11. Mecanismo de sinalização desencadeado pela ativação de GPCR	41
Figura 12. Sincronização dos estágios intraeritrocítico por melatonina.....	44
Figura 13. Maquinaria de sinalização de cálcio, melatonina e proteínas quinases.....	46
Figura 14. Análise da expressão relativa por PCR em tempo real do gene PfeIK1 em resposta ao tratamento com melatonina.....	56
Figura 15. Esfregaços de <i>P.falciparum</i> 3D7 tratados ou não com 100nM de melatonina observadas ao microscópio.....	57
Figura 16. Gráfico representativo de dinâmica de cálcio nos parasitas <i>P. falciparum</i> 3D7 selvagem e nocaute para PfeIK1	58
Figura 17. Aumento de cálcio em resposta a melatonina em <i>P. falciparum</i> 3D7 e PfeIK1 ⁻ . Fluorescência relativa de Ca ²⁺	59
Figura 18. Anticorpo anti-eIF2 α e anti-P-eIF2 α reconhecem de maneira específica, respectivamente eIF2 α e eIF2 α fosforilada de <i>P. falciparum</i>	60
Figura 19. <i>Western blot</i> de eritrócitos não infectados.	61

Figura 20. A expressão de P-eIF2 α é diferencial ao longo do ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>	62
Figura 21. A expressão fosforilação de P-eIF2 α em <i>P. falciparum</i> é maior no estágio de trofozoíto	63
Figura 22. Parasitas nocautes para eIK1 (PfeIK1 ⁻) tem a subunidade α do fator eIF2 fosforilada.....	64
Figura 23. A fosforilação de eIF2 α exibe o mesmo perfil em <i>P. falciparum</i> selvagem e nocaute.....	65
Figura 24. Parasitas nocautes para SR25 (PfSR25 ⁻) não são modulados pela melatonina na fosforilação de eIF2 α	66
Figura 25. Parasitas nocaute para PfSR25 (PfSR25 ⁻) tem o mesmo perfil de fosforilação de eIF2 α quando comparado a 3D7.....	67
Figura 26. Esfregaços das cepas de <i>P.falciparum</i> selvagem e nocaute PfSR25.....	68
Figura 27. Biliverdina e hemina podem atuar na via de sinalização mediada pelo fator eIF2 através da fosforilação da subunidade α	69
Figura 28. Parasitas 3D7 incubados com biliverdina e hemina exibem maior porcentagem de eIF2 α fosforilada em 5 minutos.....	70
Figura 29. Os tratamentos com biliverdina e hemina não foram citotóxicas as culturas de <i>P.falciparum</i>	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Malária	17
1.2	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	19
1.3	O Fator eIF2.....	22
1.4	Proteínas quinases de <i>Plasmodium</i>	27
1.5	Receptores Serpentinicos	39
1.6	Sinalização celular em <i>Plasmodium</i>	42
2	OBJETIVOS.....	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1	Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	48
3.2	Sincronização das fases intraeritrocítica de <i>Plasmodium falciparum</i>	48
3.3	Clone de <i>Plasmodium falciparum</i> nocaute para eIK1.....	49
3.4	Clone de <i>Plasmodium falciparum</i> nocaute para pfsr25	49
3.5	Western Blot.....	49
3.6	Tratamento com melatonina e detecção da Phospho-eIF2 α nos estágios intraeritrocíticos de <i>P. falciparum</i>	50
3.7	Tratamento com melatonina e lise de hemácias para isolamento de parasitas.....	51
3.8	Tratamento com Hemina e Biliverdina e lise de hemácias para isolamento de parasitas.....	52
3.9	Análise quantitativa do western blot	53
3.10	Ensaio de quantificação de cálcio	53
3.11	PCR em tempo real.....	54
4	RESULTADOS.....	55
4.1	A expressão de PfeIK1 é reduzida em anel quando células infectadas com <i>P. falciparum</i> são tratadas com melatonina	55

4.2 Melatonina mobiliza cálcio dos estoques intracelulares em parasitas <i>P. falciparum</i> nocaute para eIK1	57
4.3 Anticorpo anti-Phospho-eIF2 α reconhece especificamente Phospho-eIF2 α de <i>Plasmodium falciparum</i>	59
4.4 eIF2 α , um substrato da proteína quinase PfeIK1, é expressa majoritariamente no estágio de trofozoíto.....	61
4.5 Parasitas <i>P. falciparum</i> nocautes para eIK1 (PfeIK1 ⁻) são capazes a fosforilar eIF2 α . 63	
4.6 Parasitas <i>P. falciparum</i> nocautes para SR25 (PfSR25 ⁻), não respondem a melatonina e possuem níveis basais de eIF2 α fosforilada	65
4.7 Biliverdina e hemina estimulam a fosforilação de eIF2 α de <i>P. falciparum</i>	68
5 DISCUSSÃO.....	72
5.1 A proteína quinase PfeIK1	72
5.2 Biliverdina e hemina regulam a fosforilação de eIF2 α	75
6 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários parasitas do gênero *Plasmodium* (LAMBROS et al., 1979; TALLOCHY et al., 2002). Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium*, entretanto, somente cinco espécies são capazes de causar a doença em humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi* (SABBATANI et al., 2010). Por outro lado, as demais espécies como *P. chabaudi* e *P. berghei* causam doença em camundongos, ratos e macacos.

De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), em 2013 ocorreram 198 milhões de casos de malária no mundo e aproximadamente 584 mil mortes, das quais 453 foram de crianças com idade inferior a cinco anos (MILLER et al., 2013). Não obstante, acredita-se que tais números estejam subestimados devido às mortes não relatadas (SNOW et al., 2005). A maioria dos casos concentra-se no continente africano (82%), seguidos do sudeste da Ásia (12%) e na porção oriental do mediterrâneo (5%).

Figura 1. Número de mortes (por 100.000) causadas por malária. As áreas em marrom escuro representam maior número de casos e concentram no continente africano. Fonte: Relatório Mundial para Malária, OMS, 2014.

A distribuição da doença no continente Americano é predominante na porção meridional, o subcontinente da América do Sul, os registros mostram cerca de 120 milhões de casos em 21 países, dos quais 25 milhões causados pelo *P. falciparum*. No Brasil, 99,8% estão na região da Amazônia Legal, a qual compreende os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato-Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Em 2013 foram relatadas 71.595 mortes causadas por malária somente na região norte. Apesar da concentração de casos apenas nessa região, a OMS aponta o risco de transmissão para 20% de toda a população brasileira (WORLD MALARIA REPORT, 2014).

Figura 2. Perfil epidemiológico da malária no Brasil. A região da Amazônia Legal corresponde a 99,8% dos casos no país. As áreas marcadas em marrom escuro apresentam maior número de casos. Fonte: OMS, 2014.

Dado o perfil epidemiológico mundial, a malária é considerada uma das doenças de maior letalidade e tem como agravante o surgimento de cepas de parasitas resistentes às drogas comumente usadas: cloroquina e artemisinina (MBENGUE et al., 2015). A artemisinina foi descoberta nos anos 60, apresentada a comunidade científica em 1977, e fora creditada a farmacóloga chinesa Youyou Tu somente em 2005; em 2015, a pesquisadora foi laureada com o Nobel de Medicina pela descoberta de tal composto extraído da planta *Artemisia annua*. O intenso uso da cloroquina e artemisinina ao longo de décadas selecionou cepas de *P. falciparum* e *P. vivax* (responsáveis pela maioria dos casos de malária humana) resistentes à cloroquina (WELLEMS et al., 2001). A gravidade do fato preocupa a OMS, que desde 2010 vem reportando casos de resistência à artemisinina (DONDORP et al., 2011). Portanto, atualmente há grande emergência no desenvolvimento de novos agentes de controle, como drogas e/ou vacinas (OLLIARO, 2005).

1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium*

O protozoário eucarioto unicelular causador da malária, *Plasmodium*, apresenta um complexo ciclo de vida que, didaticamente, é dividido em duas fases: fase assexuada, que ocorre no hospedeiro intermediário vertebrado; e a fase sexuada, que se desenvolve no hospedeiro definitivo invertebrado, podendo infectar a fêmea do mosquito *Anopheles* (figura 3).

A transmissão entre hospedeiros ocorre durante o repasto sanguíneo, onde as fêmeas anofelinas infectadas injetam esporozoítos latentes na derme do hospedeiro vertebrado. Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos migram até o fígado, invadem hepatócitos dando origem à fase hepática (ou extraeritrocítica), onde se multiplicam de forma assexuada e assintomática durante um período de seis a quinze dias (AMINO et al., 2006). Esse processo exige que o parasita dribble o sistema de defesa do hospedeiro vertebrado para, no final da fase hepática, ocorrer à liberação dos merozoítos através da ruptura dos hepatócitos e posterior invasão dos eritrócitos (fase intraeritrocítica). Um importante mecanismo nesta fase consiste no fato de que o merozoíto hepático libera na corrente sanguínea vários outros merozoítos envoltos por uma membrana (merossomo) que não expõe para o meio extracelular resíduos de fosfatidilserina (sinal para a fagocitose), culminando no escape da detecção pelas células de *Kupffer* as quais “patrulham” os sinusóides do fígado.

A patogenicidade é causada pela multiplicação assexuada de parasitas dentro do eritrócito (AMINO, et al., 2006) responsável pelos sintomas clínicos da doença (como febres recorrentes). Depois de invadir as hemácias, os merozoítos, por esquizogonia, desenvolvem-se em estágios, e cada um desses possui formas microscópicas bem definidas, chamadas de: anel, trofozoíto e esquizonte, respectivamente em ordem de maturação. A forma em anel cresce para trofozoíto, fase em que a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) é iniciada cerca de 30 horas após a invasão. Após várias multiplicações do material genético são formados os esquizontes multinucleados, os quais eventualmente rompem (aproximadamente 48 h pós-invasão) e cada esquizonte dá origem a 16-32 merozoítos; entretanto, por mecanismos ainda não descritos, alguns merozoítos não completam esse ciclo e desenvolvem-se em gametócitos femininos e masculinos, os quais, durante o repasto sanguíneo do *Anopheles*, são ingeridos pelo inseto. Essa fase sexuada não contribui significativamente para patologia, mas é essencial para a transmissão ao vetor (SINDEN et al., 1996).

Uma vez no intestino do invertebrado, os eritrócitos provenientes do repasto se rompem liberando os gametócitos; destes, os masculinos (microgametócitos) sofrem três divisões consecutivas (exflagelação) gerando oito gametas flagelados. Subsequentemente ocorre a fertilização e meiose que originam a estrutura de zigoto (oocineto) de alta mobilidade que atravessa o epitélio do intestino médio e ali se estabelece como oocisto na lâmina basal do tecido. Nesse momento o oocisto inicia a esporogonia, ou seja, a geração assexuada de milhares de esporozoítos. Estes invadem a glândula salivar do anofelino e, numa próxima picada, serão liberados na derme do hospedeiro vertebrado reiniciando o ciclo (JOHNSON et al., 1980).

Figura 3. Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. O ciclo de vida ocorre seguindo os seguintes passos 1. Mosquito se alimenta de sangue humano. 2. Ocorre a infecção dos hepatócitos (fase hepática). 3. Formação dos esquizontes. 4. Ruptura dos esquizontes. 5. Invasão das hemácias (fase intraeritrocítica). 6. Ocorre a ruptura dos esquizontes ou 7. Diferenciam-se em gametócitos, os quais podem ser femininos ou masculinos. 8. Mosquito alimenta-se do sangue humano infectado, dando início à fase no mosquito. 9. Ocorre a exflagelação do microgametócito (gameta masculino) e em seguida, a fecundação. 10. Formação do oocineto. 11. Diferenciação em oocisto. 12. Ruptura do oocisto liberando esporozoítos que serão armazenados na glândula salivar do anofelino. Ruptura do oocisto. Fonte: *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC, 2015).

Tanto as fases como a transição de um estágio do ciclo de vida para outro são fortemente reguladas pela expressão gênica em níveis epigenéticos, transcricionais, traducionais e de modificações pós-traducionais. Estes níveis de controle da expressão gênica contribuem para que a proliferação e a diferenciação do parasita ocorram apropriadamente nos diversos ambientes em que o *Plasmodium* é encontrado (PAINTER et al., 2011).

1.3 O Fator eIF2

As células eucarióticas, quando em condições de estresse, tendem a remediar um dano celular ou, em último caso, induzem a apoptose (WEK et al., 2006). O reconhecimento dessas condições gera sinais, perturbações que alteram o controle da expressão gênica, alterando o repertório gênico em prol das possíveis respostas supracitadas. Nesse contexto tem-se que, mais especificamente, diversas condições celulares são capazes de ativar a resposta integrada ao estresse (ISR – *Integrated Stress Response*), a qual é caracterizada por uma redução rápida da síntese global de proteínas, restringindo-se apenas à síntese daquelas que conferem capacidade adaptativa tem sua tradução mantida ou aumentada (SIDRAUSKI et al., 2015).

Em condições de estresse (ISR) um dos principais mecanismos no controle da síntese proteica é a fosforilação do fator de iniciação de tradução eucariótico 2 (eIF2 – *eucariotic Initiation Factor 2*) (DE HARO et al., 1996). As células eucarióticas possuem vários fatores de iniciação que regulam o processo de tradução cujo mecanismo (ver figura 4) inicia-se com a formação do complexo eIF4F (composto por eIF4E, eIF4G e eIF4A). Ocorre a ligação da eIF4E ao *cap* 5' (m^7GpppN), e a proteína de ligação a cauda poli A (PABP – *Poly A Binding Protein*) adere à cauda poli-A do mRNA. A proteína eIF4G mantém-se unida a PABP e eIF4E, permitindo a montagem da maquinaria de síntese. Em seguida, eIF4A, que possui atividade de helicase, associa-se a eIF3 e a subunidade ribossômica 40S promovendo o desenrolamento da fita e a consequente ligação de eIF4B ao complexo. A subunidade ribossomal 40S, por sua vez, se liga adicionalmente à eIF5 e ao complexo ternário (eIF2-GTP-Met-tRNA_i) formando o complexo 43S, o qual interage com eIF4G através de eIF3, formando o complexo 48S. O complexo *cap* sob a fita de mRNA a partir da posição 5' terminal faz uma varredura até encontrar um códon de iniciação (AUG). O reconhecimento dessa sequência ativa a hidrólise do GTP ligado a eIF2, recrutando o ribossomo 60S e a liberação de eIF2-GDP que ativa o complexo de iniciação 80S iniciando assim a síntese (NELSON, David L., COX, Michael M., "Lehninger Principles of Biochemistry", 4ª edição, W. H. Freeman, 2005).

Figura 4. Tradução em eucarioto. **1.** Formação do complexo eIF4F (eIF4E, eIF4G e eIF4A). **2.** Ligação da eIF4E a m⁷GpppN e a PABP. **3.** Associação da eIF4A a eIF3 e a subunidade ribossômica 40S e ligação de eIF4B ao complexo. **4.** Ligação da subunidade ribossômica 40S a eIF5 e a eIF2-GTP-Met-tRNA_i. **5.** Reconhecimento de AUG, hidrólise do GTP ligado a eIF2. **6.** PKR, PERK e GCN2 inibem a síntese de proteínas fosforilando o fator eIF2. A reação inversa é catalisada pela *growth-arrest- and DNA-damage-induced transcript 34* (GADD34). Modificada de (SILVERA et al., 2010).

O mediador comum de ISR, eIF2 α (fator de iniciação de tradução eucariótico 2 α), é uma subunidade de um fator de tradução altamente conservado em Archaea e em eucariotos. O complexo heterotrimérico eIF2 (constituído pelas subunidades α , β e γ) liga-se ao GTP e ao iniciador metionil-tRNA (Met-tRNA_i) para formar o complexo ternário (eIF2-GTP-Met-tRNA_i), o qual se associa a subunidade ribossômica 40S originando o complexo pré-iniciador 43S que por sua vez, varre a região 5'UTR de mRNAs para selecionar o códon de iniciação AUG (SIDRAUSKI et al., 2013). O reconhecimento do códon de iniciação desencadeia a hidrólise de GTP liberando fosfato e em seguida o eIF2, permitindo o acoplamento da subunidade ribossômica 60S e a consequente elongação e síntese proteica. Para continuar um novo ciclo de iniciação, um novo complexo eIF2 deve ser unido a GTP, e a reação catalisada

pela GEF (do inglês: *guanine nucleotide exchange fator*) gerando o fator de iniciação eucariótico heteropentamérico 2B (eIF2B). A fosforilação de eIF2 α não afeta diretamente o complexo de pré-iniciação, porém inibe eIF2B (KRISHNAMOORTHY et al., 2001). Esse complexo é menos abundante que eIF2, e pequenas quantidades de eIF2 α fosforiladas atuam como um inibidor competitivo gerando dramáticos efeitos na atividade de eIF2B. Quando não há formação do complexo ternário, a taxa de tradução diminui.

A fosforilação reversível da serina 51 de eIF2 α é o mecanismo central da regulação da tradução em ISR. O genoma de mamíferos codifica quatro quinases capazes de fosforilar eIF2 α , cada uma com estímulo específico: (i) PERK (*Protein Kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) é ativada pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo endoplasmático (ER) (HARDING; RON, 2002); (ii) a quinase GCN2 (do inglês: *general control non-derepressible 2*), ativada por privação de aminoácidos e radiação ultravioleta (UV) (DEVER et al., 1992); (iii) PKR (*protein kinase RNA activated*), ativada por infecção viral (SADLER; WILLIAMS, 2007); (iv) e quinase HRI (do inglês: *heme-regulated eIF2 α kinase*), ativada por deficiência de heme e estresse oxidativo (CHEN, 2007). Uma vez que possuem substrato comum, eIF2 α , a ativação dessas quinases gera respostas similares nas células em ISR (HARDING; RON, 2002).

Elevados níveis de eIF2 α fosforilada foram observados nos estágios latentes das formas infectantes de *Toxoplasma* e *Plasmodium*, indicando que o controle da tradução via fosforilação desse fator atua na manutenção da dormência (ZHANG et al., 2013). Outros estudos ainda apontam um papel para a fosforilação de eIF2 α no controle de crescimento celular e diferenciação (MORLEY et al., 2005; DA SILVA AUGUSTO et al., 2015). A importância dessas quinases e a fosforilação de eIF2 α para o funcionamento adequado de resposta a condições celulares adversas foram demonstradas no trabalho de (SCHEUNER et al., 2001), o qual utilizou camundongos nocautes para proteínas quinases que fosforilam eIF2 α ou com substituição da serina 51 de eIF2 α por alanina. Os resultados mostraram que camundongos eIF2 α (Ser51Ala) apresentaram inibição da tradução e perda da indução da transcrição em resposta ao estresse do retículo endoplasmático, e ainda, a redução da sobrevivência sob estresse. Camundongos neonatos rapidamente morriam devido à hipoglicemia proveniente de defeito na via de gliconeogênese. Além disso, os embriões e neonatos exibiram um decréscimo no conteúdo de insulina. Esses dados implicam que uma ou mais

quinases de eIF2 α são possivelmente importantes para o metabolismo de glicose e a função pancreática.

A função de HRI como quinase de eIF2 α foi identificada pela primeira vez durante um estudo usando reticulócitos que quando privados de heme apresentaram a tradução rapidamente interrompida, evento associado à fosforilação de eIF2 α . Posteriormente, (HAN et al., 2001) mostraram que camundongos nocautes para HRI são deficientes em ferro, e continuam sintetizando globinas livres que acumulam em corpos *Heinz* (complexos de proteínas desnaturadas). Além disso, HRI também inibe a tradução em resposta a choque térmico e arsenito através de fosforilação de eIF2 α , mas neste caso envolvendo espécies reativas de oxigênio e não o grupo heme (LU et al., 2001).

A proteína quinase dependente de RNA, PKR (do inglês, *RNA-dependent protein kinase*), é ativada pela interação entre uma fita dupla de RNA e o domínio N-terminal de ligação a RNA (RBDs, *RNA Binding Domains*) de PKR. Sua expressão basal nos diversos tipos celulares costuma ser baixa, mas é rapidamente induzida por interferons (IFNs). A função dessa quinase está comumente relacionada a infecção viral, atuando no controle da replicação do vírus; entretanto, muitos vírus subvertem essa barreira bloqueando ou defosforilando eIF2 α . PKR ainda exibe função em diversas outras respostas, como ativação da cascata de proteínas quinases sob estresse (GOH et al., 2000), apoptose de macrófagos em resposta a bactérias, indução microbiana da óxido nítrico sintase (UETANI et al., 2000) e ativação de NF- κ B, *Nuclear Factor-kappa B*) (DE LA CRUZ-HERRERA et al., 2014).

PERK (*PKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase*) está envolvida na resposta a proteínas mal dobradas (UPR), visando manter a homeostase no retículo endoplasmático (PAVITT; RON, 2012). A ativação de UPR se dá pelo do acúmulo de proteínas não ou mal dobradas que acumulam no lúmen do retículo endoplasmático. Em resposta ao estresse no ER, a proteína BiP interage com outras proteínas no lúmen dessa organela, PERK se dimeriza resultando na sua ativação, o que leva a fosforilação de eIF2 α . Então, a síntese de novas proteínas cujo destino seja o ER é inibida, o que possibilita uma atenuação no processamento. A inibição de eIF2/2B ocasiona o aumento da síntese de ATF4 (do inglês: *Activating Transcription Factor 4*) e de outros genes envolvidos na função do ER e controle redox como o fator pró-apoptótico CHOP (*C/EBP Homologous Protein*) (WEK et al., 2006).

GCN2 é encontrada em organismos eucariotos inferiores a superiores, sendo ativada em condições de privação de aminoácidos (DEVER et al., 1992; SATTLEGGGER et al., 2000;

KONRAD et al., 2014) e também em resposta a radiação UV (BACK et al., 2009). Durante a privação de aminoácidos, tRNA não carregados acumulam e ligam no domínio HisRS de Gcn2p levando a sua ativação (SATTLEGGGER; HINNEBUSCH, 2000). No trabalho de (ZHANG et al., 2002) camundongos selvagens exibiram elevados níveis de tRNA^{his} não carregado aumentando a fosforilação de eIF2 α , enquanto os nocautes para Gcn2 não exibiram esse perfil de fosforilação. Também foi demonstrado que os camundongos nocautes apresentam incapacidade de tolerância à privação de aminoácido.

Figura 5. Quinases de fosforilam eIF2 α de mamíferos. Proteínas quinases PKR, PEK, GCN2 e HRI são ativadas em diferentes condições de estresse. PKR (*protein kinase RNA activated*) por infecção viral. PEK/PERK (*Protein Kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) é ativada pelo acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo endoplasmático. GCN2 (*general control non-derepressible 2*) por privação de aminoácidos e radiação ultravioleta (UV). HRI (*heme-regulated eIF2 α kinase*) por deficiência de heme e estresse oxidativo. Modificada de (WEK et al., 2006).

1.4 Proteínas quinases de *Plasmodium*

A fosforilação de proteínas é um dos principais processos bioquímicos para a transmissão de sinal em eucariotos. As proteínas quinases são as enzimas responsáveis pela transferência do grupamento fosfato do ATP (adenosina trifosfato) para resíduos aminoácídicos específicos em suas proteínas alvos. A incorporação desse grupamento gera mudanças relevantes na atividade enzimática, estabilidade, interação com outras proteínas e até mesmo na localização subcelular. Quinases são relevantes para sinalização celular e coordenação de funções celulares complexas como proliferação, diferenciação nas células eucarióticas (SEGER et al., 1995; DOERIG et al., 2008) e em vias metabólicas, cujo funcionamento anormal pode ocasionar diversas doenças (LIM et al., 2012). As múltiplas funções e importância das proteínas quinases podem ser também indicadas pelo fato de cerca de 2% do genoma humano codificar proteínas quinases (DOERIG et al., 2008) e pela presença de mais de cinquenta famílias diferentes de proteínas quinases conservadas em leveduras, invertebrados e mamíferos.

Além de coordenar diversas funções celulares, os eventos de fosforilação funcionam como uma sinalização extremamente veloz, e o processo pode ser revertido rapidamente por proteínas do tipo fosfatase. Essa flexibilidade vem sendo objeto de muitos estudos com propósito de elucidar possíveis mecanismos para intervenção na progressão de doenças e desenvolvimento de fármacos e novas terapias. Atualmente existem 30 inibidores de quinases aprovados pela FDA (do inglês: *Food Drug Administration*), sendo que muitos desses são destinados ao tratamento de câncer (JANNE et al., 2009). Algumas dessas drogas já são amplamente usadas, como é o caso do mesilato de imatibe, inibidor da atividade constitutiva da tirosina quinase BCR/ABL em leucemia mielóide crônica (TRELA et al., 2014), que em 2008 foi incluído na lista de medicamentos fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil.

As proteínas quinases de eucariotos estão organizadas em sete grupos de acordo com sua função: (i) CK1 (*casein kinase*); (ii) CMGC (CDK [*cyclin-dependent kinase*], MAPK [*mitogen-activated protein kinase*], GSK3 [*glycogen synthase kinase 3*] e CLKs [*CDK-like kinases*]); (iii) TKL (*tyrosine-kinase-like*); (iv) AGC (PKA [*cyclic-adenosine-monophosphate-dependent protein kinase*], PKG [*cyclic-guanosine-monophosphate-dependent protein kinase*], PKC [*protein kinase C*] e outras proteínas); (v) CamK

(*calcium/calmodulin-dependent kinases*); (vi) STE (PKs atuam como reguladores de MAPKs); (vii) TyrK (*tyrosine kinases*).

O quinoma de *P. falciparum* é relativamente pequeno se comparado ao dos metazoos, apresentando entre 84 (WARD et al., 2004) a 99 proteínas quinases (ANAMIKA et al., 2005), dependendo dos critérios aplicados para incluir sequências limite. Embora o agente etiológico da malária (filó Apicomplexa) esteja evolutivamente bem distante dos eucariotos mais complexos, seu quinoma compartilha aproximadamente 90 membros (ANAMIKA et al., 2005) classificados em AGC (PKA, PKG e PKC), CaMK (*Calcium/Calmodulin dependent Kinases*), CK1 (*Casein Kinase I*), CMGC (CDK, MAPK, GSK3, CLKs) e TKL (*Tyrosine-kinase-like*), encontrados também em leveduras, plantas e mamíferos, certificando a ancestralidade (TALEVICH et al., 2012). Entretanto, outras quinases de *Plasmodium falciparum* mostram muitas divergências dos demais eucariotos (WARD et al., 2004). A participação de proteínas quinases em processos vitais de *Plasmodium* (KOYAMA et al., 2009) e a ausência de homologia com as de humanos corroboram o desenvolvimento de novas drogas contra essa patologia (DOERIG et al., 2009). Ponto que tem despertado interesse de indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de inibidores de proteínas quinases relacionadas ao processo de invasão e desenvolvimento intraeritrocítico (GARCIA et al., 1996).

Figura 6. Representação de 91 proteínas quinases presentes no quinoma de *Plasmodium falciparum*. As famílias são mostradas nos clusters ACG, STE, CK1, TKL, NEK, PEK, FIKK, CMGC, CAMK. Em roxo quinase de *Plasmodium bergheii*. Modificado de (TALEVICH et al., 2012).

As proteínas quinases são ainda classificadas segundo o resíduo aminoacídico de destino do grupamento fosfato - serina, treonina e tirosina quinase (KAPPES et al., 1999) -, além da organização em subgrupos e famílias de acordo com função conforme supracitados. Embora alguns estudos afirmem a ausência de tirosina quinase em *P. falciparum* (WARD et al., 2004), outros apontam a participação de tirosinas quinases nas vias das MAP3K (ABDI et al., 2010; SOLYAKOV et al., 2011) e também em *Toxoplasma gondii*, cujos aspectos biológicos apresentam alto grau de homologia com *P. falciparum* (TREECK et al., 2011).

Neste mesmo trabalho, Treeck e colaboradores descrevem que somente 0,51% dos eventos de fosforilação envolvem tirosinas quinases, e o restante envolve resíduos de serina e treonina. Um posterior estudo - analisando a expressão de transcritos com atividade de quinase no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* - mostra a predominância de sítios de serina frente à treonina (PEASE et al., 2013), conforme indicado na figura 7.

Figura 7. Sítios de fosforilação por serina, treonina e tirosina quinases em *P. falciparum*. Resíduos de serina representados em roxo, treonina em azul e tirosina em amarelo. Modificado de (PEASE et al., 2013).

A maioria das quinases de *P. falciparum* é classificada em grupos já bem caracterizados em mamíferos como: (i) uma CK1; (ii) 4 membros da família NIMA/NEK (*Never in Mitosis gene A* – envolvidas na regulação do ciclo celular, tal como replicação do centrôssomo); (iii) cinco quinases do grupo AGC (incluindo homólogos a PKA, PKB, PKG, mas não a PKC); (iv) diversos genes codificando membros de CamK, que compreendem membros de quinase cálcio dependentes (CDPKs) uma família de enzimas caracterizadas por um domínio de quinases acrescido de domínio semelhante ao de calmodulina, restrito a plantas e alveolados (ciliados, apicomplexos e dinoflagelados); (v) Dezoito enzimas do grupo das CMGC, que inclui as MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos - cruciais para transdução de sinais extra e intracelular - elementos efetores para controle do ciclo celular e fator de transcrição), CDKs (quinases dependente de ciclinas), GSK3 (glicogênio sintase

quinase) e CDK-like (quinases dependentes de cliclina) (KAPPES et al., 1999) importante para o metabolismo de RNA (DOERIG et al., 2008). GSK3 atua em inúmeros processos incluindo proliferação celular, migração, apoptose e no caso do *Plasmodium*, no desenvolvimento intraeritrocítico do parasita.

Foram identificadas seis CDKs em *P. falciparum* cujas funções estão ligadas à regulação do ciclo celular (DOERIG et al., 2002). Os inibidores de CDKs (CDI) inibem a resposta de CDK em condições de estresse de ambiente e dano ao DNA, entretanto, em *P. falciparum* não foi observado a presença dessas quinases. Por outro lado, foi verificado que PfCDKs são capazes de inibir as CDKs de mamíferos (LI, Z. et al., 2001); foram identificadas três, sendo elas: PfPK5, Pfmrk e Pfcrk1. Tanto a localização intracelular quanto o momento em que a PfPK5 é expressa sugerem uma atividade relacionada à regulação da divisão nuclear (HOLTON et al., 2003). As evidências sugerem a participação de Pfmrk (predominante em gametócitos) na diferenciação de parasitas em estágios sexuais (GEYER et al., 2009; LI, Z. et al., 2001). Já a Pfcrk1 é regulada pós-transcricionalmente, como sugerido pelo acúmulo de mRNA em gametócitos (DOERIG et al., 1995).

Quinases do tipo MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) atuam regulando a proliferação celular, a diferenciação em resposta a estímulos e ainda a parada do crescimento celular e a apoptose. Em *P. falciparum* são identificadas duas proteínas semelhantes a MAPK: Pfmap-1 e Pfmap-2; a primeira quando inativada não causa qualquer dano ao desenvolvimento do parasita; entretanto, há um aumento da atividade de Pfmap-2. Estes resultados demonstram que na ausência de uma quinase a outra pode assumir as funções da outra (DORIN-SEMBLAT et al., 2008). Além disso, a Pfmap-2 foi reportada como proteína essencial para o ciclo assexuado de parasitas *P. falciparum*, todavia, em estudos com *P. berghei*, Pbmap-2 mostrou-se não essencial para o desenvolvimento do ciclo assexuado e gametocitogênese, sendo somente necessária para o processo de gametogênese no mosquito vetor e exflagelação dos microgametófitos (DORIN-SEMBLAT et al., 2007).

O grupo das CKs (caseína quinases) compreende CK1 e CK2: a primeira exibe capacidade de fosforilação para diversas proteínas do parasita (BARIK et al., 1997) e também atua no transporte de vesículas desempenhado por proteínas do grupo Rab-GTPases, sendo uma proteína efetora de Rab (RACHED et al., 2012); CK2 é uma serina-treonina quinase com múltiplos substratos e funções, atuando em diversos processos importantes como

diferenciação, proliferação, apoptose, resposta a estresse, dano ao DNA e ritmo circadiano (DASTIDAR et al., 2012; GRACIOTTI et al., 2014; HOLLAND et al., 2009).

As CamKs (calmodulina quinases) são representadas por treze quinases em *P. falciparum* (WARD et al., 2004). Essas proteínas são caracterizadas pela presença de dois domínios funcionais, um catalítico de proteína quinase e outro de regulação por meio de ligação a cálcio, podendo ser ativada diretamente, sem a necessidade da calmodulina como mediadora (KAPPES et al., 1999). As quinases dependentes de cálcio (CDPKs) constituem um importante grupo de quinases para o parasita da malária e outros organismos (HARPER; HARMON, 2005). Dessas, a PfCDPK1 é indispensável para a invasão de eritrócitos, mobilidade do parasita e citocinese, e é expressa durante a esquizogonia do ciclo intraeritrocítico e esporogonia no mosquito. A proteína PfCDPK1 é descrita como essencial para que se complete o ciclo assexuado de *P. falciparum*, dado que o tratamento com inibidor de PfCDPK1 (purfalcamina) bloqueia o ciclo celular no estágio de esquizontes (KATO et al., 2008). Já a PfCDPK3 é uma proteína essencial para o ciclo sexuado do parasita, pois o nocaute do gene que codifica esta proteína reduz em duas vezes a habilidade do oocineto em infectar o intestino do mosquito (ISHINO et al., 2006). A CDPK4 atua na exflagelação do gametócito masculino em resposta ao aumento de cálcio induzido pelo ácido xanturênico no hospedeiro invertebrado (BILLKER et al., 2004). PfPK2 é expressa de forma estágio-específica, localizada principalmente na membrana celular do parasita (ZHAO et al., 1992) e sua atividade depende de cálcio e calmodulina. Essa quinase apresenta homologia com CamK, PKA e PKC, pertencendo, então, tanto ao grupo das CaMK quanto ao das AGC.

O grupo das proteínas AGC inclui a família das quinases com atividade dependente de nucleotídeos cíclicos, como cAMP e cGMP, ambas moléculas que atuam como sinalizadores intracelular na comunicação celular. Em *Plasmodium falciparum*, cAMP e cGMP podem regular diversas funções, como quimiotaxia e formação de zigoto (HASTE et al., 2012). PfPKA, PfPKG e PfPKB, pertencentes ao grupo AGC, foram investigadas (DORIN-SEMBLAT et al., 2008; WARD et al., 2004) e à PfPKA atribuiu-se o papel essencial para a multiplicação de parasitas no ciclo assexuado, visto que o inibidor desta quinase impede também o desenvolvimento de formas intraeritrocíticas de *P. falciparum* (SYIN et al., 2001). A PKG (proteína quinase dependente de cGMP) de Apicomplexa é notavelmente diferente das encontradas em células de mamíferos e aves por possuir um terceiro sítio de ligação de nucleotídeos, o qual contribui para a cinética de ativação do nucleotídeo (DIAZ et al., 2006).

A PKB de mamíferos é regulada por fosfatidil-inositol trifosfato (PIP3) gerado a partir da atividade da enzima fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K), onde o fosfatidil-inositol interage com o domínio de homologia à plecstrina (PH) de PKB. A PfPKB não possui o domínio de homologia à plecstrina e sua ativação ocorre via cálcio-calmodulina (VAID et al., 2008), PI3K é exportada para a hemácia (evidenciando sua importância no tráfico de hemoglobina) (VAID et al., 2010). A fosfolipase C (PLC) é uma reguladora desta via, uma vez que promove a formação de IP3, que por sua vez, liga-se a receptores do retículo endoplasmático e atua na liberação de cálcio desta organela (ALVES et al., 2011). Além da função química, PfPKB também atua no complexo motor de actina-miosina, o glideossomo, utilizado por organismos como *P. falciparum* e *T. gondii*. Esses parasitas precisam desse complexo para invadir células hospedeiras; por movimentação do tipo *gliding* que antecede a formação das junções celulares (*tight junctions*) e garantem uma infecção eficiente pelo patógeno (THOMAS et al., 2012).

As TKLs (*tyrosine-like-kinase*) são bem caracterizadas em plantas, insetos e mamíferos, e estão relacionadas às vias de sinalização em defesa a patógenos bem como produção de fatores pró-inflamatórios. Em plantas são chamados de RLKs (do inglês: *receptor like kinase*), em mamíferos como IRAKs (*IL-1 receptor associated kinase*) e em *Drosophila melanogaster* conhecidos como “*Pelle Kinase*” (ABDI et al., 2013). PfTKL2, um membro dessa família, é expressa exclusivamente nos estágios assexuados, sendo exportada para o eritrócito do hospedeiro. Acredita-se que uma das funções inclua um papel imunomodulador para promover a sobrevivência do parasita no hospedeiro humano.

Enzimas NIMA/NEK (*never in mitosis Aspergillus*) foram identificadas pela primeira vez no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* como uma serina-treonina quinase independente de ciclina necessária para entrar em mitose. A superexpressão de NIMA resulta na entrada prematura da célula em mitose, com condensação de cromatina e formação de fuso mitótico anormal. Muitos eucariotos exibem proteínas com grande homologia à NIMA, sendo que em mamíferos são representadas como Nek1, Nek2, Nek3 e Stk2 (DORIN et al., 2001).

As NEKs atuam na divisão celular eucariótica e possuem comprovada importância na meiose do parasita causador da malária. Estas proteínas quinases atuam na regulação da replicação de DNA, bem como do bloqueio no desenvolvimento de oocinetos (REININGER et al., 2009). Pfnek-1, a *NIMA-related kinase* de *Plasmodium falciparum*, é expressa tanto na fase assexuada como na sexuada, e exibe propriedades bioquímicas que sugerem envolvimento na regulação de MAPK (REININGER et al., 2012). Já as demais quinases dessa

família são expressas predominantemente em gametócitos. Pfnek-2 e Pfnek-4 são essenciais para a replicação do genoma pré-meiose no zigoto e formação do oocineto no mosquito (CARVALHO et al., 2013).

Algumas quinases de *P. falciparum* não estão organizadas em nenhum grupo já estabelecido para ePK (*eucaryotic Protein Kinase*) (TEWARI et al., 2010), formando, portanto, a família de quinases orfãs (*Orphan Kinases ou OPK*). Uma dessas quinases órfãs é a PfPK, que exibe elevada homologia da porção C-terminal com MEK3/6 e N-terminal com a proteína quinase A de fungos. Desse grupo a PfPK7 é uma quinase do genoma de *P. falciparum* com atuação no ciclo sexuado e assexuado do parasita (DORIN-SEMBLAT et al., 2008). Também foi demonstrado o envolvimento de PfPK7 na sinalização promovida por melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (HOTTA et al., 2000). Koyama e colaboradores (2012) demonstraram que parasitas *P. falciparum* nocauteado para o gene de PfPK7 tem menor liberação de Ca^{2+} intracelular induzido por melatonina quando comparado a parasitas selvagens. Em adição, parasitas nocautes na presença de melatonina não tiveram o ciclo intraeritrocítico modulado (KOYAMA et al., 2012). Por outro lado, quando houve a reinserção do gene em parasitas nocautes através de expressão episomal, a capacidade da melatonina em modular o ciclo de vida foi restabelecida. Estes resultados são indícios da importância dos eventos de fosforilação para a proliferação e ciclo de vida do parasita.

A figura 8 representa esquematicamente proteínas quinases de *Plasmodium spp.* com atividade de autofosforilação ou ativadas *upstream* na cascata de sinalização. A fosforilação de proteínas quinases tem sido observada na alça de ativação (dentro do domínio catalítico), no resíduo de tirosina na alça de ativação, no domínio catalítico (porém fora da alça de ativação), em uma sequência sem domínio catalítico, na porção carboxi e amino terminal fora do domínio catalítico e na subunidade regulatória.

Figura 8. Proteínas quinases segundo os sítios de fosforilação. Modificado (DOERIG et al., 2015)

Em resposta a condições celulares adversas, as serina-treonina quinases PERK, GCN2, HRI e PKR fosforilam a serina na posição 51 da subunidade α do fator de iniciação eIF2 para inibir a síntese de proteínas (PROUD, 2005). Sabemos que o genoma de *P. falciparum* codifica pouco menos de 100 proteínas quinases, e somente três dessas quinases exibem capacidade de promover a transferência do grupamento fosfato para eIF2 α , denominadas PfeIKs (*Plasmodium falciparum* eucaryotic Initiation factor Kinases): PfeIK1 (PF3D7_1444500), PfeIK2 (PF3D7_0107600) e PK4 (PF3D7_0628200) (WARD et al., 2004).

PfeIK1 e PfPK4 são mais expressas na fase assexuada nos eritrócitos, enquanto PfeIK2 é predominantemente expressa na glândula salivar do mosquito (ZHANG et al., 2010). A deleção dos genes que codificam PfeIK1 e PfeIK2 não é deletéria para o desenvolvimento do parasita nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado. Com relação à função, PfeIK1 exibe características similares a GCN2, regulando a resposta a privação de aminoácidos (FENNELL et al., 2009; TALEVICH et al., 2011).

PfeIK2 é a única quinase do tipo treonina que fosforila eIF2 α em *P. falciparum*. Essa quinase atua no controle da latência dos esporozoítos na glândula salivar do anofelino: assim que ocorre a inoculação na derme do hospedeiro vertebrado P-eIF2 α é defosforilada permitindo a continuidade do ciclo (FENNELL et al., 2009). A repressão da tradução é então

atenuada, o que permite o desenvolvimento dos esporozoítos em estágios infectantes do fígado (ZHANG et al., 2010). Foi ainda demonstrado que parasitas nocaute da quinase PfeIK2 transformam-se prematuramente em formas que infectam o fígado, e perdem sua infectividade neste órgão. Isto sugere a correlação entre a transformação e a mudança no programa de expressão proteica controlado pela fosforilação de eIF2 α nesta fase do ciclo de vida de *Plasmodium* (ZHANG et al., 2010). A figura 9 representa funções de proteínas quinases de *Plasmodium* durante o ciclo de vida de parasitas causadores da malária. O uso de genética reversa revelou o papel de PbCDPK6 e PfeIK2 na infectividade de esporozoítos (LI, J. L. et al., 2001; ZHANG et al., 2010), e PfPK7, Pfmap-2, PfCPK1 e PfPKG na esquizogonia (DORIN-SEMBLAT et al., 2007; DORIN-SEMBLAT et al., 2008; KATO et al., 2008; MCROBERT et al., 2008), sendo que PfPKG ainda atua na gametogênese masculina assim como Pbmap-2 (KHAN et al., 2005; RANGARAJAN et al., 2005; TEWARI et al., 2005) e PfPK7 no desenvolvimento do oocisto.

Figura 9. Proteínas quinases de *Plasmodium*: funções e localizações já descritas. PK7 de *P. falciparum* (Pf) está envolvida no processo de maturação do oocisto. CDPK3 de *P. berghei* (Pb) promove a migração do oocineto. Para a gametogênese estão envolvidas as quinases: PbCDPK4, Pbmap-2, PfPKG. No processo de esquizogonia no ciclo intraeritrocítico as quinases: Pfmap-2, PfCPK1, PfPK7, PfPKG. Relacionado a latência (infectividade)

dos esporozoítos as quinases CDPK6 de *P. berghei* e a eIK2 de *P. falciparum*. Modificado de (DOERIG et al., 2008).

PK4 é transcrita na fase intraeritrocítica, mas sua função ainda não é conhecida. Sabe-se da sua participação em processos cruciais para o desenvolvimento dentro da hemácia, pois estudos realizados com parasitas *P. berghei* (ZHANG et al., 2010) e *P. falciparum* (SOLYAKOV et al., 2011) observaram que a inativação de PK4 comprometeu a viabilidade do parasita.

As quinases atuam no controle de expressão de proteínas, sendo importantes na regulação do ciclo celular de qualquer organismo. E sob condições adversas devem sinalizar para uma resposta frente à situação, sendo que esse ajuste fino da homeostase garante a capacidade de sobrevivência dos seres vivos. Ainda referente a condições de estresse, o termo apresenta-se como uma grande perturbação do sistema, entretanto devemos observar como, por exemplo, no caso do *Plasmodium* – apresenta fases distintas e duplo hospedeiro - que a transição de um organismo para outro ou entre compartimentos gera uma perturbação, sendo considerada uma condição de estresse fisiológico. Assim, modificações proteicas como fosforilação, acetilação, metilação e lipidação podem ser os componentes-chave da biologia do parasita e patogenicidade (DOERIG et al., 2015).

São notáveis as estruturas que controlam a dinâmica de RNAs após sua síntese, como grânulos de estresse (GE) e corpos de processamento (CP). GE são importantes para a tradução de proteínas, e têm nos fatores de iniciação (eIFs) e PABP (poli-(A) *binding protein*) seus componentes principais. CP estão relacionados à degradação de mRNAs, controlando a tradução de proteínas. No contexto da infecção por organismos patogênicos, níveis e localização dos RNAs mensageiros (mRNAs) ao longo de todo seu ciclo de vida devem ser regulados por estes parasitas a fim de garantir que suas necessidades bioquímicas e celulares sejam adequadamente supridas (CHERRY; ANANVORANICH, 2014).

Pease e colaboradores demonstraram, usando múltiplas técnicas de proteômica, que a expressão transiente e constitutiva de algumas proteínas controla de forma precisa a relação do parasita com a célula hospedeira (PEASE et al., 2013). Mecanismos correlatos do controle da expressão de proteínas nos estágios de vida celular também vêm sendo estudados em outro parasita Apicomplexa, o *Toxoplasma*. Sabe-se que a transição de estágio de taquizoítas, que apresentam metabolismo acelerado, para bradizoítas, de taxas lentas, ocorre em resposta ao estresse induzido pela resposta imunológica do hospedeiro. Alguns estudos sugerem que o envolvimento de quinases de fatores de iniciação, bem como de proteínas de choque térmico

(HSPs – *heat shock proteins*) desempenhem papel importante tanto na transição bradizoítas-taquizoítas quanto na transição inversa. Desta forma, há evidências de que as diferenças de expressão proteica nos dois estágios de *T. gondii*, bem como a própria existência dos dois estágios, podem ser entendidas sob controle da regulação desempenhada pelas quinases dos fatores de iniciação (WEISS; KIM, 2000).

Com base nas observações dos estudos (FENNELL et al., 2009; SULLIVAN et al., 2004; ZHANG et al., 2012) foi proposto o modelo representado na figura 10. Essas observações nos conduzem a acreditar que a percepção de um estresse ao ambiente celular ative a PfeIK1 que rapidamente fosforila eIF2 α de *P. falciparum* podendo promover dois tipos de respostas: bloqueio da síntese proteica e mudança da expressão dos genes a serem traduzidos. Os mecanismos pelos quais a fosforilação do resíduo serina 51 bem como o *timing*, distribuição ao longo do ciclo intraeritrocítico, localização subcelular, interação com outras proteínas e funções suplementares ainda não foram descritos. No presente trabalho buscamos elucidar um pouco mais sobre a função dessa quinase de *P. falciparum*, PfeIK1.

Figura 10. Quinases de *P. falciparum*, PfeIK2 e PK4, regulam o ciclo do parasita através da fosforilação de eIF2 α . Para eIK1 ainda não foi determinado o estágio de atuação no ciclo intraeritrocítico. As quinases fosforilam eIF2 α , que nessa situação sinaliza para parada de síntese da proteica. Modificado de (ZHANG et al., 2013).

1.5 Receptores Serpentinicos

Os receptores serpentinicos são conhecidos por diversos nomes como: receptores transmembrana heptahélicos, sete domínios e receptores acoplados a proteína G (GPCRs), e constituem uma ampla família de receptores de percepção de sinais celulares externos que ativam mecanismos de transdução para o meio interno (LIN, 2013). Atuam em resposta a

estímulos como luz, prótons, feromônios, hormônios, neurotransmissores, aminoácidos, odores, aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, peptídeos, esteroides, lipídeos e íons, ou seja, são sensibilizados pelos mais diversos tipos de moléculas (HALL et al., 1999).

Os receptores serpentinicos são assim chamados devido a sua conformação estrutural, pois atravessam a membrana sete vezes (TRZASKOWSKI et al., 2012). Eram atribuídos somente a eucariotos (KING et al., 2003), entretanto já foi mostrada a ocorrência desses receptores em organismos filogeneticamente distantes como bactérias, fungos, plantas e metazoários (DE MENDOZA et al., 2014).

GPCRs receberam atenção especial em 2012, quando Robert Lefkowitz e Brian Kobilka foram laureados com o Nobel de Química por mostrarem a existência física de receptores adrenérgicos acoplados com a adenilato ciclase. Em humanos, os GPCRs tem especial atenção, pois são alvos para numerosos fármacos e estima-se que 30 a 60% dos agentes terapêuticos atuem em receptores serpentinicos (VENKATAKRISHNAN et al., 2013).

Muitos GPCRs também exibem atividade constitutiva independente de agonista, sugerindo que estes podem adotar uma conformação espontaneamente ativa (GETHER, 2000; LEFKOWITZ et al., 1993; LEVOYE et al., 2006).

A função de sinalização dos GPCRs se dá com o acoplamento do receptor ativado a proteína G heterotrimérica (MOREIRA, 2014), composta pelas subunidades $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$ (figura 11). Ao se ligar ao receptor, a proteína G promove a troca de GDP por GTP. $G\alpha$ -GTP dissocia-se deixando as subunidades $G\beta\gamma$ ativas (MOREIRA, 2014). A subunidade $G\alpha$ ainda é dividida em quatro famílias: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha_{12}}$; e cada uma delas ativa diferentes efetores *downstream*. A $G_{\alpha s}$ estimula adenilato ciclase, aumentando a concentração de cAMP, enquanto $G_{\alpha i}$ inibe adenilato ciclase, sinalizando o processo inverso. A $G_{\alpha q}$ liga-se a $PLC\beta 1$, ativando e induzindo a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato. $G\beta\gamma$ podem ativar alguns tipos de PLCs, canais iônicos e quinases de lipídeos. $G\beta\gamma$, $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha_{12}}$ podem também controlar outras moléculas transdutoras de sinais, como as proteínas monoméricas ligantes de GTP das famílias Ras e Rho e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). O resultado dessa sinalização integrada promovida por proteínas G é o controle de diversas funções celulares como proliferação, diferenciação, migração e degradação da matriz extracelular (DORSAM; GUTKIND, 2007).

Figura 11. Mecanismo de sinalização desencadeado pela ativação de GPCR. Este é ativado pela ligação do agonista a partir do meio extracelular, e através da troca de GDP por GTP da proteína G heterotrimérica ocorre a transmissão do sinal, neste caso por meio da formação de adenilato ciclase. Fonte: adaptado de Takeshi Kawabata (pbdj.org)

GPCRs representam um importante componente molecular na interface parasita-hospedeiro em diferentes parasitas, o hospedeiro utiliza, por exemplo, a sinalização mediada por GPCRs para ativar o sistema imunológico em resposta à infecção (BESTEBROER et al., 2010). Moléculas dos parasitas são reconhecidas pelo hospedeiro por meio da sua ligação a GPCRs expressos na membrana do leucócito, o que facilitaria o processo fagocítico, mas os parasitas desenvolveram mecanismo para não serem percebidos, como produção de moléculas de atração de leucócitos ou de substâncias que bloqueiam os receptores (BESTEBROER et al., 2010).

Estudos investigando o papel de serotonina (precursor da melatonina) em parasitas do gênero *Schistosoma* revelaram que o receptor de serotonina de *Schistosoma mansoni* pertence à superfamília dos GPCRs (PATOCKA et al., 2014) e o estudo evidenciou a importância da atividade do GPCR para a movimentação do parasita, pois parasitas *knocked down* tiveram sua capacidade motriz reduzida, sugerindo a importância da percepção do sinal de serotonina para regulação das funções celulares.

Em 2008, Madeira e colaboradores identificaram através de abordagem estrutural e ferramentas de bioinformática, quatro hipotéticos GPCRs de melatonina em *Plasmodium falciparum*: PfSR1, PfSR10, PfSR12 e PfSR25. Seus homólogos também foram encontrados em outras cinco espécies: *P. knowlesi*, *P. vivax*, *P. chabaudi*, *P. yoeli*, *P. berghei* (MADEIRA

et al., 2008). Os receptores encontrados divergem totalmente entre si, sendo que três deles são *Plasmodium*-específicos e apenas PfSR10 apresentou homólogos em outros organismos eucariotos, mostrando-se o mais forte candidato a ser classificado como GPCRs, uma vez que possui o domínio conservado “*lung seven-transmembrane receptor*”. Porém, até o presente momento não foi identificado no genoma de *P. falciparum* nenhuma sequência para proteína G, levantando a questão se todos estes receptores têm ligantes ou se algum deles age através da interação com outras proteínas.

Dados não publicados do laboratório indicam que PfSR25 está expressa no ciclo intraeritrocítico atuando como um sensor de cátion passível de modulação por cálcio.

1.6 Sinalização celular em *Plasmodium*

A melatonina é produzida por diversos animais e plantas (CANIATO et al., 2003) presente também em protistas (WANG; WANG, 2006). Secretado principalmente pela glândula pineal de vertebrados, o composto participa na organização temporal dos ritmos biológicos e atua como mediador do ciclo claro/escuro ambiental e processos regulatórios fisiológicos, incluindo regulação endócrina da reprodução, regulação dos ciclos de atividade-reposo e sono/vigília assim como regulação do sistema imunológico, entre outros (MACCHI; BRUCE, 2004; REITER et al., 2010).

Em humanos, além da função relacionada ao sono também atua como antioxidante, no processo de recuperação de células epiteliais expostas a radiação UV, e provavelmente surgiu como uma solução para a célula detoxificar espécies reativas de oxigênio (CHAKRAVARTY; RIZVI, 2012).

A liberação da melatonina e o ciclo de vida de diversas espécies de *Plasmodium* apresentam ciclo circadiano. Essa observação data de meados do século XX, entretanto, no passado, visto pelos relatos de Hipócrates no século IVa.C., a manifestação clínica da malária já era descrita por quadros febris repetidos a cada dois dias. Hoje sabemos que a periodicidade deste ciclo está diretamente associada à liberação simultânea de milhares de merozoítos, devido à alta sincronia do estágio intraeritrocítico, na corrente sanguínea após a ruptura das hemácias do parasita (GARCIA et al., 2001).

Boyd demonstrou, em 1929, que ao se inverter o ciclo claro-escuro do hospedeiro, inverte-se também o horário de liberação de merozoítos na corrente sanguínea. Ainda nessa

época observaram a sincronia na produção de gametócitos (fenômeno Hawkins) de diferentes espécies de *Plasmodium*, acreditava-se que a alimentação era responsável por essa sincronia, entretanto os mosquitos se alimentavam em diferentes horários em hospedeiros vertebrados infectados (GAMBRELL, 1937; SHAH, 1934).

Em 1976, Trager e colaboradores demonstraram que a sincronia dos estágios de desenvolvimento dos parasitas é perdida em cultura, sugerindo que fatores oriundos do hospedeiro seriam os responsáveis pelo processo de sincronização (TRAGER; JENSEN, 1976). Ao remover a glândula pineal do hospedeiro houve dessincronização do parasita (ARNOLD et al., 1969), e camundongos pinealectomizados tiveram a sincronização dos parasitas reestabelecida com a administração de melatonina (HOTTA et al., 2000). Interessantemente, derivados do triptofano (triptamina, N-acetilserotonina e serotonina) também são capazes de promover sincronização *in vitro* de *P. falciparum* (BERALDO; GARCIA, 2005).

Sabe-se que em vertebrados, receptores de melatonina são do tipo sete domínios transmembranas (SINGH et al., 2014) e de acordo com a visão clássica de sinalização por receptores serpentinicos, a proteína G atua ativando efetores como adenilato ciclase, fosfolipase C e canais iônicos levando à transmissão do sinal externo (HENG et al., 2013). A figura 12 representa esquematicamente a ação da melatonina na sincronização do ciclo intraeritrocítico, o composto luzindol (um antagonista dos receptores de melatonina) inibe o efeito de sincronização causado pela melatonina.

Figura 12. Sincronização dos estágios intraeritrocítico por melatonina. A adição de melatonina leva os parasitas para estágios mais tardios do ciclo intraeritrocítico. Luzindol bloqueia a sincronização promovida pelo composto. Modificado de (BAGNARESI et al., 2012).

O cálcio (Ca^{2+}) é o íon mais abundante no corpo humano, especialmente armazenado nos ossos na forma de compostos como o carbonato de cálcio. Além disto, possui diversos papéis centrais em processos bioquímicos e de sinalização celular (KREBS et al., 2015), atuando como mediador intracelular, mensageiro secundário, e também no controle de algumas enzimas quinases, interferindo nos processos de transcrição, ativação de genes e apoptose (BERRIDGE et al., 2003; BUDU; GARCIA, 2012).

O Ca^{2+} é um sinalizador intracelular extremamente versátil com capacidade de atuação em milissegundos, como ocorre na exocitose de vesículas sinápticas, ou ao longo de horas, como no caso da regulação da expressão gênica (BERRIDGE et al., 2003). Ca^{2+} também desempenha importante papel para parasitas do filo Apicomplexa, atuando em funções como mobilidade celular, secreção de micronemas, egressão da célula hospedeira (LOURIDO; MORENO, 2015). Os parasitas *P. falciparum* utilizam Ca^{2+} extracelular no processo de invasão dos eritrócitos (JOHNSON et al., 1980), e a depleção desse íon impede a maturação do ciclo intracelular em cultura (GAZARINI et al., 2003).

Os parasitas da malária, assim como qualquer outra célula eucariótica, mantêm uma baixa concentração citoplasmática de cálcio (GARCIA, 1999). Na fase intraeritrocítica o parasita é separado do meio externo (que contém concentrações milimolar de Ca^{2+}) pela membrana do vacúolo parasitóforo, pelo citosol e pela membrana da hemácia (GAZARINI et al., 2003).

Em *P. falciparum* foi demonstrado a existência do vacúolo parasitóforo rico em Ca^{2+} que é formado durante a invasão e pode resultar da inversão da bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática do eritrócito, que ao fazer parte da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), bombeie Ca^{2+} para o interior do vacúolo parasitóforo (GAZARINI et al., 2003).

Diversos trabalhos mostraram a existência de dois compartimentos distintos de estoques de Ca^{2+} em *Plasmodium* (BIAGINI et al., 2003; LOURIDO; MORENO, 2015; VAROTTI et al., 2003), sendo um o retículo endoplasmático, sensível à tapsigargina (Thg) que age inibindo a SERCA (*Sarco Endoplasmatic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*) que é responsável pelo bombeamento deste íon para dentro da organela; e outro um compartimento ácido

caracterizado pelo do colapso do gradiente de pH intracelular e consequente mobilização de Ca^{2+} a partir do uso de ionóforos Na^+/H^+ (nigecicina).

A investigação de vias de sinalização desencadeadas pela melatonina em *P. chabaudi* e *P. falciparum* mostra que esse composto induz a liberação de Ca^{2+} citosólico, tanto na presença ou na ausência de Ca^{2+} extracelular (HOTTA et al., 2000). Além disso, quando na presença do inibidor de fosfolipase C (U73122), ou do antagonista dos receptores de melatonina (luzindol), a mobilização de Ca^{2+} é abolida, sugerindo a existência da via clássica de sinalização do IP_3 (mio-inositol 1,4,5-trifosfato) (BERALDO; GARCIA, 2005; HOTTA et al., 2000). O AMPc também é aumentado na presença de melatonina em *P. falciparum*, porém o efeito é bloqueado pela adição do inibidor de PLC e por quelante de cálcio.

Levano-Garcia e colaboradores demonstraram que em *P. falciparum*, nos estágios de trofozoíto e esquizontes isolados de hemácias, há mobilização de Ca^{2+} induzida por ATP que é abolida ao remover o Ca^{2+} extracelular, sugerindo a participação de um receptor de ATP que atue como canal de Ca^{2+} (LEVANO-GARCIA et al., 2010).

Outra abordagem mostrou o envolvimento de proteínas quinases com a mobilização de cálcio. Foi verificado que parasitas *P. falciparum* nocaute para o gene PfPK7 tem mobilização de Ca^{2+} induzida pela melatonina diminuída comparado com parasitas selvagens, mesmo não tendo seu ciclo regulado pelo composto (KOYAMA et al., 2009).

Figura 13. Maquinaria de sinalização de cálcio, melatonina e proteínas quinases. Modificado (CRUZ et al., 2012) **Mel**: Melatonina, **R**: receptor, **PLC**: fosfolipase C, **ME**: membrana do eritrócito, **MVP**: membrana do vacúolo parasitóforo, **MP**: membrana do parasita, **RE**: retículo endoplasmático, **RIP3**: receptor de **IP3**, **PK7**: proteína quinase 7, **CaM**: calmodulina, **ECC**: entrada capacitativa de cálcio, **AC**: adenilato ciclase, **FDE**: fosfodiesterase, **PKA**: proteína quinase A, **N**: núcleo, **VA**: vacúolo ácido, **AMPc**: adenosina monofosfato cíclica.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar o papel da quinase PfeIK1 na regulação do ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* mediado por melatonina. Além disso, investigou-se a possível interação desta quinase com o seu alvo, a eIF2 α , analisando a resposta temporal, a distribuição da eIF2 α fosforilada e a expressão do RNA de PfeIK1 na fase intraeritrocítica de *P. falciparum*.

A mobilização intracelular de íons Ca²⁺ induzida por melatonina em cepas nocaute PfeIK1 também foi alvo de estudo nessa dissertação. Em adição, buscamos entender o papel da PfeIK1 na transdução de sinal de melatonina em *P. falciparum* empregando parasitas nocauteados para esta quinase. Também foi foco de investigação, o papel de heme e biliverdina em modular a fosforilação de eIF2 α em células infectadas com *P. falciparum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de *Plasmodium falciparum*

Parasitas *Plasmodium falciparum* cepa 3D7 foram mantidos em garrafas de cultura (175 cm²) (Greiner Bio-One) com meio RPMI 1640 (GIBCO) com 0,04% sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 0,05% de hipoxantina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 0,23% de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e suplementado com 10% de Albumax (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os parasitas nocautes foram mantidos nas mesmas condições com a adição do antibiótico de seleção, blasticidina (2,5 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Todas as garrafas foram ventiladas a uma mistura de gás (7% CO₂, 5% O₂ e 88% N₂) (TRAGER; JENSEN, 1976) e mantidas em incubadora a 37 °C.

Para sustento das culturas, as garrafas foram suplementadas com hemácias humanas, mantendo um hematócrito a 5%. As hemácias foram provenientes de bolsas de plasma e sangue humano, doadas quinzenalmente pelo Centro de Hemoterapia do Hospital do Servidor.

O meio de cultura foi diariamente trocado e, o ciclo do parasita, a análise da parasitemia, contagem de fases dos parasitas e a modulação do ciclo foram acompanhados por esfregaço em lâmina corado por panótico (Rápido LB) e Giemsa (Merck, USA).

3.2 Sincronização das fases intraeritrocítica de *Plasmodium falciparum*

Para a realização de experimentos, as culturas de parasitas predominantemente em estágio de anel foram sincronizadas com sorbitol 10% (LAMBROS; VANDERBERG, 1979) por quinze minutos, centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, e o precipitado solubilizado em meio completo. Sincronizações recorrentes foram realizadas até obtenção de culturas em um mesmo estágio para realização dos experimentos.

3.3 Clone de *Plasmodium falciparum* nocaute para eIK1

O parasita nocauteado para eIK1 (PfeIK1⁻) usado nesse trabalho foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Christian Doerig, da Université de Lausanne (Suíça).

3.4 Clone de *Plasmodium falciparum* nocaute para pfsr25

O parasita nocauteado para pfsr25 (PfSR25⁻) foi construído pelo Dr. Julio Levano Garcia

3.5 Western Blot

Para o WB (*Western Blot*) usamos proteínas extraídas de *P. falciparum* 3D7 no estágio de trofozoíto jovem (24 horas – aproximadamente 14 h pós-sincronização) e as incubamos *overnight* a 4 °C com o anticorpo anti-eIF2 α (1:1000) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) ou anticorpo policlonal anti-Phospho-eIF2 α (1:1000) (Cell Signaling Technology, USA). O anticorpo anti-Phospho-eIF2 α detecta eIF2 α somente quando fosforilada na Ser51, não reconhecendo demais sítios. Para o WB usamos proteínas extraídas de *P. falciparum* 3D7 no estágio de trofozoíto jovem (24 horas – aproximadamente 14 h pós-sincronização) e as incubamos *overnight* a 4 °C com o anticorpo anti-eIF2 α (1:1000) ou anti-Phospho-eIF2 α (1:1000).

Para isso, lisamos os parasitas com saponina 0,02% (m/v) em PBS na presença de inibidores de protease: leupeptina, pepstatina A, antipainá e quimiostatina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, todos 10 μ g/mL), e benzamidina (0,4 mM), e PMSF (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, 1 mM). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por cinco minutos, lavadas três vezes com PBS para remoção das hemácias. O material foi ressuspendido em RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% SDS, 2 mM EDTA, contendo os inibidores de protease acima citados e inibidores de fosfatase: β -glicerofosfato 5 mM, fluoreto de sódio 10 mM e pirofosfato de sódio 10 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Após incubação por trinta minutos, em gelo, o material foi sonificado com três pulsos de quinze segundos em seguida centrifugado 12.000 rpm, 4 °C por dez minutos. O sobrenadante e o precipitado foram coletados para posterior quantificação de proteína por método de Bradford (Bradford, 1976).

Parte da amostra coletada no sobrenadante (equivalente à fração solúvel) foi tratada com fosfatase alcalina (CIP - *Calf-intestinal alkaline phosphatase*) por 1 U/ μ g por trinta minutos a 37 °C.

Às amostras foi adicionado o tampão de Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris HCl), fervidas por cinco minutos a 96 °C e posteriormente separadas em SDS-PAGE 12% (m/v) no tampão de corrida (4 M Tris, 1,92 M Glicina, 0,1% SDS) a 100 V por aproximadamente duas horas; transferidas para membrana de PVDF (Ge Healthcare, USA) através da técnica de *western blot* em tampão de transferência (3 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 20% metanol) a 4 °C sob corrente constante 250 mA por noventa minutos. O bloqueio foi executado em TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween-20) com 3% m/v BSA (albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) por sessenta minutos. A incubação com anticorpo primário (anti-Phospho-eIF2 α 1:1000, Cell Signaling) foi executada a 4 °C *overnight* sob agitação em TBS-T contendo 2% m/v BSA. Após três lavagens em TBS-T (dez minutos cada), a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase 1:24000 (anti IgG rabbit HRP, Ge Healthcare, USA) em TBS-T com 2% BSA a 37 °C por uma hora sob agitação. A revelação foi feita com o *kit* ECL Plus (Ge Healthcare, USA). A membrana foi posteriormente incubada com o anticorpo anti-eIF2 α (1:1000) em TBS-T contendo 2% m/v BSA *overnight* sob agitação. Após as lavagens incubamos a membrana em TBS-T 2% m/v BSA e anticorpo anti-IgG mouse (1:5000, Ge Healthcare, USA) por uma hora e posteriormente revelado conforme descrito acima.

3.6 Tratamento com melatonina e detecção da Phospho-eIF2 α nos estágios intraeritrocítico de *P. falciparum*

Culturas de parasitas *P. falciparum* 3D7 sincronizados para o estágio de anel (14 horas – aproximadamente 6 h pós-sincronização), trofozoíto (30 horas – aproximadamente 18 h pós-sincronização) e esquizonte (46 horas – aproximadamente 30 h pós-sincronização), com 4% de parasitemia, foram tratadas com 100 nM de melatonina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e os respectivos controles com etanol (0,00005%) por 1, 30 e 60 minutos.

Posterior aos tratamentos, as culturas foram imediatamente mantidas em banho de gelo enquanto transferíamos para tubos tipo Falcon. Lavadas três vezes com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4), em seguida lisados com saponina 0,02% (m/v) em

PBS na presença de inibidores de protease: leupeptina, pepstatina A, antipaína e quimiostatina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, todos 10 µg/mL), e benzamidina (0,4 mM), e PMSF (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, 1 mM). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos, lavadas três vezes com PBS para remoção dos lisados sobressalentes de hemácias. O material então recebeu tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% SDS, 2 mM EDTA, inibidores de protease acima citados e inibidores de fosfatase: β-glicerofosfato, fluoreto de sódio e pirofosfato de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), e incubados em gelo por trinta minutos, sonicadas em três pulsos de quinze segundos e então, centrifugadas a 12.000 rpm, 4 °C por dez minutos. O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Após a quantificação, adicionamos tampão de Laemmli e 25 µg de proteína de cada tratamento, incubamos a 100 °C por cinco minutos. As amostras foram colocadas em gel de poliacrilamida 12% (m/v) a 100 V em tampão de corrida (4 M Tris, 1,92 M Glicina, 0,1% SDS). A transferência para membrana de PVDF (Ge Healthcare, USA) foi executada a 250 mA durante noventa minutos a 4 °C em tampão de transferência (3 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 20% metanol). O bloqueio foi executado em TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween-20) com 3% m/v BSA (albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) por sessenta minutos. A incubação com anticorpo primário (anti-Phospho-eIF2α 1:1000, Cell Signaling, USA) foi executada a 4 °C pernoite sob agitação em TBS-T contendo 2% m/v BSA. Após três lavagens em TBS-T (vinte minutos cada), a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase 1:24000 (anti IgG rabbit HRP, Ge Healthcare, USA) em TBS-T com 2% BSA a 37 °C por uma hora sob agitação. A membrana foi revelada com o *kit* ECL Plus (Ge Healthcare, USA). Para controle da concentração de proteína usamos o anticorpo anti-GAPDH (1:5000, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA USA) em TBS-T contendo 2% m/v BSA pernoite sob agitação. Após as lavagens incubamos a membrana em TBS-T 2% m/v BSA e anticorpo anti-IgG mouse (1:5000, Ge Healthcare, USA) por uma hora e posteriormente revelado conforme descrito acima.

3.7 Tratamento com melatonina e lise de hemácias para isolamento de parasitas

Culturas de parasitas *P. falciparum* 3D7, PfeIK1⁻ e PfSR25⁻ sincronizados para o estágio de trofozoíto jovem (24 horas – aproximadamente 14 h pós-sincronização), com 4% de parasitemia, foram tratadas com 100 nM de melatonina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e os respectivos controles com etanol (0,00005%) por 1, 5 e 20 minutos.

Posterior aos tratamentos, as culturas foram imediatamente mantidas em gelo enquanto transferíamos para tubos tipo Falcon. Lavadas três vezes com PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na₂HPO₄, pH 7,4), em seguida lisados com saponina 0,02% (m/v) em PBS na presença de inibidores de protease: leupeptina, pepstatina A, antipain e quimiostatina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, todos 10 µg/mL), e benzamidina (0,4 mM), e PMSF (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, 1mM). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por cinco minutos, lavadas três vezes com PBS para remoção das hemácias. O material foi colocado em tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% SDS, 2 mM EDTA, inibidores de protease acima citados e inibidores de fosfatase: β-glicerofosfato, fluoreto de sódio e pirofosfato de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), e incubados em gelo por trinta minutos, sonicadas em três pulsos de quinze segundos e então, centrifugadas a 12.000 rpm, 4 °C por dez minutos. O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), etiquetado e armazenado a -20 °C.

A técnica de *western blot* foi realizada conforme descrita acima.

3.8 Tratamento com Hemina e Biliverdina e lise de hemácias para isolamento de parasitas

Culturas de parasitas *P. falciparum* 3D7 sincronizados para o estágio de trofozoíto 30 horas (aproximadamente 18 h pós-sincronização), com 4% de parasitemia, foram divididas em três grupos, sendo um sem qualquer tratamento (controle), um tratado com 1 µM de biliverdina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e o outro com 1 µM de hemina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) por 1, 5 e 20 minutos.

Posterior aos tratamentos, as culturas, incluindo controle (sem qualquer composto adicionado), as proteínas foram extraídas e quantificadas, e o *western blot* realizado segundo protocolo acima descrito.

3.9 Análise quantitativa do western blot

A intensidade das bandas foi mensurada no programa Scion Image (Scion Corporation) e normalizadas em relação ao controle de carregamento GAPDH.

3.10 Ensaio de cálcio intracelular

Parasitas *P. falciparum* cepa 3D7 e PfeIK1⁻ foram sincronizados (sorbitol 10%) e utilizados cerca de 24 horas após a sincronização em anel, estágios entre trofozoíto maduro (34 h) e esquizonte jovem (38 h). As culturas foram coletadas e os parasitas obtidos através da lise dos eritrócitos com saponina (10 mg/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Os parasitas isolados foram lavados três vezes (13.000 g, 5 minutos) em tampão M (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 5,5 mM D-glicose, 50 mM MOPS, 2 mM CaCl₂, pH 7,2) e incubados durante uma hora a 25 °C em tampão M com 5 µM de Fluo4-AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, Carlsbad, CA, USA), previamente diluído em dimetilsulfóxido anidro (DMSO) e 40 µM de probenecide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Ao término da incubação, o indicador fluorescente extracelular foi removido por três lavagens em tampão M. Para o experimento de espectrofluorimetria 10⁸ parasitas foram analisados em relação à fluorescência do Fluo4-AM foi monitorada em um espectrofluorímetro (RF5301PC Shimadzu Corporation, Nakagyo, Kyoto, Japão) e verificado mobilização de cálcio após a adição de melatonina 100 nM ou solvente. As curvas de calibração referentes à concentração de Ca⁺² livre obtida são feitas através do programa Super Ion Probe – Versão 1.00 (Shimadzu Corporation, Nakagyo, Kyoto, Japão). Fluo4-AM foi excitado em 505 nm com a lâmpada de Xenônio e a fluorescência emitida captada em 530 nm, com frequência de 1 Hz. A concentração de cálcio foi calculada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$[Ca] = Kd * \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

Sendo $[Ca]$, a concentração do íon cálcio; F_{max} , a fluorescência máxima obtida através da adição de digitonina (Merck, USA) ao final do experimento; F_{min} , a fluorescência mínima obtida através da adição de EGTA, após a adição de digitonina; F a fluorescência em um dado momento e K_d é a constante de dissociação do Fluo-4 AM, considerada 345 nM.

3.11 PCR em tempo real

Culturas de parasitas *P. falciparum* 3D7 sincronizados para o estágio de anel (14 horas – aproximadamente 6 h pós-sincronização), trofozoíto (30 horas – aproximadamente 18 h pós-sincronização) e esquizonte (44 horas – aproximadamente 30 h pós-sincronização), com 4% de parasitemia, foram tratadas com 100 nM de melatonina por 4 horas e os respectivos controle com etanol. Extraímos o RNA total dos parasitas usando Trizol e purificamos em colunas de troca iônica tratadas com DNase utilizando RNase-free DNase set (Qiagen # 79524) e RNeasy Mini Kit (# 74104, Qiagen, Duesseldorf, Germany).

As dosagens do RNA extraído das amostras foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis Nano Drop 2000c (Thermo Scientific) usando 1,5 µL de cada amostra de RNA total. O sistema de retenção de amostras elimina a necessidade de cubetas ou capilares, o que diminui a quantidade de amostra necessária para a quantificação. A tensão superficial é utilizada para manter uma coluna de amostra de líquido no local enquanto uma medição é feita.

Os RNAs (1 µg) obtidos das amostras foram transcritos reversamente usando iniciadores randômicos e a enzima transcriptase SuperScript II RNAase H (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando Power SYBR green mix (Applied Biosystem) em triplicata. A sequência dos iniciadores utilizada nesse trabalho é fornecida na Tabela 1. As mudanças relativas na quantidade de mRNA dos genes *seril tRNA sintetase* determinadas pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ou pela transformação do ciclo de *threshold* em números absolutos de mRNA.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados na PCR quantitativa.

PF14_0423-Fwd	ACGCACTCAAACCAATCAACTTT
PF14_0423-Rvs	GTTTATTAAGCTCCGCTTGGTCCAT

4 RESULTADOS

4.1 A expressão de PfeIK1 é reduzida em anel quando células infectadas com *P. falciparum* são tratadas com melatonina

Similar ao que ocorre com o nocaute para quinase 7 (PfPK7) em *P. falciparum* demonstrado em Koyama et al (2013), em sua dissertação de mestrado, Ramira Yuri, reportou que cepas *P. falciparum* nocaute para a quinase PfeIK1 não são capazes de serem sincronizadas com a adição de melatonina. Conforme discutido amplamente na Introdução, melatonina é capaz de sincronizar cepas *wild type* de *P. falciparum* quando incubadas em cultura (HOTTA et al., 2000). Koyama et al. (2011; 2013) exploraram o papel da PfPK7 na sincronização com relação a sinalização de cálcio e a capacidade de ativação do sistema ubiquitina proteossoma (UPS) (KOYAMA et al., 2012). Nesta dissertação, desenvolvemos um trabalho com intuito de explorar o mecanismo de ação envolvido na sincronização de *P. falciparum* utilizando parasitas geneticamente modificados para não expressarem a proteína PfeIK1. Realizamos experimentos sob duas condições distintas: células tratadas com melatonina e controle. Para isto, realizamos experimentos de PCR em tempo real após tratamento das culturas de parasitas selvagens por 4 horas com melatonina 100 nM para investigar os níveis de transcritos da PfeIK1 nos estágios de anel, trofozoíto e esquizonte. O RNA foi extraído segundo protocolo descrito a partir das culturas cujos esfregaços corados com Giemsa são mostrados na figura 15.

Figura 14. Análise da expressão relativa por PCR em tempo real do gene PfeIK1 em resposta ao tratamento com melatonina. Parasitas 3D7 selvagem nos estágios anel (14 h), trofozoíto (30 h) e esquizonte (44 h), após 4 h de tratamento com melatonina 100 nM, foram comparados quanto a expressão do gene PfeIK1 em relação aos parasitas tratados apenas como solvente (controle – etanol 0,00005%). A expressão do gene PfeIK1 foi normalizada pela do gene Seril t-RNA Sintetase. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica independentes. A análise estatística foi realizada com os valores de $\Delta\Delta C_t$ em $\log_2$ pelo teste *t* de Student e pós-teste de Dunnett, *** $p < 0,05$.

A figura 14 mostra os valores da expressão relativa de PfeIK1 em anel, trofozoíto e esquizonte com e sem tratamento com melatonina. Os dados demonstram claramente que na presença de melatonina, parasitas 3D7 selvagem no estágio de anel têm expressão do gene PfeIK1 reduzida em 40%. Desta forma, podemos concluir que a melatonina possui um papel na regulação da expressão gênica de PfeIK1 durante o estágio de anel. No entanto nenhuma variação de transcritos após tratamento com melatonina foi observada nos estágios de trofozoíto e esquizonte.

Figura 15. Esfregaços de *P.falciparum* 3D7 tratados ou não com 100nM de melatonina observadas ao microscópio após serem coradas com Giemsa nos estágios de anel (14 h), trofozoíto (30 h) e esquizonte (44 h).

4.2 Melatonina mobiliza cálcio dos estoques intracelulares em parasitas *P. falciparum* nocaute para eIK1

Sabemos que a percepção do meio extracelular pelo parasita envolve uma série de receptores e componentes sinalizadores para desencadear a sincronização promovida pela melatonina. Cálcio é um sinalizador universal incluindo uma gama de regulação de processos celulares desde contração muscular a eventos rápidos que ocorrem em milissegundos como na exocitose de vesículas sinápticas ou em horas, como no caso da regulação da expressão gênica (BERRIDGE et al., 2003).

O mecanismo molecular da sincronização de parasitas por melatonina inclui a mobilização dos estoques de cálcio intracelular no parasita. Sabe-se da participação de proteínas quinases nesse processo, PKA – quinase dependente de AMPc cíclico, participa da sinalização de Ca^{2+} citosólico. Koyama e colaboradores (KOYAMA et al., 2012) investigaram a participação da quinase PfPK7 na sinalização mediada por melatonina em *P. falciparum* usando como ferramenta, parasitas nocautes para esse gene (PfPK7^{-/-}). Os autores concluíram que PfPK7 possui um papel importante na sincronização mediada por melatonina, além da possível atuação na dinâmica de Ca^{2+} . Parasitas nocautes para PfeIK1 foram não responsíveis a melatonina para a

modulação do ciclo intraeritrocítico assim como os nocautes de Pfk7. Dado essas observações, nosso próximo passo foi analisar o comportamento de PfeIK1⁻ com relação a dinâmica de cálcio.

Para este propósito, parasitas 3D7 selvagem e nocaute para PfeIK1 previamente isolados da membrana do eritrócito e carregados com marcador fluorescente de Ca²⁺ Fluo-4 foram analisados quanto a capacidade de liberação desse íon no citoplasma induzida por melatonina. A figura 16 mostra um gráfico normalizado da dinâmica de cálcio nos parasitas *P. falciparum* 3D7 selvagem e nocaute para PfeIK1. Nossos resultados indicam que parasitas PfeIK1⁻, na presença de melatonina 100 nM exibem aumento do cálcio citosólico comparável ao observado com parasitas selvagem. Estes experimentos foram realizados com parasitas no estágio de trofozoíto.

Figura 16. Gráfico representativo de dinâmica de cálcio nos parasitas *P. falciparum* 3D7 selvagem e nocaute para PfeIK1 obtidos com a adição de melatonina e os respectivos controles (solvente, EtOH 0,00005%). Dados normalizados. F1/F0, razão da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias.

A figura 17 representa graficamente a resposta de cálcio induzida por melatonina 100 nM em eritrócito infectado por *P. falciparum* selvagem e nocaute para PfeIK1 em estágio trofozoíto. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica independente e

analisados estatisticamente no *software* GraphPad Prism com ANOVA One-way e pós teste de Bonferroni.

Figura 17. Aumento de cálcio em resposta a melatonina em *P. falciparum* 3D7 e PfeIK1⁻. Fluorescência relativa de Ca²⁺. A razão da intensidade de fluorescência (F1/F0) foi plotada no gráfico mostrando as cepas analisadas. A melatonina foi adicionada no tempo de 50 segundos e comparada ao controle (etanol). PfeIK1⁻ mobiliza cálcio na presença de melatonina assim como a cepa selvagem sob mesmo tratamento. ***p<0,05.

4.3 Anticorpo anti-Phospho-eIF2 α reconhece especificamente Phospho-eIF2 α de *Plasmodium falciparum*

O anticorpo policlonal Phospho-eIF2 α (Ser51) detecta eIF2 α somente quando a serina 51 está fosforilada, o anticorpo não reconhece outros sítios fosforilados do fator de tradução. Entretanto, a forma comercial é compatível com células de humanos, camundongos, ratos, macacos e *Drosophila melanogaster*.

A fim de verificar a reatividade com eIF2 α de *P. falciparum*, nós realizamos experimentos de *western blot* (WB) usando proteínas extraídas de *P. falciparum* cepa 3D7 no estágio de trofozoíto jovem (24 h – aproximadamente 14 h pós-sincronização) e os anticorpos anti-eIF2 α (1:1000) e anti-Phospho-eIF2 α (1:1000), investigamos a especificidade deste reagente para a proteína do parasita, além de examinar a eficiência do anticorpo. Inicialmente,

como mostrado na figura 18, examinamos a eficiência do anticorpo e determinamos a presença de eIF2 α na fração solúvel ou insolúvel do extrato de proteínas totais. Estas foram obtidas a partir de tratamento do parasita com tampão RIPA (conforme descrito em métodos) e na etapa de centrifugação foram coletadas duas frações: uma referente ao sobrenadante (fração solúvel) e outra sendo o precipitado. A fração solúvel foi dividida em 2 outras alíquotas e uma dessas teve fosfatase alcalina adicionada (CIP) e a outra não (controle). As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 12% e prosseguiu-se com o WB. Esses experimentos mostraram nossos substratos de interesse, eIF2 α e P-eIF2 α na fração solúvel. Mostramos ainda a especificidade do anticorpo anti P-eIF2 α para proteínas fosforiladas, uma vez que a alíquota da fração solúvel tratada com fosfatase alcalina (CIP) não foi reconhecida pelo anticorpo anti P-eIF2 α . A proteína de interesse, Phospho-eIF2 α e a eIF2 α , apresentam 38 kDa de peso molecular.

Figura 18. Anticorpo anti-eIF2 α e anti-P-eIF2 α reconhecem de maneira específica, respectivamente eIF2 α e eIF2 α fosforilada de *P. falciparum*. Western blot de lisados obtidos de parasitas *P. falciparum* 3D7 sincronizados no estágio de trofozoíto (as amostras foram corridas em duplicatas biológicas independentes) tratadas com CIP (fosfatase alcalina) e não tratadas. Incubação das amostras com CIP mostrou uma substancial redução da fosforilação de eIF2 α , mas não teve efeito sobre eIF2 α total.

Para efeito de controle realizamos WB com eritrócitos não infectados. O conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Bradford descrito em métodos e separados em gel de SDS-PAGE 12% e incubados com os anticorpos anti Phospho-eIF2 α e posteriormente com anti-GAPDH. Conforme mostrado na figura 19, eritrócitos não infectados apresentam eIF2 α fosforilada, justificando assim a necessidade de um método de extração eficiente cuja finalidade inclui a remoção total da membrana de eritrócito, isolando apenas o parasita.

Figura 19. *Western blot* de eritrócitos não infectados. As células possuem eIF2 α fosforilado. As 3 bandas representam diferentes amostras coletadas. Anti Phospho-eIF2 α (1:1000) e o controle de carregamento anti-GAPDH (1:5000).

4.4 eIF2 α , um substrato da proteína quinase PfeIK1, é expressa majoritariamente no estágio de trofozoíto

O estágio de trofozoíto é conhecido por ser metabolicamente mais ativo, entretanto, estudos de Pease e colaboradores analisando a expressão de transcritos, tradução e a fosforilação ao longo dos três estágios intraeritrocíticos de *Plasmodium falciparum* constaram que, de maneira geral, a transcrição é aumentada no estágio de esquizonte, mas a expressão de proteínas é menor (PEASE et al., 2013). Ou seja, a transcrição e tradução não se apresentam de maneira simultânea no ambiente celular.

Essa observação nos levou a investigar a expressão de eIF2 α fosforilada nos estágios do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*; abordando dois aspectos concomitantemente: resposta a melatonina e relação com o tempo de exposição. Parasitas *P. falciparum* 3D7 sincronizados e coletados nos seguintes estágios: anel (14 h), trofozoíto (30 h) e esquizonte (44 h) foram incubados com melatonina 100 nM e os respectivos controles com etanol por 1, 30 e 60 minutos; as proteínas foram coletadas e separadas em SDS-PAGE 12%. Procedendo-se a análise de fosforilação por *western blot*, incubamos com o anticorpo anti-Phospho-eIF2 α (1:1000, ON 4 °C) e posteriormente com anti-GAPDH (1:5000, ON 4 °C), o qual funciona como controle de carregamento.

Nossos resultados mostram níveis diferenciais de eIF2 α fosforilada ao longo do ciclo intraeritrocítico. Em anel temos uma pequena detecção comparada a trofozoíto, e substancialmente reduzida em esquizonte. Vale ressaltar o controle de carregamento, mesmo esquizonte apresentando uma maior intensidade de GAPDH durante este estágio, a detecção Phospho-eIF2 α é substancialmente reduzida (figura 20).

Figura 20. A expressão de P-eIF2 α é diferencial ao longo do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Parasitas *P. falciparum* 3D7 foram submetidos a tratamento com melatonina 100 nM por 1, 30 e 60 minutos, e feitos os respectivos controles com etanol. A fosforilação de PfeIF2 α foi detectada com o anticorpo específico anti Phospho-eIF2 α (1:1000, Cell Signaling) e o controle de carregamento usando anti-GAPDH (1:5000, Sigma Aldrich).

Através do programa de densitometria Scion Image (Beta 4.0.2, Scion Corporation) quantificamos as intensidades relativa das bandas e no GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc.) realizamos as estatísticas. Nossas análises examinaram a quantidade de eIF2 α fosforilada em anel, trofozoíto e esquizonte nas diferentes condições, melatonina e controle. Observamos que o tratamento com melatonina não causou efeito adicional na fosforilação de eIF2 α sob essas condições, entretanto podemos observar uma fosforilação

Figura 21. A expressão fosforilação de P-eIF2α em *P. falciparum* é maior no estágio de trofozoíto. Parasitas *P. falciparum* 3D7 foram submetidos a tratamento com melatonina 100 nM e os respectivos controles com etanol. A fosforilação de eIF2α é maior no estágio de trofozoíto tanto no controle (a) quanto no tratado com melatonina (b). A porcentagem de P-eIF2α é aumentada em trofozoíto e decai em esquizonte. A fosforilação de PfeIF2α foi detectada com o anticorpo específico anti Phospho-eIF2α e quantificada no com o software Scion Image em relação ao controle de carregamento GAPDH. Análise estatística ANOVA e o pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison (** duplicata biológica com p-value<0,05).

A principal relevância desse experimento consiste na identificação dos níveis de fosforilação diferenciada de eIF2α ao longo do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* indicando a participação de quinases com potencial alvo de fosforilar o substrato eIF2α. Desta forma, constatamos a fosforilação aumentada em trofozoíto jovem, sugerindo uma maior atividade de quinases nesse estágio.

4.5 Parasitas *P. falciparum* nocautes para eIK1 (PfeIK1⁻) são capazes a fosforilar eIF2α

Determinada a expressão de Phospho-eIF2α na fase de trofozoíto, analisamos se a fosforilação de eIF2α é o mecanismo determinante da ausência de sincronização (progressão para estágios mais tardios) do parasita tratado com melatonina.

Eventos de fosforilação são conhecidos como excelentes sinalizadores celulares devido à velocidade em ISR. Parasitas *P. falciparum* 3D7 e nocautes para eIK1 (PfeIK1⁻), sincronizados para o estágio de trofozoíto jovem (22 h), foram tratados com 100 nM de melatonina e os respectivos controles com etanol por 1, 5 e 20 minutos. Procedeu-se o isolamento dos parasitas e extração das proteínas totais em fração solúvel. As proteínas foram

separadas em SDS-PAGE e imunodetectadas com anticorpo anti Phospho-eIF2 α (1:1000) e o controle de carregamento com anti-GAPDH (1:5000).

Constatamos que os parasitas *P. falciparum* nocautes para eIK1 (PfeIK1⁻) quando tratados ou não com melatonina apresentaram habilidade de fosforilar eIF2 α (Figura 22). Essa informação nos sugere que outra quinase cujo substrato seja eIF2 α tende a suprir a ausência da PfeIK1, uma vez que foram observados níveis basais similares de Phospho-eIF2 α no parasita deficiente para a enzima quinase PfeIK1, tanto na presença de etanol ou melatonina.

Figura 22. Parasitas nocautes para eIK1 (PfeIK1⁻) tem a subunidade α do fator eIF2 fosforilada. Parasitas *P. falciparum* 3D7 e PfeIK1⁻ foram submetidos a tratamento com melatonina 100 nM e os respectivos controles com etanol. A fosforilação de PfeIF2 α foi detectada com o anticorpo específico anti Phospho-eIF2 α e a intensidade das bandas foi quantificada no programa Scion Image em relação ao controle de carregamento GAPDH.

Através do programa de densitometria Scion Image (Beta 4.0.2, Scion Corporation) quantificamos as intensidades das bandas e no GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc.) realizamos as estatísticas (Two Way – ANOVA com pós-teste de Bonferroni) para os experimentos realizados em triplicata biológica independentes. Concluímos que a ausência da quinase eIK1 não tem efeito sobre a fosforilação basal de eIF2 α (figura 23), sugerindo que outra quinase possa ser responsável pela manutenção desse basal. Além disso, os parasitas

nocautes e selvagens não exibiram qualquer alteração no perfil de fosforilação sob os tratamentos com melatonina, indicando que a quinase PfeIK1 não é ativada pelo composto.

Figura 23. A fosforilação de eIF2 α exibe o mesmo perfil em *P. falciparum* selvagem e nocaute. Parasitas *P. falciparum* 3D7 foram submetidos a tratamento com melatonina 100 nM e os respectivos controles com etanol. A fosforilação de PfeIF2 α foi detectada com o anticorpo específico Anti Phospho-eIF2 α e quantificada no Scion Image em relação ao controle de carregamento GAPDH. 3D7 e PfeIK1⁻ não respondem à melatonina alterando a fosforilação basal de eIF2 α . As análises estatísticas realizadas em Two Way – ANOVA com pós-teste de Bonferroni (triplicata biológica comp-value>0,05).

4.6 Parasitas *P. falciparum* nocautes para SR25 (PfSR25⁻), não respondem a melatonina e possuem níveis basais de eIF2 α fosforilada

A partir da observação de que outra quinase que não PfeIK1 é responsável pela fosforilação basal de eIF2 α , analisamos o envolvimento de eIF2 α em relação a ativação do receptor PfSR25, cuja sinalização ocorre por uma outra via que não aquela desencadeada por melatonina. PfSR25 é um possível receptor serpentina de *Plasmodium falciparum*, cuja ativação resulta no aumento de cálcio citosólico dependente de PLC. Analisamos se o tratamento de melatonina às parasitas *P. falciparum* nocaute para SR25 (PfSR25⁻) seria capaz de promover alteração nos níveis de eIF2 α fosforilada nos tempos 1, 5 e 8 minutos.

Parasitas nocaute e selvagem foram tratados com melatonina 100 nM bem como os respectivos controles com etanol, conforme o protocolo descrito em métodos. Nossos resultados mostraram que

parasitas selvagem e nocaute possuem a mesma capacidade de fosforilar a subunidade α do fator eIF2, sugerindo que PfSR25 não participe da manutenção da fosforilação basal de eIF2 α , nem integra a via de sinalização desencadeada por melatonina uma vez que a sua deleção não resultou em nenhuma alteração na resposta observada àquela presente em parasitas 3D7 (figura 24 e 35).

Figura 24. Parasitas nocautes para SR25 (PfSR25⁻) não são modulados pela melatonina na fosforilação de eIF2 α . Parasitas *P. falciparum* 3D7 e PfeIK1⁻ foram submetidos ao tratamento com melatonina 100 nM e os respectivos controles com etanol. A fosforilação de PfeIF2 α foi detectada com o anticorpo específico Anti Phospho-eIF2 α e quantificada pelo Scion Image em relação ao controle de carregamento GAPDH.

A quantificação da intensidade das bandas foi realizada no programa de densitometria Scion Image (Beta 4.0.2, Scion Corporation), e no GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc.) usando Two Way – ANOVA com pós-teste de Bonferroni para os experimentos realizados em triplicata biológica independentes. Os diferentes tratamentos em ambos os parasitas não exibiram significância ($p > 0,05$), (figura 30).

Figura 25. Parasitas nocaute para PfSR25 (PfSR25⁻) tem o mesmo perfil de fosforilação de eIF2 α quando comparado a 3D7. PfSR25 não participa da sinalização de eIF2 α via melatonina. As análises estatísticas realizadas em Two Way – ANOVA com pós-teste de Bonferroni (triplicata biológica com p-value>0,05).

Observamos ainda que parasitas selvagem e nocaute para PfSR25, não exibiram qualquer diferença com relação ao desenvolvimento sob os tratamentos realizados conforme podemos ver na figura 26.

Figura 26. Análise de imagens de parasitas corados com Giemsa utilizando cepas de *P. falciparum* selvagem e nocaute PfSR25. 3D7 e PFSR25 Ctrl (controle - EtOH) e tratado (Mel 100 nM).

4.7 Biliverdina e hemina estimulam a fosforilação de eIF2 α de *P. falciparum*

Dado o controverso papel da biliverdina e heme como tóxicos ou como participantes da via de sinalização em *P. falciparum*, avaliamos a resposta dos parasitas a esses compostos. Para isso, parasitas *P. falciparum* 3D7 sincronizados para o estágio de trofozoíto 30 h (aproximadamente 18 h pós-sincronização) foram avaliados quanto a habilidade de fosforilação de eIF2 α sob três condições distintas: uma sem qualquer tratamento (controle), uma tratada com 1 μ M de biliverdina e outra com 1 μ M de hemina, todas por 1, 5 e 20 minutos.

Nossos resultados (Figura 27) mostraram que parasitas incubados com biliverdina e hemina (5 minutos) apresentam maior nível de fosforilação de eIF2 α em relação ao controle. Os dados sugerem que tanto a hemina quanto biliverdina atuam como uma condição de estresse, desencadeando uma resposta via eIF2 α . O tratamento de parasitas por 20 minutos com biliverdina e ou hemina mostrou que houve uma quantidade inferior ao basal de P-eIF2 α , sugerindo papel para biliverdina e hemina na ISR.

Figura 27. Biliverdina e hemina podem atuar na via de sinalização mediada pelo fator eIF2 através da fosforilação da subunidade α . Parasitas *P. falciparum* 3D7 foram submetidos ao tratamento com biliverdina 1 μ M, hemina 1 μ M e os respectivos controles sem qualquer composto por 1, 5 e 20 minutos. A fosforilação de PfeIF2 α foi detectada com o anticorpo específico anti Phospho-eIF2 α e quantificada no Scion Image em relação ao controle de carregamento GAPDH.

Conforme procedido para os demais experimentos deste trabalho, quantificamos as intensidades das bandas no programa de densitometria Scion Image (Beta 4.0.2, Scion Corporation), e no GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, Inc.), o qual nos forneceu o seguinte gráfico relacionando a porcentagem de Phospho-eIF2 α em relação ao tratamento e tempo (figura 28).

Figura 28. Parasitas 3D7 incubados com biliverdina e hemina exibem maior porcentagem de eIF2 α fosforilada em 5 minutos. O nível de fosforilação foi quantificado densitometricamente como a proporção de eIF2 α fosforilado e GAPDH.

A análise da parasitemia e acompanhamento do ciclo foram realizados por microscopia (figura 34) e curiosamente observamos que parasitas com maior porcentagem de eIF2 α fosforilada (hemina e biliverdina 5 minutos) apresentaram-se estágio de trofozoíto sutilmente mais novo que os parasitas incubados por 20 minutos com biliverdina e hemina (menor porcentagem de P-eIF2 α). Entretanto, dado o tempo de tratamento (1, 5 e 20 minutos) em relação do ciclo do parasita (48 h) não podemos correlacionar.

Figura 29. Os tratamentos com biliverdina e hemina não foram citotóxicas as culturas de *P.falciparum*. Esfregaços obtidos a partir dos tratamentos realizados, biliverdina, hemina e os controles nos tempos 1, 5 e 20 minutos.

5 DISCUSSÃO

5.1 A proteína quinase PfeIK1

O controle da tradução de proteínas desempenha papel crucial na regulação da expressão gênica em eucariotos, esse processo é muitas vezes regulado por proteínas quinases, as quais afetam vários processos celulares tais como: proliferação, apoptose e diferenciação. A fosforilação promovida por proteínas quinases pode gerar notáveis mudanças na atividade enzimática, estabilidade, e mudança de localização subcelular dos seus substratos. Além disso, o processo pode ser rapidamente revertido por fosfatases (DOERIG et al., 2015; LIM et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

Plasmodium falciparum é capaz de perceber alterações do meio ambiente e sinalizar seu ciclo de vida. Reportamos a ação da melatonina, bem como de outros compostos derivados de triptofano em *P. falciparum*, na sincronização do ciclo de vida do parasita (BUDU et al., 2007). Dados do nosso grupo mostraram a mecanismo de ação da melatonina para regular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* ocorre via alteração da concentração dos segundos mensageiros, Ca^{2+} e cAMP (HOTTA et al., 2000). A melatonina promoveu o aumento de cAMP e cálcio e ativou PKA. Esta, por sua vez, quando inibida (por H8 ou PKI) bloqueou o crescimento do parasita. O aumento de cAMP também foi bloqueado pelo inibidor da fosfolipase C (U73122), e por quelante de cálcio (BAPTA) (BERALDO; GARCIA, 2005).

Através de análise *in silico* e PCR em tempo real, nosso grupo identificou quatro putativos receptores serpentinicos envolvidos na percepção de sinais os quais poderiam desencadear as demais etapas da cascata de sinalização desencadeada por ligantes: PfSR1, PfSR10, PfSR12 e PfSR25 (MADEIRA et al., 2008). Recentemente, Moraes e colaboradores em trabalho ainda não publicado mostram que PfSR25 comporta-se como um sensor de K^+ que modula a sinalização por cálcio os demais receptores putativos encontram-se em fase de estudo.

Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados no âmbito de quinases em *P. falciparum*, possibilitando a identificação de diversas enzimas envolvidas nos mais variados processos celulares (ANAMIKA et al., 2005). Um dos fatos mais interessante deriva da descoberta de quinases exclusivas a *P. falciparum*, um promissor alvo para droga antimalárica (BULLARD et al., 2013). Nosso grupo verificou a participação de proteínas quinases na cascata de sinalização disparada pelo estímulo da melatonina; a PKA (BERALDO; GARCIA, 2005), PK7 (KOYAMA et al., 2012) e PfeIK1 – objeto de estudo neste trabalho.

Para o estudo de PfeIK1 utilizamos como ferramenta parasitas nocautes para o gene *pfeik1*, e caracterizamos o processo de fosforilação do seu substrato, eIF2 α , em resposta a melatonina. Uma vez que dados de Ribeiro (2010) mostraram que PfeIK1 não responde a melatonina (tanto na parasitemia quanto na progressão sincrônica para estágios maduros) investigamos a participação da fosforilação de eIF2 α na ausência de sincronização por melatonina. Sabendo-se da relevância do cálcio como mediador na via de sinalização, observamos o comportamento de parasitas nocautes para eIK1. Os estudos de espectrofluorimetria sugerem que a quinase PfeIK1 não é decisiva para mobilização de cálcio dos estoques intracelulares e consequentemente não compartilha a via de sinalização mediada por Ca²⁺, sendo um componente *downstream*.

O mecanismo conhecido para sincronização por melatonina e mobilização de cálcio propõe que a percepção da melatonina pelo seu receptor ative PLC gerando um aumento no cálcio citosólico, o qual ativa adenilato ciclase gerando um aumento de cAMP, e consequente ativação de PKA e também de PK7, resultando na resposta de sincronização (BERALDO; GARCIA, 2005; KOYAMA et al., 2012). Entretanto, como parasitas nocaute exibe a capacidade de mobilização de cálcio após a adição de melatonina, apesar da perda de sincronização por este composto, acreditamos que um outro mecanismo está envolvido no processo de sincronização.

Como abordado nesse trabalho, quinases podem desempenhar diversas funções em *Plasmodium*, por exemplo, mudando o programa de tradução através da percepção de sinais tais como hemina ou biliverdina. Anamika e colaboradores identificaram cerca de 99 proteínas quinases no quinoma de *P. falciparum*, destas somente três têm como substrato a subunidade α do fator eIF2, que quando fosforilado na serina 51,

resulta na seletiva tradução de mRNAs que codificam para proteínas de resposta a estresse (ANAMIKA et al., 2005; DE HARO et al., 1996; WARD et al., 2004). PfeIK2 é ativada predominantemente no estágio de esporozoítos na glândula salivar do mosquito anofelino, ocasionando a inibição da tradução e o acúmulo de mRNA dentro dos grânulos. Tem sido proposto que a PfeIK2 não está relacionada a qualquer mecanismo de resposta à estresse, porém deve integrar mecanismo de sobrevivência do parasita durante a transição de hospedeiros (ZHANG et al., 2010).

A quinase PfpK4 é crucial para o desenvolvimento do parasita, pois parasitas nocautes para essa proteína não foram viáveis. Para o estudo desta quinase, utilizaram-se de uma PfpK4 recombinante e através de técnicas como WB e microscopia confocal determinaram as formas: 80kDa durante todo ciclo intraeritrocítico e em merozoítos; e a forma de 90kDa presente, principalmente, no estágio mais maduro do parasita (esquizonte segmentado). No estágio de trofozoíto foi verificado que PfpK4 está distribuída em todo parasita, mas durante esquizonte está localizada nas roptrias e no complexo apical. Referente às propriedades bioquímicas, os pesquisadores identificaram atividade de autofosforilação e fosforilação para PK4, que se mostra uma quinase multifuncional, pois além da distribuição ao longo de todo ciclo intraeritrocítico, a presença nas roptrias sugere um possível papel na invasão do eritrócito, formação do vacúolo parasitóforo e o desenvolvimento em anel jovem (MOHRLE et al., 1997).

Fennel e colaboradores desenvolveram um parasita nocaute para PfeIK1, bem como através de mutagênese sítio dirigida desenvolveram um PfeIF2 α mutante (Ser⁵⁹ – Ala). É importante ressaltar que a Ser 59 em *Plasmodium* equivale a Ser na posição 51 de mamíferos. Com esses instrumentos, concluíram que PfeIK1 fosforila o a subunidade α do fator eIF2 em condições de privação de aminoácidos (FENNELL et al., 2009).

Neste trabalho, utilizando da técnica de PCR em tempo real avaliamos a abundância de transcritos de PfeIK1 nos três estágios do ciclo intraeritrocítico, inclusive em relação a presença da melatonina, que conforme abordado acima apresenta-se como um modulador do ciclo. Nossas observações indicaram que a transcrição de PfeIK1 é sensível a melatonina no estágio de anel, pois *P. falciparum* 3D7 selvagem incubado com melatonina teve redução dos transcritos em 40%. Entretanto, como Pease e colaboradores mostraram que alguns mRNA

tem uma meia vida longa, pois picos de determinados transcritos (genes) em estágio de anel exibiam a expressão proteica relativa ao gene no estágio de esquizonte (PEASE et al., 2013). Com o propósito de correlacionar a diminuição da transcrição de PfeIK1 em parasitas tratados com melatonina em estágio de anel de PfeIK1 e o efeito da fosforilação de eIF2 α , procedemos um *western blot* examinando o papel da melatonina sob a fosforilação da subunidade α deste fator - substrato da PfeIK1 - ao longo do ciclo intraeritrocítico. A PCR quantitativa e o WB sugerem que a diminuição de transcritos de PfeIK1 (em estágio de anel submetidos ao tratamento com melatonina) não impacta na fosforilação de eIF2 α de *P. falciparum* sob as mesmas condições. Por outro lado, o WB mostrou que durante o ciclo intraeritrocítico a fosforilação de eIF2 α é substancialmente maior em trofozoíto, apesar da expressão do transcrito de PfeIK1 manter-se constante ao longo do ciclo intraeritrocítico na ausência de melatonina.

Uma vez que observamos a mobilização de cálcio em parasitas nocautes para PfeIK1 e a ausência de sincronia em resposta a melatonina, nós averiguamos se a fosforilação de eIF2 α seria responsável. Constatamos que parasitas PfeIK1⁻ fosforilam seu substrato de forma equivalente ao selvagem, na presença ou não de melatonina. Sabemos que eIF2 α fosforilada pode alterar o programa de tradução, podendo inclusive ser um mecanismo de parada da progressão do ciclo. Entretanto níveis similares de fosforilação do substrato nos sugerem que: a fosforilação de eIF2 α não é o mecanismo que leva a sincronização por melatonina; e que na ausência de PfeIK1 outra quinase cujo substrato é eIF2 α é responsável pela fosforilação basal desta.

Baseado em todas as informações apresentadas, sugerimos o envolvimento de PfeIK1 na via de sinalização desencadeada por melatonina, porém de forma independente do aumento de cálcio promovido por melatonina, sugerindo que a ativação de PfeIK1 ocorre paralela ao aumento de cálcio ou encontra-se *downstream* a este aumento.

5.2 Biliverdina e hemina regulam a fosforilação de eIF2 α

Após a invasão do eritrócito, o *Plasmodium*, através da degradação de algumas proteínas gera os aminoácidos necessários para a progressão do ciclo de vida. A hemoglobina é uma dessas proteínas degradadas, cujo produto tóxico é o grupo heme. O grupo heme é polimerizado formando a hemozoína, o pigmento malárico. O grupamento heme (hemina) é

conhecido por acarretar efeitos tóxicos à célula, sendo que altas concentrações de hemina livre podem danificar a membrana do parasita, e ainda inibir algumas proteases (AFT; MUELLER, 1983; SCHMITT et al., 1993; VAN DOOREN et al., 2012). Grandes quantidades de heme são geradas durante a infecção, parte fica na forma livre enquanto uma porção maior é armazenada no vacúolo digestivo cuja concentração é cerca de 100 mM (FRANCIS et al., 1997). Desta forma, o parasita deve exibir um mecanismo de detoxificação para completar seu desenvolvimento dentro do ciclo intraeritrocítico. Foi verificado que a quantidade e tamanho dos grânulos de hemozoína dependem do estágio de desenvolvimento do parasita: anel apresenta a menor concentração, enquanto a maior concentração foi detectada em esquizonte (MOORE et al., 2006). Foi reportado que 95% da hemina livre no estágio de trofozoíto transforma-se em hemozoína (EGAN et al., 2002). Por outro lado, alguns autores sugerem que o parasita exiba um controle estrito da biossíntese e degradação, pois tanto heme quanto seus produtos metabólicos regulam alguns processos importantes para o parasita (SIGALA et al., 2012).

Dado o controverso papel atribuído a hemina, avaliamos os efeitos dessa molécula e seu metabólito, biliverdina, na fosforilação de eIF2 α . É importante ressaltar que a hemina, em mamíferos, é comumente degradada à biliverdina e posteriormente em bilirrubina através da enzima heme oxigenase (HO), sendo uma das principais estratégias para lidar com a toxicidade (DOCHERTY et al., 1984). Em estudos realizados no nosso laboratório, Alves et al, mostrou que hemina e biliverdina, considerados como tóxicos ao parasita, atuam no ciclo intraeritrocítico, modulando-o. Não foi demonstrada qualquer alteração referente à parasitemia, entretanto os parasitas *P. falciparum* incubados com os compostos exibiram um aumento na proporção de estágios jovens (anel e trofozoíto) e diminuição de estágio maduro (esquizonte) (Alves et al, dados não publicados). Além disso, os compostos em concentrações acima de 5 μ M foram tóxicos às células infectadas. Os resultados de Alves et al. (2013), nos sugerem que hemina e biliverdina podem interagir com outros componentes da via de sinalização de sincronização dos parasitas. Trabalhando nessa hipótese, avaliamos o quanto esses compostos impactam na fosforilação da subunidade α do fator eIF2 em *P. falciparum*. Nós observamos que parasitas *P. falciparum* em cultura tratados com biliverdina 1 μ M e hemina 1 μ M tiveram um aumento de fosforilação da subunidade α o fator eIF2 em relação ao controle em 5 minutos, e em 20 minutos a fosforilação foi reduzida. Esses dados mostram o papel de hemina e biliverdina no controle da tradução em *P. falciparum*, uma vez que eIF2 α

fosforilada sinaliza para mudança do programa da tradução e/ou parada, como ocorre no caso da PfeIK2 que fosforila o eIF2 α para manter esporozoítos latentes até o início do desenvolvimento do parasita no hospedeiro vertebrado (ZHANG et al., 2010). Sugerimos que PfeIK2 quinase seja dependente de heme, ou seja membro da família HRI (SUROLIA; PADMANABAN, 1991).

Para diminuição da fosforilação de eIF2 α no tempo de 20 minutos, consideramos o seguinte mecanismo: PfPK4, uma das três quinases capazes de fosforilar eIF2 α , tem sua atividade reduzida. Mohrle e colaboradores demonstraram que PfPK4 reduz em 60% a fosforilação de eIF2 α na presença de heme 10 μ M e esta inibe a atividade de autofosforilação da quinase PfPK4 (MOHRLE et al., 1997), entretanto, conforme nosso grupo constatou concentrações superiores a 5 μ M exibem citotoxicidade.

6 CONCLUSÕES

O *Plasmodium sp.* apresenta um complexo ciclo de vida. A transição entre hospedeiros (invertebrado e vertebrado), fases e estágios do ciclo intraeritrocítico devem ser estritamente reguladas para garantir a proliferação e diferenciação. Nosso grupo e outros vêm buscando elucidar os mecanismos de regulação transcricionais e traducionais no desenvolvimento do parasita. Muitas descobertas foram realizadas como, por exemplo, a modulação do ciclo intraeritrocítico mediada pela melatonina, com participação de segundos mensageiros IP3, Ca^{2+} , cAMP, e enzimas quinases, como PKA e PK7. Entretanto muitos outros componentes podem atuar nessa via de sinalização de forma orquestrada.

Neste trabalho, nós identificamos a importância da quinase PfeIK1, e seu substrato eIF2 α , na modulação do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Mostramos ainda que um maior nível de transcritos de PfeIK1 em determinado estágio não está correlacionado a uma maior atividade e/ou expressão proteica, sugerindo uma meia vida longa do mRNA. Outra informação importante, baseia-se no fato que a ausência da quinase PfeIK1 não acarretou mudança no perfil de fosforilação de eIF2 α , levando-nos a concluir que na sua ausência outras quinases, PfPK4 e PfeIK2, podem substituí-la, sugerindo uma importante função para PfeIK1 no parasita. Ainda no aspecto de fosforilação de eIF2 α e modulação do ciclo intraeritrocítico, observamos que os compostos biliverdina e hemina, cujo papel e degradação em *P. falciparum* são controversos, exibem atividade regulatória em eIF2 α , indicando um papel sinalizador dessas moléculas.

REFERÊNCIAS*

- ABDI, A.; ESCHENLAUER, S.; REININGER, L.; DOERIG, C. SAM domain-dependent activity of PfTKL3, an essential tyrosine kinase-like kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 67, n. 19, p. 3355-3369, 2010.
- ABDI, A. I.; CARVALHO, T. G.; WILKES, J. M.; DOERIG, C. A secreted *Plasmodium falciparum* kinase reveals a signature motif for classification of tyrosine kinase-like kinases. **Microbiology**, v. 159, pt. 12, p. 2533-2547, 2013.
- AFT, R. L.; MUELLER, G. C. Hemin-mediated DNA strand scission. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 19, p. 12069-12072, 1983.
- ALVES, E.; BARTLETT, P. J.; GARCIA, C. R.; THOMAS, A. P. Melatonin and IP3-induced Ca²⁺ release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 7, p. 5905-5912, 2011.
- AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat. Med.**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.
- ANAMIKA, K; SRINIVASAN, N.; KRUPA, A. A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. **Proteins**, v. 58, n. 1, p. 180-189, 2005.
- ARNOLD, J. D.; BERGER, A. E.; MARTIN, D. C. Role of the endocrine system in controlling growth and division synchrony of *Plasmodium berghei* in mice. **J. Parasitol.**, v. 55, n. 5, p. 956-962, 1969.
- BACK, S. H.; SCHEUNER, D.; HAN, J.; SONG, B.; RIBICK, M.; WANG, J.; GILDERSLEEVE, R. D.; PENNATHUR, S.; KAUFMAN, R. J. Translation attenuation through eIF2 α phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. **Cell Metab.**, v. 10, n. 1, p. 13-26, 2009.
- BAGNARESI, P.; NAKABASHI, M.; THOMAS, A. P.; REITER, R. J.; GARCIA, C. R. The role of melatonin in parasite biology. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 181, n. 1, p. 1-6, 2012.
- BARIK, S.; TAYLOR, R. E.; 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.**, v. 272, n. 42, p. 26132-26138, 1997.
- BERALDO, F. H.; GARCIA, C. R. Products of tryptophan catabolism induce Ca²⁺ release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 3, p. 224-230, 2005.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat. Ver. Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 7, p. 517-529, 2003.

BESTEBROER, J.; DE HAAS, C. J.; VAN STRIJP, J. A. How microorganisms avoid phagocyte attraction. **FEMS Microbiol. Ver.**, v. 34, n. 3, p. 395-414, 2010.

BIAGINI, G. A.; BRAY, P. G.; SPILLER, D. G.; WHITE, M. R.; WARD, S. A. The digestive food vacuole of the malaria parasite is a dynamic intracellular Ca²⁺ store. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 30, p. 27910-27915, 2003.

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**, v. 117, n. 4, p. 503-514, 2004.

BOYD, G. H. "Induced variations in the asexual cycle of Plasmodium cathemerium." **Am. J. Hyg.** 9: 181-187, 1929.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUDU, A.; GARCIA, C. R. Generation of second messengers in Plasmodium. **Microbes Infect.** v. 14, n. 10, p. 787-795, 2012.

BUDU, A.; PERES, R.; BUENO, V. B.; CATALANI, L. H.; GARCIA, C. R. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. **J. Pineal Res.**, v. 42, n. 3, p. 261-266, 2007.

BULLARD, K. M.; DELISLE, R. K.; KEENAN, S. M. Malarial kinases: novel targets for in silico approaches to drug discovery. **Methods Mol. Biol.**, v. 993, p. 205-229, 2013.

CANIATO, R.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A.; PURICELLI, L.; BORSARINI, A.; CAPPELLETTI, E. M. Melatonin in plants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 527, p. 593-597, 2003.

CARVALHO, T. G.; DOERIG, C.; REININGER, L. Nima- and Aurora-related kinases of malaria parasites. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1834, n. 7, p. 1336-1345, 2013.

CHAKRAVARTY, S.; RIZVI, S. I. Circadian modulation of human erythrocyte plasma membrane redox system by melatonin. **Neurosci. Lett.**, v. 518, n. 1, p. 32-35, 2012.

CHEN, J. J. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2693-2699, 2007.

CHERRY, A. A.; ANANVORANICH, S. Characterization of a homolog of DEAD-box RNA helicases in Toxoplasma gondii as a marker of cytoplasmic mRNP stress granules. **Gene**, v. 543, n. 1, p. 34-44, 2014.

CRUZ, L. N.; WU, Y.; CRAIG, A. G.; GARCIA, C. R. Signal transduction in Plasmodium-Red Blood Cells interactions and in cytoadherence. **An Acad. Bras. Cienc.**, v. 84, n. 2, p. 555-572, 2012.

DA SILVA AUGUSTO, L.; MORETTI, N. S.; RAMOS, T. C.; DE JESUS, T. C.; ZHANG, M.; CASTILHO, B. A.; SCHENKMAN, S. A membrane-bound eIF2 alpha kinase located in endosomes is regulated by heme and controls differentiation and ROS levels in Trypanosoma cruzi. **PLoS Pathog.**, v. 11, n. 2, p. e1004618, 2015.

DASTIDAR, E. G.; DAYER, G.; HOLLAND, Z. M.; DORIN-SEMBLAT, D.; CLAES, A.; CHENE, A.; SHARMA, A.; HAMELIN, R.; MONIATTE, M.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; SCHERF, A.; DOERIG, C. Involvement of Plasmodium falciparum protein kinase CK2 in the chromatin assembly pathway. **BMC Biol.**, v. 10, p. 5, 2012.

DE HARO, C.; MENDEZ, R.; SANTOYO, J. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. **FASEB J.**, v. 10, n. 12, p. 1378-1387, 1996.

DE LA CRUZ-HERRERA, C. F.; CAMPAGNA, M.; GARCIA, M. A.; MARCOS-VILLAR, L.; LANG, V.; BAZ-MARTINEZ, M.; GUTIERREZ, S.; VIDAL, A.; RODRIGUEZ, M. S.; ESTEBAN, M.; RIVAS, C. Activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by small ubiquitin-like modifier (SUMO). **J Biol. Chem.**, v. 289, n. 38, p. 26357-26367, 2014.

DE MENDOZA, A.; SEBE-PEDROS, A.; RUIZ-TRILLO, I. The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: modularity, conservation, and the transition to metazoan multicellularity. **Genome Biol. Evol.**, v. 6, n. 3, p. 606-619, 2014.

DEVER, T. E.; FENG, L.; WEK, R. C.; CIGAN, A. M.; DONAHUE, T. F.; HINNEBUSCH, A. G. Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. **Cell**, v. 68, n. 3, p. 585-596, 1992.

DIAZ, C. A.; ALLOCCO, J.; POWLES, M. A.; YEUNG, L.; DONALD, R. G.; ANDERSON, J. W.; LIBERATOR, P. A. Characterization of Plasmodium falciparum cGMP-dependent protein kinase (PfPKG): antiparasitic activity of a PKG inhibitor. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 146, n. 1, p. 78-88, 2006.

DOCHERTY, J. C.; SCHACTER, B. A.; FIRNEISZ, G. D.; BROWN, S. B. Mechanism of action of heme oxygenase. A study of heme degradation to bile pigment by ¹⁸O labeling. **J Biol. Chem.**, v. 259, n. 21, p. 13066-13069, 1984.

DOERIG, C.; BAKER, D.; BILLKER, O.; BLACKMAN, M. J.; CHITNIS, C.; DHAR KUMAR, S.; HEUSSLER, V.; HOLDER, A. A.; KOCKEN, C.; KRISHNA, S.; LANGSLEY, G.; LASONDER, E.; MENARD, R.; MEISSNER, M.; PRADEL, G.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.; SHARMA, A.; SHARMA, P.; TARDIEUX, T.; TATU, U.; ALANO, P. Signalling in malaria parasites. The MALSIG consortium. **Parasite**, v. 16, n. 3, p. 169-182, 2009.

DOERIG, C.; BILLKER, O.; HAYSTEAD, T.; SHARMA, P.; TOBIN, A. B.; WATERS, N. C. Protein kinases of malaria parasites: an update. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 12, p. 570-577, 2008.

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.**, v. 70, n. 1-2, p. 167-174, 1995.

DOERIG, C.; ENDICOTT, J.; CHAKRABARTI, D. Cyclin-dependent kinase homologues of *Plasmodium falciparum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, n. 13, p. 1575-1585, 2002.

DOERIG, C.; RAYNER, J. C.; SCHERF, A.; TOBIN, A. B. Post-translational protein modifications in malaria parasites. **Nat. Ver. Microbiol.**, v. 13, n. 3, p. 160-172, 2015.

DONDORP, A. M.; FAIRHURST, R. M.; SLUTSKER, L.; MACARTHUR, J. R.; BREMAN, J. G.; GUERIN, P. J.; WELLEMS, T. E.; RINGWALD, P.; NEWMAN, R. D.; PLOWE, C. V. The threat of artemisinin-resistant malaria. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, n. 12, p. 1073-1075, 2011.

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.**, v. 65, n. 5, p. 1170-1180, 2007.

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**, v. 7, n. 2, p. 279-285, 2008.

DORIN, D.; LE ROCH, K.; SALLICANDRO, P.; ALANO, P.; PARZY, D.; POULLET, 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.**, v. 268, n. 9, p. 2600-2608, 2001.

DORSAM, R. T.; GUTKIND, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nat. Ver. Cancer**, v. 7, n. 2, p. 79-94, 2007.

EGAN, T. J.; COMBRINCK, J. M.; EGAN, J.; HEARNE, G. R.; MARQUES, H. M.; NTENTENI, S.; SEWELL, B. T.; SMITH, P. J.; TAYLOR, D.; VAN SCHALKWYK, D. A.; WALDEN, J. C. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Biochem. J.**, v. 365, n. Pt 2, p. 343-347, 2002.

FENNELL, C.; BABBITT, S.; RUSSO, I.; WILKES, J.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.; GOLDBERG, D. E.; DOERIG, C. PfeIK1, a eukaryotic initiation factor 2 α kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, regulates stress-response to amino-acid starvation. **Malar. J.**, v. 8, p. 99, 2009.

FRANCIS, S. E.; SULLIVAN, D. J., JR.; GOLDBERG, D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Annu. Ver. Microbiol.**, v. 51, p. 97-123, 1997.

GAMBRELL, W. E. "Variations in Gametocyte Production in Avian Malaria." **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 1-17, n. 5, p. 689-727, 1937.

GARCIA, C. R. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. **Parasitol. Today**, v. 15, n. 12, p. 488-491, 1999.

GARCIA, C. R.; DLUZEWSKI, A. R.; CATALANI, L. H.; BURTING, R.; HOYLAND, J.; MASON, W. T. Calcium homeostasis in intraerythrocytic malaria parasites. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 71, n. 4, p. 409-413, 1996.

GARCIA, C. R.; MARKUS, R. P.; MADEIRA, L. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. **J. Biol. Rhythms**, v. 16, n. 5, p. 436-443, 2001.

GAZARINI, M. L.; THOMAS, A. P.; POZZAN, T.; GARCIA, C. R. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. **J. Cell Biol.**, v. 161, n. 1, p. 103-110, 2003.

GETHER, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. **Endocr. Rev.**, v. 21, n. 1, p. 90-113, 2000.

GEYER, J. A.; KEENAN, S. M.; WOODARD, C. L.; THOMPSON, P. A.; GERENA, L.; NICHOLS, D. A.; GUTTERIDGE, C. E.; WATERS, N. C. Selective inhibition of Pfmrk, a Plasmodium falciparum CDK, by antimalarial 1,3-diaryl-2-propenones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 19, n. 7, p. 1982-1985, 2009.

GOH, K. C.; DEVEER, M. J.; WILLIAMS, B. R. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. **EMBO J.**, v. 19, n. 16, p. 4292-4297, 2000.

GRACIOTTI, M.; ALAM, M.; SOLYAKOV, L.; SCHMID, R.; BURLEY, G.; BOTTRILL, A. R.; DOERIG, C.; CULLIS, P.; TOBIN, A. B. Malaria protein kinase CK2 (PfCK2) shows novel mechanisms of regulation. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e85391, 2014.

HALL, R. A.; PREMONT, R. T.; LEFKOWITZ, R. J. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. **J. Cell Biol.**, v. 145, n. 5, p. 927-932, 1999.

HAN, A. P.; YU, C.; LU, L.; FUJIWARA, Y.; BROWNE, C.; CHIN, G.; FLEMING, M.; LEBOULCH, P.; ORKIN, S. H.; CHEN, J. J. Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. **EMBO J.**, v. 20, n. 23, p. 6909-6918, 2001.

HARDING, H. P.; RON, D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. **Diabetes**, v. 51 Suppl 3, p. S455-461, 2002.

HARPER, J. F.; HARMON, A. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, n. 7, p. 555-566, 2005.

HASTE, N. M.; TALABANI, H.; DOO, A.; MERCKX, A.; LANGSLEY, G.; TAYLOR, S. S. Exploring the *Plasmodium falciparum* cyclic-adenosine monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase (PfPKA) as a therapeutic target. **Microbes Infect.**, v. 14, n. 10, p. 838-850, 2012.

HAWKINS, F.. "Circadian and other rhythms of parasites." **Adv. Parasitol.**13, p. 123- 182, 1975.

HENG, B. C.; AUBEL, D.; FUSSENEGGER, M. An overview of the diverse roles of G-protein coupled receptors (GPCRs) in the pathophysiology of various human diseases. **Biotechnol. Adv.**, v. 31, n. 8, p. 1676-1694, 2013.

HOLLAND, Z.; PRUDENT, R.; REISER, J. B.; COCHET, C.; DOERIG, C. Functional analysis of protein kinase CK2 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryot. Cell**, v. 8, n. 3, p. 388-397, 2009.

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**, v. 11, n. 11, p. 1329-1337, 2003.

HOTTA, C. T.; GAZARINI, M. L.; BERALDO, F. H.; VAROTTI, F. P.; LOPES, C.; MARKUS, R. P.; POZZAN, T.; GARCIA, C. R. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 7, p. 466-468, 2000.

ISHINO, T.; ORITO, Y.; CHINZEI, Y.; YUDA, M. A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. **Mol. Microbiol.**, v. 59, n. 4, p. 1175-1184, 2006.

JANNE, P. A.; GRAY, N.; SETTLEMAN, J. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. **Nat. Ver. Drug Discov.**, v. 8, n. 9, p. 709-723, 2009.

JOHNSON, J. G.; EPSTEIN, N.; SHIROISHI, T.; MILLER, L. H. Factors affecting the ability of isolated *Plasmodium knowlesi* merozoites to attach to and invade erythrocytes. **Parasitology**, v. 80, n. 3, p. 539-550, 1980.

KAPPES, B.; DOERIG, C. D.; GRAESER, R. An overview of *Plasmodium* protein kinases. **Parasitol. Today**, v. 15, n. 11, p. 449-454, 1999.

KATO, N.; SAKATA, T.; BRETON, G.; LE ROCH, K. G.; NAGLE, A.; ANDERSEN, C.; BURSULAYA, B.; HENSON, K.; JOHNSON, J.; KUMAR, K. A.; MARR, F.; MASON, D.; MCNAMARA, C.; PLOUFFE, D.; RAMACHANDRAN, V.; SPOONER, M.; TUNTLAND, T.; ZHOU, Y.; PETERS, E. C.; CHATTERJEE, A.; SCHULTZ, P. G.; WARD, G. E.; GRAY, N.; HARPER, J.; WINZELER, E. A. Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. **Nat Chem Biol.**, v. 4, n. 6, p. 347-356, 2008.

KHAN, S. M.; FRANKE-FAYARD, B.; MAIR, G. R.; LASONDER, E.; JANSE, C. J.; MANN, M.; WATERS, A. P. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific Plasmodium biology. **Cell**, v. 121, n. 5, p. 675-687, 2005.

KING, N.; HITTINGER, C. T.; CARROLL, S. B. Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 361-363, 2003.

KONRAD, C.; WEK, R. C.; SULLIVAN, W. J., JR. GCN2-like eIF2 α kinase manages the amino acid starvation response in *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**, v. 44, n. 2, p. 139-146, 2014.

KOYAMA, F. C.; CHAKRABARTI, D.; GARCIA, C. R. Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in Plasmodium. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 165, n. 1, p. 1-7, 2009.

KOYAMA, F. C.; RIBEIRO, R. Y.; GARCIA, J. L.; AZEVEDO, M. F.; CHAKRABARTI, D.; GARCIA, C. R. Ubiquitin proteasome system and the atypical kinase PfPK7 are involved in melatonin signaling in Plasmodium falciparum. **J. Pineal Res.**, v. 53, n. 2, p. 147-153, 2012.

KREBS, J.; AGELLON, L. B.; MICHALAK, M. Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 460, n. 1, p. 114-121, 2015.

KRISHNAMOORTHY, T.; PAVITT, G. D.; ZHANG, F.; DEVER, T. E.; HINNEBUSCH, A. G. Tight binding of the phosphorylated α subunit of initiation factor 2 (eIF2 α) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. **Mol. Cell Biol.**, v. 21, n. 15, p. 5018-5030, 2001.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol.**, v. 65, n. 3, p. 418-420, 1979.

LEFKOWITZ, R. J.; COTECCHIA, S.; SAMAMA, P.; COSTA, T. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 14, n. 8, p. 303-307, 1993.

LEVANO-GARCIA, J.; DLUZEWSKI, A. R.; MARKUS, R. P.; GARCIA, C. R. Purinergic signalling is involved in the malaria parasite Plasmodium falciparum invasion to red blood cells. **Purinergic Signal**, v. 6, n. 4, p. 365-372, 2010.

LEVOYE, A.; DAM, J.; AYOUB, M. A.; GUILLAUME, J. L.; JOCKERS, R. Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. **EMBO Rep.**, v. 7, n. 11, p. 1094-1098, 2006.

LI, J. L.; TARGETT, G. A.; BAKER, D. A. Primary structure and sexual stage-specific expression of a LAMMER protein kinase of Plasmodium falciparum. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 4, p. 387-392, 2001.

LI, Z.; LE ROCH, K.; GEYER, J. A.; WOODARD, C. L.; PRIGGE, S. T.; KOH, J.; DOERIG, C.; WATERS, N. C. Influence of human p16(INK4) and p21(CIP1) on the in vitro activity of recombinant Plasmodium falciparum cyclin-dependent protein kinases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 288, n. 5, p. 1207-1211, 2001.

LIM, D. C.; COOKE, B. M.; DOERIG, C.; SAEIJ, J. P. Toxoplasma and Plasmodium protein kinases: roles in invasion and host cell remodelling. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, n. 1, p. 21-32, 2012.

LIN, H. H., G-protein-Coupled Receptors and Their (Bio) Chemical Significance Win 2012 Nobel Prize in Chemistry. **Biomedical Journal**, v. 36, n.3, p. 118-124, 2013.

LOURIDO, S.; MORENO, S. N. The calcium signaling toolkit of the Apicomplexan parasites Toxoplasma gondii and Plasmodium spp. **Cell Calcium**, v. 57, n. 3, p. 186-193, 2015.

LU, L.; HAN, A. P.; CHEN, J. J. Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. **Mol. Cell Biol.**, v. 21, n. 23, p. 7971-7980, 2001.

MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 25, n. 3-4, p. 177-195, 2004.

MADEIRA, L.; GALANTE, P. A.; BUDU, A.; AZEVEDO, M. F.; MALNIC, B.; GARCIA, C. R. Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. **PLoS One**, v. 3, n. 3, p. e1889, 2008.

MBENGUE, A.; BHATTACHARJEE, S.; PANDHARKAR, T.; LIU, H.; ESTIU, G.; STAHELIN, R. V.; RIZK, S. S.; NJIMOH, D. L.; RYAN, Y.; CHOTIVANICH, K.; NGUON, C.; GHORBAL, M.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; PFRENDER, M.; EMRICH, S.; MOHANDAS, N.; DONDORP, A. M.; WIEST, O.; HALDAR, K. A molecular mechanism of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 683-687, 2015.

MCROBERT, L.; TAYLOR, C. J.; DENG, W.; FIVELMAN, Q. L.; CUMMINGS, R. M.; POLLEY, S. D.; BILLKER, O.; BAKER, D. A. Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. **PLoS Biol.**, v. 6, n. 6, p. e139, 2008.

MILLER, L. H.; ACKERMAN, H. C.; SU, X. Z.; WELLEMS, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nat. Med.**, v. 19, n. 2, p. 156-167, 2013.

MOHRLE, J. J.; ZHAO, Y.; WERNLI, B.; FRANKLIN, R. M.; KAPPES, B. Molecular cloning, characterization and localization of PfPK4, an eIF-2alpha kinase-related enzyme from the malarial parasite Plasmodium falciparum. **Biochem. J.**, v. 328 (Pt 2), p. 677-687, 1997.

MOORE, L. R.; FUJIOKA, H.; WILLIAMS, P. S.; CHALMERS, J. J.; GRIMBERG, B.; ZIMMERMAN, P. A.; ZBOROWSKI, M. Hemoglobin degradation in malaria-infected

erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. **FASEB J.**, v. 20, n. 6, p. 747-749, 2006.

MOREIRA, I. S. Structural features of the G-protein/GPCR interactions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 1, p. 16-33, 2014.

MORLEY, S. J.; COLDWELL, M. J.; CLEMENS, M. J. Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. **Cell Death Differ.**, v. 12, n. 6, p. 571-584, 2005.

NELSON, David L., COX, Michael M., "Lehninger Principles of Biochemistry", 4^a edição, W. H. Freeman, 2005, ISBN 978-0716743392

OLLIARO, P. Drug resistance hampers our capacity to roll back malaria. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41 Suppl 4, p. S247-257, 2005.

PAINTER, H. J.; CAMPBELL, T. L.; LLINAS, M. The Apicomplexan AP2 family: integral factors regulating Plasmodium development. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 176, n. 1, p. 1-7, 2011.

PATOCKA, N.; SHARMA, N.; RASHID, M.; RIBEIRO, P. Serotonin signaling in *Schistosoma mansoni*: a serotonin-activated G protein-coupled receptor controls parasite movement. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 1, p. e1003878, 2014.

PAVITT, G. D.; RON, D. New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 4, n. 6, 2012.

PEASE, B. N.; HUTTLIN, E. L.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; TALEVICH, E.; HARMON, J.; DILLMAN, T.; KANNAN, N.; DOERIG, C.; CHAKRABARTI, R.; GYGI, S. P.; CHAKRABARTI, D. Global analysis of protein expression and phosphorylation of three stages of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development. **J. Proteome Res.**, v. 12, n. 9, p. 4028-4045, 2013.

PROUD, C. G. eIF2 and the control of cell physiology. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 16, n. 1, p. 3-12, 2005.

RACHED, F. B.; NDJEMBO-EZOUGOU, C.; CHANDRAN, S.; TALABANI, H.; YERA, H.; DANDAVATE, V.; BOURDONCLE, P.; MEISSNER, M.; TATU, U.; LANGSLEY, G. Construction of a *Plasmodium falciparum* Rab-interactome identifies CK1 and PKA as Rab-effector kinases in malaria parasites. **Biol. Cell**, v. 104, n. 1, p. 34-47, 2012.

RANGARAJAN, R.; BEI, A. K.; JETHWANEY, D.; MALDONADO, P.; DORIN, D.; SULTAN, A. A.; DOERIG, C. A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. **EMBO Rep.**, v. 6, n. 5, p. 464-469, 2005.

REININGER, L.; GARCIA, M.; TOMLINS, A.; MULLER, S.; DOERIG, C. The *Plasmodium falciparum*, Nima-related kinase Pfnek-4: a marker for asexual parasites committed to sexual differentiation. **Malar. J.**, v. 11, p. 250, 2012.

REININGER, L.; TEWARI, R.; FENNEL, 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.**, v. 284, n. 31, p. 20858-20868, 2009.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Prog. Brain Res.**, v. 181, p. 127-151, 2010.

RIBEIRO, R.Y. Papel das quinases PfPK7, 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.

SABBATANI, S.; FIORINO, S.; MANFREDI, R. The emerging of the fifth malaria parasite (Plasmodium knowlesi): a public health concern? **Braz. J. Infect Dis.**, v. 14, n. 3, p. 299-309, 2010.

SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. Structure and function of the protein kinase R. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 316, p. 253-292, 2007.

SATTLEGGGER, E.; HINNEBUSCH, A. G. Separate domains in GCN1 for binding protein kinase GCN2 and ribosomes are required for GCN2 activation in amino acid-starved cells. **EMBO J.**, v. 19, n. 23, p. 6622-6633, 2000.

SCHEUNER, D.; SONG, B.; MCEWEN, E.; LIU, C.; LAYBUTT, R.; GILLESPIE, P.; SAUNDERS, T.; BONNER-WEIR, S.; KAUFMAN, R. J. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. **Mol. Cell**, v. 7, n. 6, p. 1165-1176, 2001.

SCHMITT, T. H.; FREZZATTI, W. A., JR.; SCHREIER, S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 307, n. 1, p. 96-103, 1993.

SEGER, R.; KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. **FASEB J.**, v. 9, p. 726-735, 1995.

SHAH, K. S. "The Periodic Development of Sexual Forms of "Plasmodium Cathemerium" in the Peripheral Circulation of Canaries." **Am. J. Epidemiol.**, 19 (2): p. 392- 403, 1934.

SIDRAUSKI, C.; ACOSTA-ALVEAR, D.; KHOUTORSKY, A.; VEDANTHAM, P.; HEARN, B. R.; LI, H.; GAMACHE, K.; GALLAGHER, C. M.; ANG, K. K.; WILSON, C.; OKREGLAK, V.; ASHKENAZI, A.; HANN, B.; NADER, K.; ARKIN, M. R.; RENSLO, A. R.; SONENBERG, N.; WALTER, P. Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory. **Elife**, v. 2, p. e00498, 2013.

SIDRAUSKI, C.; MCGEACHY, A. M.; INGOLIA, N. T.; WALTER, P. The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2alpha phosphorylation on translation and stress granule assembly. **Elife**, v. 4, 2015.

SIGALA, P. A.; CROWLEY, J. R.; HSIEH, S.; HENDERSON, J. P.; GOLDBERG, D. E. Direct tests of enzymatic heme degradation by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 45, p. 37793-37807, 2012.

SILVERA, D.; FORMENTI, S. C.; SCHNEIDER, R. J. Translational control in cancer. **Nat Ver. Cancer**, v. 10, n. 4, p. 254-266, 2010.

SINDEN, R. E.; BUTCHER, G. A.; BILLKER, O.; FLECK, S. L. Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. **Adv. Parasitol.**, v. 38, p. 53-117, 1996.

SINGH, S.; MORE, K. R.; CHITNIS, C. E. Role of calcineurin and actin dynamics in regulated secretion of microneme proteins in *Plasmodium falciparum* merozoites during erythrocyte invasion. **Cell Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 50-63, 2014.

SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y.; HAY, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 214-217, 2005.

SOLYAKOV, L.; HALBERT, J.; ALAM, M. M.; SEMBLAT, J. P.; DORIN-SEMBLAT, D.; REININGER, L.; BOTTRILL, A. R.; MISTRY, S.; ABDI, A.; FENNELL, C.; HOLLAND, Z.; DEMARTA, C.; BOUZA, Y.; SICARD, A.; NIVEZ, M. P.; ESCHENLAUER, S.; LAMA, T.; THOMAS, D. C.; SHARMA, P.; AGARWAL, S.; KERN, S.; PRADEL, G.; GRACIOTTI, M.; TOBIN, A. B.; DOERIG, C. Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nat. Commun.**, v. 2, p. 565, 2011.

SULLIVAN, W. J., JR.; NARASIMHAN, J.; BHATTI, M. M.; WEK, R. C. Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. **Biochem. J.**, v. 380, n. Pt 2, p. 523-531, 2004.

SUROLIA, N.; PADMANABAN, G. Chloroquine inhibits heme-dependent protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 88, n. 11, p. 4786-4790, 1991.

SYIN, C.; PARZY, D.; TRAINCARD, F.; BOCCACCIO, I.; JOSHI, M. B.; LIN, D. T.; YANG, X. M.; ASSEMAT, K.; DOERIG, C.; LANGSLEY, G. The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 18, p. 4842-4849, 2001.

TALEVICH, E.; MIRZA, A.; KANNAN, N. Structural and evolutionary divergence of eukaryotic protein kinases in Apicomplexa. **BMC Evol. Biol.**, v. 11, p. 321, 2011.

TALEVICH, E.; TOBIN, A. B.; KANNAN, N.; DOERIG, C. An evolutionary perspective on the kinome of malaria parasites. **Philos Trans R Soc Lond B Biol. Sci.**, v. 367, n. 1602, p. 2607-2618, 2012.

TALLOCZY, Z.; JIANG, W.; VIRGIN, H. W. T.; LEIB, D. A.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J.; ESKELINEN, E. L.; LEVINE, B. Regulation of starvation- and virus-

induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, n. 1, p. 190-195, 2002.

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.**, v. 58, n. 5, p. 1253-1263, 2005.

TEWARI, R.; STRASCHIL, U.; BATEMAN, A.; BOHME, U.; CHEREVACH, I.; GONG, P.; PAIN, A.; BILLKER, O. The systematic functional analysis of Plasmodium protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 4, p. 377-387, 2010.

THOMAS, D. C.; AHMED, A.; GILBERGER, T. W.; SHARMA, P. Regulation of Plasmodium falciparum glideosome associated protein 45 (PfGAP45) phosphorylation. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35855, 2012.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

TREECK, M.; SANDERS, J. L.; ELIAS, J. E.; BOOTHROYD, J. C. The phosphoproteomes of Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 4, p. 410-419, 2011.

TRELA, E.; GLOWACKI, S.; BLASIAK, J. Therapy of chronic myeloid leukemia: twilight of the imatinib era? **ISRN Oncol.**, v. 2014, p. 596483, 2014.

TRZASKOWSKI, B.; LATEK, D.; YUAN, S.; GHOSHDASTIDER, U.; DEBINSKI, A.; FILIPEK, S. Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, n. 8, p. 1090-1109, 2012.

UETANI, K.; DER, S. D.; ZAMANIAN-DARYOUSH, M.; DE LA MOTTE, C.; LIEBERMAN, B. Y.; WILLIAMS, B. R.; ERZURUM, S. C. Central role of double-stranded RNA-activated protein kinase in microbial induction of nitric oxide synthase. **J. Immunol.**, v. 165, n. 2, p. 988-996, 2000.

VAID, A.; RANJAN, R.; SMYTHE, W. A.; HOPPE, H. C.; SHARMA, P. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from Plasmodium falciparum, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. **Blood**, v. 115, n. 12, p. 2500-2507, 2010.

VAID, A.; THOMAS, D. C.; SHARMA, P. Role of Ca²⁺/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. **J Biol. Chem.**, v. 283, n. 9, p. 5589-5597, 2008.

VAN DOOREN, G. G.; KENNEDY, A. T.; MCFADDEN, G. I. The use and abuse of heme in apicomplexan parasites. **Antioxid. Redox Signal**, v. 17, n. 4, p. 634-656, 2012.

VAROTTI, F. P.; BERALDO, F. H.; GAZARINI, M. L.; GARCIA, C. R. Plasmodium falciparum malaria parasites display a THG-sensitive Ca^{2+} pool. **Cell Calcium**, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2003.

VENKATAKRISHNAN, A. J.; DEUPI, X.; LEBON, G.; TATE, C. G.; SCHERTLER, G. F.; BABU, M. M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 185-194, 2013.

WANG, J. Z.; WANG, Z. F. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. **Acta. Pharmacol. Sin.**, v. 27, n. 1, p. 41-49, 2006.

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**, v. 5, p. 79, 2004.

WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of Toxoplasma gondii. **Front. Biosci.**, v. 5, p. D391-405, 2000.

WEK, R. C.; JIANG, H. Y.; ANTHONY, T. G. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, n. Pt 1, p. 7-11, 2006.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-Resistant Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 770-776, 2001.

ZHANG, M.; FENNELL, C.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.; SAKTHIVEL, R.; GUEIRARD, P.; MEISTER, S.; CASPI, A.; DOERIG, C.; NUSSENZWEIG, R. S.; TUTEJA, R.; SULLIVAN, W. J., JR.; ROOS, D. S.; FONTOURA, B. M.; MENARD, R.; WINZELER, E. A.; NUSSENZWEIG, V. The Plasmodium eukaryotic initiation factor-2 α kinase IK2 controls the latency of sporozoites in the mosquito salivary glands. **J. Exp. Med.**, v. 207, n. 7, p. 1465-1474, 2010.

ZHANG, M.; JOYCE, B. R.; SULLIVAN, W. J., JR.; NUSSENZWEIG, V. Translational control in Plasmodium and toxoplasma parasites. **Eukaryot. Cell**, v. 12, n. 2, p. 161-167, 2013.

ZHANG, M.; MISHRA, S.; SAKTHIVEL, R.; ROJAS, M.; RANJAN, R.; SULLIVAN, W. J., JR.; FONTOURA, B. M.; MENARD, R.; DEVER, T. E.; NUSSENZWEIG, V. PK4, a eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) kinase, is essential for the development of the erythrocytic cycle of Plasmodium. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 109, n. 10, p. 3956-3961, 2012.

ZHANG, P.; MCGRATH, B. C.; REINERT, J.; OLSEN, D. S.; LEI, L.; GILL, S.; WEK, S. A.; VATTEM, K. M.; WEK, R. C.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S.; CAVENER, D. R. The GCN2 eIF2 α kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. **Mol. Cell Biol.**, v. 22, n. 19, p. 6681-6688, 2002.

ZHAO, Y.; KAPPES, B.; YANG, J.; FRANKLIN, R. M. Molecular cloning, stage-specific expression and cellular distribution of a putative protein kinase from *Plasmodium falciparum*. **Eur. J. Biochem.**, v. 207, n. 1, p. 305-313, 1992.