ALEXANDRE BUDU

***Screening* de ligantes para candidatos a
receptores de sete domínios
transmembrânicos no parasita
*Plasmodium falciparum***

Tese 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 Doutor em Ciências

São Paulo
2012

ALEXANDRE BUDU

***Screening* de ligantes para candidatos a
receptores de sete domínios
transmembrânicos no parasita
*Plasmodium falciparum***

Tese 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 Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia

Versão original

São Paulo
2012

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

Budu, Alexandre.

Screening de ligantes para candidatos a receptores de sete domínios transmembrânicos no parasita *Plasmodium falciparum* / Alexandre Budu. -- São Paulo, 2012.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia Celular e Molecular do *Plasmodium*.

Versão do título para o inglês: Screening of ligands for seven transmembrane domain receptor candidates in the parasite *Plasmodium falciparum*.

1. *Plasmodium falciparum* 2. Receptores de superfície celular 3. Transdução de sinal celular 4. Cálcio 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/SBIB0152/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alexandre Budu.

Título da Tese: *Screening* de ligantes para candidatos a receptores de sete domínios transmembrânicos no *parasita Plasmodium falciparum*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEP SH. 029.11

PMAZ/mcgn

São Paulo, 29 de março de 2011.

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 113ª reunião realizada em 23.03.11, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Transdução de sinal em Plasmodium: screening de ligantes para candidatos a receptores de sete domínios transmembrânicos no parasita*".

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

Atenciosamente,

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

Ilmo Sr.
ALEXANDRE BUDU
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

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) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **027** nas fls. **44** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Célia Regina da Silva Garcia** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Transdução de sinal em plasmodium: screening de ligantes para candidatos a receptores de sete domínios transmembrânicos no parasita**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Alexandre Budu**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **27.03.2007**.

São Paulo, 28 de março de 2007.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice - Coordenador da
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da
CEEa - ICB/USP

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Célia Regina da Silva Garcia por ter me oferecido a chance de fazer ciência em seu laboratório, pelo incentivo e ajuda nas horas difíceis, pela determinação, orientação e discussões durante os anos de iniciação científica e doutorado. Sua influência me fez crescer muito pessoalmente e cientificamente.

À Dra. Míriam Santos de Moraes, pela colaboração nos experimentos (incontáveis finais de semana em que nos revezávamos para transfectar células). Também pelas discussões e pela amizade durante todos esses anos.

Aos colegas de laboratório com os quais tive o privilégio de conviver durante boa parte desses anos. Provavelmente os melhores colegas que alguém pode ter: Bruno Cunha, Ms. Desiree Schuck, Eduardo Alves, Fernanda Koyama, Lucas Borges, Dra. Laura Cruz, Dra. Myna Nakabashi, Dr. Julio Garcia, Dr. Dario Passos, Dra. Wania Lima, Henrique Borges, Ms. Ramira Yuri, Ms. Rafael Peres, Dr. Abhinay Sharma, Dra Pratibha Gaur, Dra Chiara Currá, Bruna Koresch, Ms. Paloma Sato, Dr. Mauro Azevedo.

Aos ex-colegas de laboratório que me auxiliaram em meus primeiros passos em ciência e tiveram uma paciência infinita comigo: Dr. Flavio Beraldo, Prof. Dr. Marcos Gazarini, Dr. Piero Bagnaresi, Dra. Luciana Madeira.

Ao professor Tullio Pozzan e integrantes do Pozzan lab, que me receberam e trataram muito bem durante o meu estágio no exterior.

A todas as pessoas que participaram na minha formação acadêmica e ajudaram no desenvolvimento dessa tese com sugestões, críticas e reagentes.

À FAPESP, pelas bolsas de iniciação científica e doutorado direto concedidas e pelo profissionalismo e eficiência demonstrados. Ao CNPq por apoiar a pesquisa no laboratório.

Às secretárias Vilma e Silvia do Departamento de Parasitologia pela ajuda na resolução de problemas burocráticos.

Ao Hospital do Servidor Público pelo sangue e plasma cedidos para a cultura de *Plasmodium falciparum*.

À Tais Octaviani por ter me aguentado no difícil período de finalização da tese.

Aos meus pais, Nicolae e Despina, pela participação ativa que tiveram na minha educação, pela compreensão e ajuda nas horas difíceis. Aos meus irmãos, Cristian e Elena, pelo companheirismo. A todos os meus amigos pelo apoio.

“...biologists [had been] in the same situation as astronomers and astrophysicists who were permitted to see the objects of their interest but not to touch them; the cell was as distant from us as the stars and galaxies were for them. More dramatic and frustrating was that we knew that the instrument at our disposal, the microscope...had...reached, irremediably, the theoretical limits of its resolving power.”

Albert Claude

“When I threw the extract into the sink, the inside of the sink lit up with a bright blue flash.”

Osamu Shimomura

“For a scientist, it is a unique experience to live through a period in which his field of endeavour comes to bloom - to be witness to those rare moments when the dawn of understanding finally descends upon what appeared to be confusion only a while ago - to listen to the sound of darkness crumbling.”

George Palade

“...the writer is delegated to declare and to celebrate man's proven capacity for greatness of heart and spirit—for gallantry in defeat, for courage, compassion and love. In the endless war against weakness and despair, these are the bright rally flags of hope and of emulation.”

John Steinbeck

RESUMO

Budu A. *Screening* de ligantes para candidatos a receptores de sete domínios transmembrânicos no parasita *Plasmodium falciparum*. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

O parasita da malária *Plasmodium falciparum* percebe o ambiente em que se encontra, elaborando respostas celulares adequadas, que envolvem secreção de proteínas, crescimento e diferenciação celular. Fatores relacionados com a geração de segundos-mensageiros e proteínas efetoras da sinalização celular estão descritos na literatura. Porém, a função de receptores responsáveis pela percepção de estímulos extracelulares no parasita é um tema pouco explorado. A identificação *in silico* de receptores de sete domínios transmembrânicos putativos no genoma de *P. falciparum* possibilitou a exploração da função dos mesmos. A tese caracteriza funcionalmente dois receptores, PFSR10 e PFSR25. A expressão proteica dos receptores foi demonstrada em fases eritrocíticas de *P. falciparum*. Os receptores possuem candidatos a parceiros moleculares que executam diversas funções celulares, entre elas invasão do eritrócito, endocitose e exocitose. Os receptores foram transfectados em células de mamíferos e, através de ensaios de dinâmica de cálcio de *high-throughput*, sugere-se que PFSR10 codifique um receptor que participa na percepção de ATP extracelular e que PFSR25 codifique um sensor de KCl. O trabalho também sugere que KCl modula cálcio citosólico em *P. falciparum* e que parasitas nocaute para PFSR25 são incapazes de modular cálcio citosólico em resposta a KCl.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*. Receptores de superfície celular. Transdução de sinal celular. Cálcio.

ABSTRACT

Budu A. Screening of ligands for seven transmembrane domain receptor candidates in the parasite *Plasmodium falciparum*. [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

The malaria parasite *P. falciparum* perceives its milieu and elaborates adequate intracellular responses, that involve protein secretion, growth and cell differentiation. Factors related to second messengers generation and effectors of cell signaling are described in the literature. However, the function of receptors responsible for stimulus perception remains elusive. The *in silico* identification of putative seven transmembrane receptors in the *Plasmodium falciparum* genome allowed the exploration of their function. In the thesis, two putative receptors were characterized, PFSR10 and PFSR25. The proteic expression of the receptors was demonstrated in erythrocytic stages of *P. falciparum*. The receptors have putative interaction partners that participate in cellular functions such as invasion, exocytosis and endocytosis. The receptors were transfected in mammalian cells and, through high-throughput calcium dynamics assays, it is suggested that PFSR10 codes for a receptor that participates in extracellular ATP perception and that PFSR25 codes for a KCl sensor. It is also suggested that KCl modulates cytosolic calcium in response to KCl and that knockout parasites for PFSR25 are incapable of modulating cytosolic calcium in response to KCl.

Keywords: *Plasmodium falciparum*. Cell-surface receptors. Cell signal transduction. Calcium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$[Ca^{2+}]_{cit}$ – cálcio citosólico

7-TMR – receptor de sete domínios transmembrânicos

8-Bz-cAMP – 8-benzil-adenosina monofosfato cíclica

A - anel

AAA – *ATPases associated with diverse cellular activities*

AA-NAT – araquilamina N-acetiltransferase

AC – adenilato ciclase

AC α – adenilato ciclase alfa

ADP – adenosina difosfato

AFMK – N-acetil-n-formil-metoxiquinuramina

AMA-1 – *apical membrane antigen 1*

AMP – adenosina monofosfato

AMP cíclico – adenosina monofosfato cíclico

ANOVA- *analysis of variance*

A-T – adenina-timina

ATP – adenosina trifosfato

VA – vacuolo ácido

BAPTA - 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid

BCA – *bicinchronic acid*

BFA – brefeldina A

CAM - calmodulina

cAMP – adenosina monofosfato cíclica

cATP – canal de ATP

ECC – entrada capacitativa de cálcio

cDNA – *complementary DNA*

CDPK – *calcium dependent protein kinase*

ClpB – *caseinolytic peptidase B*

CPA – *cyclopiazonic acid*, ácido ciclopiazônico

CTP – citidina trifosfato

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle medium*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

EBA175 – *erythrocyte binding antigen 175*

ECL - *electrochemiluminescence*

EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid*

EGTA - *ethylene glycol tetraacetic acid*

EHD2 – *EH- domain containing 2*

EI – estoque intracelular

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

ME – membrana do eritrócito

RE – retículo endoplasmático

Erid – eritrócito deformado

Erit - eritrócito

ERK – *extracellular signal regulated kinase*

Esq - esquizonte

F - feminino

FACS – *fluorescence-activated cell sorting*

FRET – *fluorescence resonance energy transfer*

GFP – *green fluorescent protein*

GPI - *glycophosphatidylinositol*

HBSS – *Hank's buffered salt solution*

HEK293T – *human embryonic kidney 293T*

HEK293T-PFSR10 - células HEK293T transfectadas
com plasmídeo pcDNA3.1(-)-PFSR10

HEK293T-PFSR10+G α_{15} - células HEK293T cotransfectadas com plasmídeo
pcDNA3.1(-)-PFSR10 e plasmídeo pcDNA3.1(-)-G α_{15}

HEK293T-PFSR25 - células HEK293T transfectadas
com plasmídeo pcDNA3.1(-)-PFSR25

HEK293T-vazio - células HEK293T transfectadas
com plasmídeo pcDNA3.1(-)

HEK293T-vazio+G α_{15} - células HEK293T cotransfectadas

com plasmídeo pcDNA3.1(-) e

plasmídeo pcDNA3.1(-)-G α_{15}

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

HepG2 – *liver hepatocellular carcinoma cells*

HRP – *horseradish peroxidase*

hsp – *heat shock protein*

iEri – Eritrócito infectado

IgG – Imunoglobulina G

IP - imunoprecipitação

IP₃ – inositol trifosfato

IP₃R – receptor de inositol trifosfato

M - masculino

MAPK – *mitogen activated protein kinase*

Mel - melatonina

Mer - merozoíto

Mit - mitocôndria

msp1 – *merozoite surface protein 1*

MT2 – receptor de melatonina 2

m/v – massa/volume

MVP – membrana do vacúolo parasitóforo

ORF – *open reading frame*

Par - parasita

PBS – *phosphate buffered saline*

PCR – *polymerase chain reaction*

FDE - fosfodiesterase

pfsr 10 – *Plasmodium falciparum serpentine receptor 10*, proteína

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

PFSR1 - *Plasmodium falciparum serpentine receptor 1*, ORF

PFSR10 - *Plasmodium falciparum serpentine receptor 10*, ORF

PFSR12 - *Plasmodium falciparum serpentine receptor 12*, ORF

PFSR25 - *Plasmodium falciparum* serpentine receptor 25, ORF

Pi – inorganic phosphate

PKA – protein kinase A

PKI – protein kinase A inhibitor

PLC – phospholipase C

PLC β - phospholipase C beta

MP – membrana plasmática

PMCA – plasma membrane calcium ATPase

PMSF - phenylmethanesulfonylfluoride

Proteína G – proteína ligante de nucleotídeos de guanina

PVDF - polyvinylidene difluoride

PVM – parasitophorous vacuole membrane

Rab - *Ras gene from rat brain*

RESA – ring-infected erythrocyte surface antigen

RON –rhoptry neck

RNA – ribonucleic acid

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SDS – sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Sec31p – secretory protein 31

Sec63p - secretory protein 63

SERCA – sarcoplasmic reticulum calcium ATPase

SNARE - soluble NSF attachment receptor

SRP – signal recognition particle

TBST – tris buffered saline + tween

TEA - tetraetilamônio

THG - thapsigargin

TRAP – thrombospondin-related adhesive protein

T- trofozoíto

t-SNARE – target SNARE

U73122 - 1-(6-((17 β -3-methoxyestr-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)-hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione

U73343 - *1-[6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-2,5-pyrrolidinedione*

UD – derivados de uracila

UDP – uridina difosfato

UMP – uridina monofosfato

UTP – uridina trifosfato

UV - ultravioleta

VCP – *valosin containing protein*

v-SNARE – *vesicle* SNARE

v/v – volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> . M: masculino, F: feminino.	27
Figura 2 - Homeostasia de cálcio e via de sinalização de melatonina em <i>Plasmodium</i>	31
Figura 3 - Secreção apical de proteínas em esporozoítos de <i>Plasmodium</i> após <i>traversing</i>	33
Figura 4 - A diminuição de potássio extracelular gera a secreção apical de micronemas no merozoíto da fase sanguínea.....	35
Figura 5 - ATP gera aumento de cálcio em fases intraeritrocíticas do parasita	37
Figura 6 - Exportação e Sinalização de 7-TMR.....	42
Figura 7 - Detecção de pfsr10 em <i>P. falciparum</i> através de <i>western blot</i>	60
Figura 8 - Localização subcelular de pfsr10 em fases jovens de <i>P. falciparum</i>	61
Figura 9 - Localização subcelular de pfsr10 em fases maduras de <i>P. falciparum</i>	62
Figura 10 - Controle de especificidade do anticorpo anti-pfsr10 nos ensaios de imunofluorescência.....	63
Figura 11 - Efeito da brefeldina A na localização subcelular de pfsr10..	64
Figura 12 - Distribuição de fases e parasitemia após invasão de hemácias por <i>P. falciparum</i> em presença de diversas concentrações de anticorpo anti-pfsr10..	65
Figura 13 - Proporção de células HEK293T com expressão de pfsr10 identificada.....	66
Figura 14 - Localização subcelular de pfsr10 em células HEK293T.....	67
Figura 15 - Detecção de pfsr10 em células HEK293T através de imunoprecipitação seguida de <i>western blot</i>	68
Figura 16 - Dinâmica de cálcio em células HEK293T transfectadas com PFSR10 e estimuladas com nucleotídeos.	71
Figura 17 - Crescimento de células HEK293T-PFSR10+G α_{15} ou HEK293T-vazio+G α_{15}	72
Figura 18 - Ensaios de cálcio utilizando aequorina em células 1321N1 transfectadas com PFSR10 e expressão e localização do receptor em células 1321N1.....	73
Figura 19 - Fosforilação de proteínas de células HEK293T-PFSR10+G α_{15} ou HEK293T-vazio+G α_{15}	75
Figura 20 - Alteração de fosforilação de proteínas após estímulo com ATP em células HEK293T-PFSR10+G α_{15} ou HEK293T-vazio+G α_{15}	76

Figura 21 - Fosforilação de proteínas de células HEK293T-PFSR10+Gα ₁₅ em relação ao controle transfectado com plasmídeo vazio e Gα ₁₅	77
Figura 22 - Análise da fosforilação de ERK1/2 em células HEK293T-PFSR10 e Gα ₁₅ ou HEK293T-vazio+Gα ₁₅	77
Figura 23 - Imunoprecipitação de proteínas em <i>P. falciparum</i> com anticorpo anti-pfsr10.	78
Figura 24 - Imunoprecipitação de proteínas de <i>P. falciparum</i> com anti-pfsr10 após estímulo com ATP.....	94
Figura 25 - Detecção de pfsr25 em <i>P. falciparum</i> através de <i>western blot</i>	96
Figura 26 - Detecção através de imunofluorescência da expressão de pfsr25 em fases do ciclo eritrocítico de <i>P. falciparum</i>	97
Figura 27 - Localização subcelular de pfsr25 em fase madura de <i>P. falciparum</i>	98
Figura 28 - Distribuição de fases e parasitemia após invasão de hemácias por <i>P. falciparum</i> em presença de diversas concentrações de anticorpo anti-pfsr25..	99
Figura 29 - Proporção de células HEK293T com expressão de pfsr25 identificada.....	100
Figura 30 - Localização subcelular de pfsr25 em células HEK293T.....	101
Figura 31 - Detecção de pfsr25 em células HEK293T através de imunoprecipitação seguida de <i>western blot</i>	102
Figura 32 - Dinâmica de cálcio em células HEK293T-PFSR25 estimuladas com KCl, NaCl e acetilcolina. rimentos independentes.....	105
Figura 33 - Crescimento de células HEK293T-PFSR25 ou HEK293T-vazio.	106
Figura 34 - Aumento de concentração citossólica de cálcio em trofozoítos maduros de <i>P. falciparum</i> em resposta a KCl.	107
Figura 35 - Efeito do KCl na progressão do ciclo de <i>P. falciparum</i>	108
Figura 36 - Imunoprecipitação de proteínas em <i>P. falciparum</i> com anticorpo anti-pfsr25.	110
Figura 37 - Hipóteses sobre a natureza molecular de pfsr10..	130
Figura 38 - Hipóteses para o mecanismo de ativação de pfsr25..	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Screening</i> de agonistas para pfsr10 em células HEK293T.....	69
Tabela 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10, sem peptídeos identificados no controle negativo.....	80
Tabela 3 - Proteínas enriquecidas mais de 3 vezes em relação ao controle negativo na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr10.....	87
Tabela 4 - Proteínas identificadas em imunoprecipitado com anticorpo anti-pfsr10 em <i>P. falciparum</i> .estimulado com ATP.....	95
Tabela 5 - <i>Screening</i> de agonistas para pfsr25 em células HEK293T.....	103
Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25.....	113
Tabela 7 - Proteínas enriquecidas mais que 3 vezes em relação ao controle na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr25.....	121

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Malária	25
1.2 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	26
1.3 Sinalização celular em <i>Plasmodium</i>	28
<i>1.3.1 Maquinaria de sinalização celular: cálcio</i>	28
<i>1.3.2 Compostos derivados do triptofano modulam o ciclo de vida de <i>P. falciparum</i></i>	29
<i>1.3.3 Alguns compostos presentes em altas concentrações intracelulares são sinalizadores em <i>Plasmodium</i></i>	32
<i>1.3.3.1 Esporozoítos</i>	32
<i>1.3.3.2 Merozoítos</i>	34
1.4 O Sistema de Sinalização Purinérgico é ubiquitário entre os seres vivos	37
<i>1.4.1 Subtipos de Receptores Purinérgicos</i>	38
1.5 Receptores de sete domínios transmembrânicos (7-TMR): sinalização, expressão, tráfego e classificação	39
<i>1.5.1 Identificação de 7-TMR no genoma de <i>P. falciparum</i></i>	43
2 OBJETIVOS	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 Cultivo de células de mamíferos	46
3.2 Cultivo e sincronização de fases intraeritrocíticas de <i>P. falciparum</i>	46
3.3 Clone de <i>P. falciparum</i> nocaute para pfsr25	46
3.4 Plasmídeos para expressar PFSR10 e PFSR25 em células de mamíferos	46
3.5 Anticorpo anti-pfsr10	47
3.6 Anticorpo anti-pfsr25	47
3.7 Anticorpo anti-msp1	47
3.8 Detecção da expressão de pfsr10, pfsr25 e msp-1 em <i>P. falciparum</i> através de imunofluorescência	47
3.9 Lise de hemácias para isolamento de parasitas <i>P. falciparum</i>	48
3.10 Detecção de pfsr10 e pfsr25 em estágios intraeritrocíticos de <i>P. falciparum</i> através de western blot	48

3.11 Co-imunoprecipitação de parceiros moleculares dos receptores putativos pfsr10 e pfsr25 em <i>P. falciparum</i>	49
3.12 Incubação de eritrócitos parasitados por esquizontes de <i>P. falciparum</i> com anticorpo anti-pfsr10 ou anti-pfsr25 e contagem de parasitemia	50
3.13 Ensaios de dinâmica de cálcio em <i>P. falciparum</i>	51
3.14 Contagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de parasitas <i>P. falciparum</i> incubados com KCl	52
3.15 Transfecção e ensaios de dinâmica de cálcio em células 1321N1	52
3.16 Transfecção de células HEK293T	53
3.17 Ensaios de dinâmica de cálcio em células HEK293T transfectadas com pcDNA3.1-PFSR10 ou pcDNA3.1-PFSR25	53
3.18 Crescimento de células HEK293T	54
3.19 Experimentos de fosforilação em células HEK 293T transfectadas com pcDNA3.1(-)-PFSR10 e pcDNA3.1(-)-Gα_{15}	54
3.20 Detecção da expressão de pfsr10 e pfsr25 em linhagens de células de mamíferos transfectadas através de imunofluorescência	56
3.21 Detecção da expressão de pfsr10 e pfsr25 em células HEK293T transfectadas através de imunoprecipitação seguida de <i>western blot</i>	57
4 RESULTADOS	59
4.1 Receptor Serpentino putativo PFSR10	59
<i>4.1.1 Expressão proteica e localização de pfsr10 em fases sanguíneas de Plasmodium falciparum: o receptor putativo é expresso em todas as fases do ciclo intraeritrocítico e transita pela via de exportação proteica</i>	59
<i>4.1.2 Anticorpo anti-pfsr10 não altera significativamente invasão e desenvolvimento intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i></i>	64
<i>4.1.3 Em sistema heterólogo, pfsr10 é identificada como proteína de aproximadamente 80 kDa e colocaliza parcialmente com a membrana plasmática</i>	65
<i>4.1.4 Screening de agonistas para pfsr10: alguns nucleotídeos promovem maior aumento de [Ca²⁺]_{cit} em células HEK293T-PFSR10+Gα_{15}</i>	68
<i>4.1.5 Transfecção de PFSR10 e Gα_{15} promove aumento de fosforilação em células HEK293T</i>	74
<i>4.1.6 Proteínas candidatas a interagir com pfsr10 desempenham diversas funções celulares</i> .	78
<i>4.1.6.1 Proteínas relacionadas a tradução, via exocítica e via endocítica</i>	91
<i>4.1.6.2 Proteína relacionada à ubiquitinação</i>	92

4.1.6.3 Proteínas relacionadas à invasão e estabelecimento na célula hospedeira	92
4.1.6.4 Chaperonas.....	93
4.1.6.5 Outras proteínas	93
4.1.7 Imunoprecipitação de parceiros moleculares de <i>pfsr10</i> após estímulo com ATP.....	94
4.2 Receptor serpentina putativo PFSR25	96
4.2.1 Expressão proteica e localização de <i>pfsr25</i> em fases sanguíneas de <i>Plasmodium falciparum</i> : o receptor putativo é mais expresso nas fases de trofozoítos e esquizonte do ciclo intraeritrocítico	96
4.2.2 Anticorpo anti- <i>pfsr25</i> não altera invasão de hemácias por <i>P. falciparum</i>	98
4.2.3 Em sistema heterólogo, <i>pfsr25</i> é identificada como proteína de aproximadamente 40 kDa e colocaliza parcialmente com a membrana plasmática	99
4.2.4 Screening de agonistas para o candidato a receptor serpentina <i>pfsr25</i> : KCl promove maior aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em células HEK293T-PFSR25	102
4.2.5 KCl provoca aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$, dependente de <i>pfsr25</i> , em trofozoítos maduros de <i>P. falciparum</i> e modula a ruptura de eritrócitos infectados por esses estágios	106
4.2.6. Proteínas candidatas a interagir com <i>pfsr25</i> desempenham diversas funções celulares	109
4.2.6.1 Proteínas relacionadas a tradução, via exocítica e via endocítica.....	110
4.2.6.2 Proteínas relacionadas à ubiquitinação	111
4.2.6.3 Proteínas relacionadas à saída de eritrócitos, invasão e estabelecimento na célula hospedeira	111
4.2.6.4 Chaperonas.....	111
4.2.6.5 Outras proteínas	112
5 DISCUSSÃO	125
5.1 Receptor serpentina putativo PFSR10	125
5.1.1 Expressão e localização de <i>pfsr10</i> em fases sanguíneas de <i>P. falciparum</i>	125
5.1.2 Anticorpo anti- <i>pfsr10</i> : invasão e desenvolvimento intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> ...	126
5.1.3 Expressão de <i>pfsr10</i> em sistema heterólogo	127
5.1.4 Ensaios de $[Ca^{2+}]_{cit}$ com nucleotídeos em células HEK293T-PFSR10+ $G\alpha_{15}$	128
5.1.5 Fosforilação em HEK293T-PFSR10+ $G\alpha_{15}$	130
5.1.6 Imunoprecipitação de candidatos a parceiros moleculares de <i>pfsr10</i> em <i>P. falciparum</i>	131
5.1.7 Imunoprecipitação de parceiros moleculares de <i>pfsr10</i> em <i>P. falciparum</i> após estímulo com ATP.....	134

5.2 Receptor serpentino putativo PFSR25	134
<i>5.2.1 Expressão de pfsr25 em P. falciparum</i>	<i>134</i>
<i>5.2.2 Anticorpo anti-pfsr25 e invasão de hemácias por P. falciparum</i>	<i>135</i>
<i>5.2.3 Expressão de pfsr25 em sistema heterólogo</i>	<i>135</i>
<i>5.2.4 Ensaio de cálcio em células HEK293T transfectadas com PFSR25 e estimuladas com KCl.....</i>	<i>136</i>
<i>5.2.5 Sinalização de KCl em parasitas intraeritrocíticos</i>	<i>138</i>
<i>5.2.6 Imunoprecipitação de candidatos a parceiros moleculares de pfsr25 em P. falciparum</i>	<i>139</i>
6 CONCLUSÕES.....	141
REFERÊNCIAS	142
ANEXO – Artigos publicados no período do doutorado	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária é uma doença que afeta a humanidade há milênios. Espécies do parasita da malária são mais antigas que o próprio ser humano, existindo há pelo menos 150 milhões de anos e infectando diversas espécies de vertebrados (revisado em Carter e Mendis 2002). O protozoário ancestral que deu origem ao parasita da malária provavelmente possuía cloroplasto, reprodução sexuada obrigatória e habitava o intestino de invertebrados aquáticos (revisado em Carter e Mendis, 2002). A aquisição da reprodução assexuada (esquizogonia) no interior de células representou um aumento no potencial proliferativo dos parasitas, que provavelmente passaram a infectar larvas de dípteros, e, adaptando-se ao hábito alimentar desses insetos, passaram a ter também um hospedeiro vertebrado. Em humanos, existem quatro espécies de *Plasmodium* que provocam malária: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. vivax*. É interessante que *P. falciparum*, o parasita responsável pelas formas mais graves da doença é evolutivamente mais próximo de *P. reichenowi*, um parasita de chimpanzés, e de parasitas de aves do que dos outros parasitas humanos. Isso indica que a separação do ancestral de *P. falciparum* e parasitas que infectam aves dos demais parasitas que infectam mamíferos foi um evento antigo (revisado em Carter e Mendis, 2002).

Atualmente, as espécies humanas de *Plasmodium* mais prevalentes no mundo são *P. falciparum* (que afeta em especial a África subsaariana) e *P. vivax* (que afeta Ásia, América Central e América do Sul), (revisado em Carter e Mendis, 2002).

Os números da doença divulgados pela Organização Mundial da Saúde encontram-se muito provavelmente subestimados, pois são obtidos a partir de relatórios passivos dos países afetados. Snow et al. (2005) estima que a doença afeta cerca de 500 milhões de pessoas no mundo. A mortalidade chega a 3 milhões de seres humanos anualmente, o maior número entre doenças parasitárias (Snow et al., 2005).

Durante a história e atualmente, a malária tem sido uma grande barreira para o desenvolvimento humano. A doença é capaz de dificultar ou impossibilitar grandes projetos econômicos (revisado em Carter e Mendis, 2002). Apesar de a área de ocorrência da malária ter sido confinada às regiões tropicais do globo após políticas de contenção, o número de pessoas que vivem em áreas de risco tem crescido e se encontra em torno de 3 bilhões, e há a expectativa de que continue crescendo (revisado em Guinovart et al., 2006). Há estudos

evidenciando a relação causal existente entre malária e pobreza (revisado em Worrall et al., 2005). A associação entre áreas pobres do globo e malária é um fato que não ajuda a aumentar o interesse na criação de fármacos para o combate à doença (Trouiller et al., 2002). Além disso, a procura de tratamento especializado em países pobres é pequena, observando-se mais a automedicação (revisado em Worrall et al., 2005). Um fator agravante é o surgimento de cepas de parasitas resistentes às drogas comumente usadas (revisado em Petersen et al., 2011). Apesar do aumento dos recursos para combate da malária para 1 bilhão de dólares em 2008 e do uso de várias estratégias (antimaláricos, mosquiteiros e inseticidas) faz-se necessário um monitoramento para verificar os progressos no controle da doença e onde os esforços devem ser focados (Grabowsky, 2008).

Uma vacina, que oferece 50% de proteção à infecção, se encontra em fase final de teste na África (Agnandji et al., 2011). Essa é a primeira vacina que oferece proteção em testes em campo, o que justifica otimismo para futuras formulações (Agnandji et al., 2011).

O melhor entendimento da biologia do parasita é um passo essencial para a identificação de alvos para o desenvolvimento de drogas e vacinas eficazes no combate à doença.

1.2 Ciclo de vida de *Plasmodium*

O parasita eucarioto unicelular causador da malária, do gênero *Plasmodium*, tem um ciclo de vida complexo (**Figura 1**). O mosquito infectado pica o hospedeiro injetando esporozoítos na derme através da saliva. Os esporozoítos, através da circulação sanguínea, invadem hepatócitos e sofrem divisões mitóticas, formando merozoítos, que entram na corrente sanguínea e invadem hemácias, formando a fase de anel. O anel se desenvolve em trofozoíto e este, em sua fase madura, começa a sofrer divisões mitóticas, dando origem ao esquizonte. Ao final da esquizogonia há o rompimento da hemácia, liberando merozoítos na corrente sanguínea. Esses reinvadem hemácias, repetindo o ciclo (revisado em Bannister e Mitchell, 2003). O ciclo eritrocítico é o responsável pelos sintomas clínicos da doença (febres recorrentes concomitantes com a liberação de merozoítos na corrente sanguínea). Alguns dos merozoítos que invadem hemácias sofrem diferenciação em gametócitos feminino ou masculino.

Figura 1 - Ciclo de vida de *Plasmodium*. M: masculino, F: feminino.

Fonte: Adaptado de Bannister e Mitchell (2003).

Os gametócitos, ingeridos pelo mosquito durante a picada, se diferenciam em gametas e ocorre a fertilização, dando origem a uma forma móvel, o oocineto. O oocineto instala-se no epitélio do intestino médio do *Anopheles* e sofre divisão reducional seguida de mitoses, dando origem a esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do inseto (revisado em Bannister e Mitchell, 2003).

Recentemente, aspectos interessantes do ciclo de vida do parasita foram reportados. Amino et al. (2006), utilizando esporozoítos expressando GFP e acompanhamento ao vivo e *in vivo* do parasita, demonstraram que além da invasão de vasos sanguíneos do hospedeiro intermediário, os esporozoítos também adentram vasos linfáticos e sofrem diferenciação parcial em nódulos, não alcançando, porém, a circulação sanguínea através do duto torácico. Esse aspecto poderia influir no reconhecimento do parasita pelo sistema imune. Sturm et al. (2006) demonstraram que o merozoíto hepático apresenta uma solução interessante para escapar às células de Kupffer que patrulham os sinusóides do fígado: a liberação na corrente sanguínea de vários merozoítos, envoltos por membrana proveniente do hepatócito (merossomo) que não expõe resíduos de fosfatidilserina, sinal para a fagocitose, na

membrana. Apesar da apoptose do hepatócito, evidenciada pela dispersão do citocromo c no citosol, pela condensação do núcleo celular e pela mudança da morfologia das mitocôndrias, os autores sugerem que a exposição de fosfatidilserina é evitada através da captação do cálcio liberado das organelas do hepatócito em apoptose pelos merozoítos. Caso um ionóforo de cálcio seja adicionado, ocorre exposição de fosfatidilserina na membrana do hepatócito (Sturm et al., 2006). Além dos exemplos acima, o parasita desenvolveu outras estratégias, dentre as quais se podem mencionar a criação de condições favoráveis para desenvolvimento no interior das hemácias (Desai et al., 1993; Gazarini et al., 2003) e indução da adesão da célula hospedeira a vasos sanguíneos (revisado em Rug et al., 2006). As diversas particularidades do ciclo de vida do parasita demonstram a sua versatilidade, com consequente bem-sucedido desenvolvimento em seus hospedeiros.

1.3 Sinalização celular em *Plasmodium*

Durante seu complexo ciclo de vida, o parasita passa por formas intra e extracelulares em hospedeiros filogeneticamente muito distantes (revisado em Bannister e Mitchell 2003). Dentro desse contexto, a percepção do ambiente e sinalização intracelular possuem um papel essencial no ciclo de vida do parasita, possibilitando a ativação de diversos processos, como formação de gametas masculinos (Billker et al., 2004) sincronização das fases intraeritrocíticas do parasita (Beraldo et al., 2005; Hotta et al., 2000), ativação da invasão de hepatócitos durante o processo de *traversing* (Kumar et al., 2007; Mota et al., 2001), exposição na membrana de proteínas envolvidas na invasão de hepatócitos (Ono et al., 2008) e na invasão de eritrócitos (Singh et al., 2010).

1.3.1 Maquinaria de sinalização celular: cálcio

O cálcio é um íon sinalizador ubiquitário capaz de agir em um amplo espectro temporal para modular processos que variam de exocitose (milissegundos) a proliferação celular (horas, revisado em Berridge, 2001; Berridge et al., 2003). Diversos estímulos extracelulares, agindo através de vários receptores e vias diferentes podem provocar aumento de cálcio intracelular (revisado em Berridge, 2001; Berridge et al., 2003). Por outro lado, a homeostasia do íon precisa acontecer para a sobrevivência da célula, pois altas concentrações citosólicas de cálcio mantidas por muito tempo provocam apoptose. A célula dispõe de vários mecanismos para lidar com o íon: bombas de cálcio localizadas na membrana plasmática

(PMCA), *uniporters* na mitocôndria, trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na membrana plasmática e SERCA (ATPase de cálcio do retículo endoplasmático) são necessários durante as reações de “desligamento” do sinal de cálcio; canais ligantes de inositol 1,4,5-trisfosfato no retículo endoplasmático e canais de cálcio na membrana plasmática funcionam durante as reações de aumento de cálcio intracelular (revisado em Berridge, 2001; Berridge et al., 2003).

A sinalização de cálcio em fases sanguíneas de *Plasmodium* é peculiar, pois o parasita é intracelular durante grande parte do tempo. O parasita intraeritrocítico enfrentaria um problema para utilizar o cálcio para a sinalização, pois se encontra separado do meio externo, que contém concentrações milimolar de cálcio, pela membrana do vacúolo parasitóforo e pelo citosol e membrana da hemácia. Através do aprisionamento de marcadores de cálcio ácidos, impermeáveis a membranas, Gazarini et al. (2003) demonstraram que o vacúolo parasitóforo, espaço existente entre a membrana do parasita e a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) é rico em cálcio. Para explicar o fenômeno, os autores sugerem que, durante a invasão, as bombas de cálcio da membrana plasmática do eritrócito invertem a sua orientação e passam a fazer parte da MVP e bombear cálcio para o vacúolo parasitóforo (Gazarini et al., 2003). A conclusão é de que o parasita intraeritrocítico possui acesso ao cálcio para eventos sinalizatórios (Gazarini et al., 2003).

Diversos grupos ajudaram a descrever os sinais extracelulares que regulam processos importantes no ciclo de vida de *P. falciparum*.

1.3.2 Compostos derivados do triptofano modulam o ciclo de vida de P. falciparum

A melatonina é uma molécula que provavelmente surgiu como uma solução para a célula detoxificar espécies reativas de oxigênio. Ela está presente em protistas, vegetais e animais. A função marcadora do ritmo circadiano seria uma característica derivada (revisado em Tan et al., 2007). Vários tecidos em vertebrados produzem melatonina a partir do aminoácido triptofano. Porém a melatonina que contribui para a sincronização dos processos fisiológicos do vertebrado ao ciclo claro/escuro é produzida por pinealócitos no período noturno e secretada na corrente sanguínea. A enzima com atividade regulada para a síntese de melatonina é a arilalquilamina N- acetiltransferase (AA-NAT) (revisado em Tan et al., 2007).

Hawking (1970) notou que o pico de febre provocado por *P. vivax* ocorria a cada 48 horas e correlacionaram o fenômeno com um aumento do número de merozoítos na corrente sanguínea, sugerindo que o desenvolvimento do parasita deveria ser sincrônico. A sincronicidade do parasita é perdida *in vitro* (Trager e Jensen, 1976) sugerindo que o sinal

para a sincronização está associado ao hospedeiro. Os experimentos de Boyd (1929) mostraram que ao submeter o parasita a um ciclo claro/escuro invertido, a esquizogonia ocorria ao meio-dia em vez de a meia-noite; Arnold et al. (1969) mostraram que ao se pinealectomizar o hospedeiro ocorria a dessincronização do parasita, evidenciando a clara associação do ciclo ao ritmo circadiano do hospedeiro (revisado em Garcia et al., 2001).

Hotta et al. (2000) demonstraram que a melatonina é capaz de sincronizar parasitas *P. chabaudi* *in vivo* e *in vitro* e aumentar a concentração de cálcio citosólico na presença ou ausência de cálcio extracelular. Utilizando um inibidor de fosfolipase C (PLC), Hotta et al., (2000) demonstraram que esse aumento era suprimido. A dessincronização dos parasitas em camundongos pinealectomizados pode ser revertida com a administração de melatonina (Hotta et al., 2000). Além disso, Bagnaresi et al. (2008) demonstraram que quando camundongos infectados com parasitas *P. chabaudi* são expostos a luzindol, um antagonista de receptores de melatonina e agente dessincronizador das fases intraeritrocíticas (Hotta et al., 2000) há um aumento da sobrevivência desses camundongos tratados com doses subótimas de cloroquina. Esses dados sugerem uma vantagem adaptativa da sincronicidade. Beraldo e Garcia CR (2005) demonstraram que derivados do triptofano (triptamina, N-acetilserotonina e serotonina) também eram capazes de promover sincronização *in vitro* de *P. falciparum* e aumento de cálcio citosólico. Budu et al. (2007) demonstraram que o AFMK, produto de degradação da melatonina, também tinha essas propriedades. Bagnaresi et al. (2009) demonstraram que a melatonina não é capaz de promover aumento de cálcio ou sincronizar parasitas *P. berghei*, que possuem uma infecção naturalmente dessincronizada em relação a *P. chabaudi*.

Beraldo et al. (2005) exploraram aspectos das vias de sinalização ativadas por melatonina no parasita e demonstraram que o agonista provoca um aumento de AMP cíclico, aumento que pode ser bloqueado pelo inibidor da PLC, U73122, e por um quelante intracelular de cálcio (BAPTA). Esses resultados demonstram um *cross-talk* entre as vias de AMP cíclico e cálcio no parasita. Em outros experimentos, os autores utilizaram parasitas marcados com o indicador citosólico de cálcio Fluo-3 e PKI, inibidor de PKA, proteína alvo do AMP cíclico. Quando estimulado com melatonina, o transiente de cálcio não foi inibido por PKI. Um análogo permeável de cAMP, 8-Bz-cAMP, foi capaz de provocar aumento de cálcio citosólico, aumento este que não foi inibido com U73122. Quando os autores adicionaram 8-Bz-cAMP após melatonina, não houve aumento de cálcio com o análogo de cAMP, demonstrando que os compostos mobilizam cálcio através de um mesmo mecanismo (Beraldo et al., 2005).

Figura 2 - Homeostasia de cálcio e via de sinalização de melatonina em *Plasmodium*.

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, Mit: mitocôndria, N: núcleo, VA: vacúolo ácido., AMPc: adenosina monofosfato cíclica. Fonte: Baseado nos dados de Alves et al. (2011), Beraldo et al. (2005), Beraldo et al. (2007), Farias et al. (2005), Garcia CR et al. (1998), Gazarini et al. (2003), Gazarini e Garcia (2004), Koyama et al. (2012), Varotti et al. (2003).

Existe, portanto, um complexo *cross talk* entre vias sinalizatórias em *Plasmodium* (**Figura 2**). Entre os efetores do cálcio em *Plasmodium* são cisteíno-proteases, conforme demonstrado por Farias et al. (2005).

Na fase de gametócito a maquinaria capaz de transduzir sinais de cálcio desempenha um papel importante na formação de gametas masculinos (Garcia GE et al., 1998). Billker et al. (2004), utilizando parasitas murinos *P. berghei* transfectados com aequorina-GFP (quimera gerada da fusão de um sensor luminescente de cálcio, a aequorina, e proteína fluorescente, gerando FRET) demonstraram que o ácido xanturênico, uma molécula derivada do triptofano, é capaz de promover a exflagelação de gametócitos masculinos. Além disso, Billker et al. (2004) demonstraram que a CDPK4 é um dos alvos do sinal de cálcio: parasitas nocautes para

essa proteína não apresentaram exflagelação, apesar de os gametócitos conseguirem romper o eritrócito e se arredondarem. A família das CDPKs parece estar presente apenas em apicomplexos, plantas, algas verdes e ciliados e contém quatro motivos que ligam cálcio (*EF hands*) e um domínio serina/treonina quinase (Billker et al., 2004).

1.3.3 Alguns compostos presentes em altas concentrações intracelulares são sinalizadores em Plasmodium

1.3.3.1 Esporozoítos

Uma característica interessante de esporozoítos de *Plasmodium* é o *traversing*: passagem através de diversos hepatócitos antes da invasão da célula em que o esporozoíto sofrerá mudança de formato (*round up*) e desenvolvimento em merozoítos. O processo de *traversing* acontece sem a formação de um vacúolo parasitóforo e com contato do parasita com o meio intracelular do hepatócito, o que contrasta com o processo de invasão do hepatócito para desenvolvimento em merozoítos (Mota et al., 2001). O processo de *traversing* foi demonstrado utilizando-se um marcador fluorescente que tem acesso ao citosol quando do rompimento da membrana plasmática do hepatócito pelo esporozoíto. Quando a membrana plasmática é restabelecida (selada), o marcador fica preso no citosol da célula hospedeira e é visualizado após lavagem. Os autores sugerem que o *traversing* pode ser um processo importante para a ativação de vias de sinalização e posterior desenvolvimento dentro do hepatócito (Mota et al., 2001). De fato, a incubação de esporozoítos com extratos celulares aumenta a secreção de proteínas importantes na invasão para a membrana plasmática e, portanto, a infectividade (Mota et al., 2001). Uma provável classe de moléculas sinalizadoras importantes no processo de ativação do merozoíto seriam os nucleotídeos. De fato, a incubação de esporozoítos com nucleotídeos de uracila (UMP, UDP e UTP) induz o aumento de exposição na membrana plasmática da proteína TRAP, importante no processo de invasão

pois liga a célula hospedeira ao motor de invasão do parasita (Ono et al., 2008). Foi demonstrado que a cascata de sinalização ativada pelos derivados de uracila no esporozoítio é a via do AMP cíclico pois um bloqueador de adenilato ciclase inibe a secreção quando os parasitas são estimulados com derivados de uracila e a utilização de um ativador de adenilato ciclase (forskolina) ou a adição de um análogo permeável de AMP cíclico (8Br-AMPC) mimetiza o efeito dos compostos purinérgicos (Ono et al., 2008).

Figura 3 - Secreção apical de proteínas em esporozoítos de *Plasmodium* após *traversing*.

Nucleotídeos de uracila ativam um receptor hipotético (?) ou diretamente o domínio canal de potássio da adenilato ciclase α , levando à geração de AMP cíclico, ativação da PKA, aumento de cálcio intracelular e secreção das roptrias. UD: nucleotídeos de uracila, esp: esporozoítio, EBA 175: proteína de ligação a eritrócito 175, TRAP: proteína adesiva relacionada à trombospodina, AC α : adenilato ciclase alfa, EI: estoque interno de cálcio, cAMP: AMP cíclico, m: micronemas, r: roptria. Setas tracejadas indicam processos hipotéticos. Fonte: Baseado em Kumar et al. (2007) e Ono et al. (2008).

Além do AMP cíclico, os autores demonstram que o cálcio de estoques internos, mas não do meio externo, também é importante no processo: a utilização de um quelante intracelular de cálcio inibe a secreção de TRAP, enquanto um quelante extracelular de cálcio não inibe a exposição de TRAP na membrana (Ono et al., 2008). Os autores fortalecem a hipótese da participação de AMP cíclico no processo de ativação do merozoítio por nucleotídeos de uracila através de um nocaute da adenilato ciclase α de *Plasmodium berghei* (Ono et al., 2008). Os parasitas nocautes expõem menos TRAP na membrana quando estimulados com derivados de uracila comparados aos parasitas selvagens (Ono et al., 2008). Interessantemente, a adenilato ciclase α também possui um domínio canal de potássio. Quando se diminui a concentração de

potássio no meio extracelular, a exposição de TRAP na membrana estimulada por derivados de uracila é reduzida (Ono et al., 2008). Assim, outro sinal que poderia agir em conjunto com compostos purinérgicos é o íon K^+ . A concentração de potássio varia de aproximadamente 5 mM no meio extracelular para 150 mM no meio intracelular. Quando esporozoítos são incubados em tampão rico em potássio e colocados em cultura com células HepG2 observa-se um aumento de parasitemia em relação a esporozoítos incubados com tampão rico em Na^+ (Kumar et al., 2007). Caso, no entanto, sejam utilizados inibidores de canais de potássio (cloreto de tetraetilamônio ou quinino) ocorre uma diminuição da parasitemia, em relação a esporozoítos tratados com tampão rico em K^+ (Kumar et al., 2007). Porém um ensaio de microarranjo de cDNA demonstrou que a diferença observada não tem um componente de modificação transcricional grande pois foram observadas diferenças iguais ou maiores de duas vezes apenas para sete genes (Kumar et al., 2007). A **Figura 3** sintetiza os resultados obtidos pelos autores quanto ao efeito do *traversing* para a invasão de *Plasmodium*.

1.3.3.2 Merozoítos

É interessante que, em merozoítos da fase sanguínea de *Plasmodium*, a diminuição da concentração de K^+ sinaliza a secreção de proteínas importantes para a invasão a partir de micronemas, vesículas da região apical do parasita, via o segundo mensageiro cálcio (Singh et al., 2010). O processo é dependente de $PLC\beta$, conforme demonstrado pela inibição da secreção apical de proteínas ao se utilizar o composto U73122 (Singh et al., 2010). Subsequentemente, a ligação do merozoíto a receptores no eritrócito diminui a concentração citosólica de cálcio do parasita. O parasita é exposto às altas concentrações de potássio do citosol do eritrócito em fases jovens, porém em fases maduras a concentração de potássio no eritrócito diminui (Staines et al., 2001). Assim, o parasita é capaz de utilizar baixas concentrações de potássio como um sinal para se preparar para invadir um novo eritrócito (**Figura 4**, Singh et al., 2010).

Figura 4 - A diminuição de potássio extracelular gera a secreção apical de micronemas no merozoíto da fase sanguínea.

Baixo potássio extracelular ativa, via um receptor hipotético (?) a fosfolipase C beta (PLCβ), que leva ao aumento de cálcio intracelular provavelmente através da geração de inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e mobilização de estoques internos (EI). O cálcio provoca a secreção de micronemas (m), contendo as proteínas EBA 175 (*erythrocyte binding antigen 175*) e AMA-1 (*apical membrane antigen-1*). A secreção das roptrias (r) é um processo dependente de ligação ao eritrócito a ser invadido. Setas tracejadas indicam processos hipotéticos. Fonte: baseado em Singh et al. (2010).

Purinas também são importantes na invasão de eritrócitos por merozoítos de *P. falciparum*. Purinas induzem a ativação de vias sinalizadoras tanto no eritrócito quanto no parasita.

Em eritrócitos humanos existem receptores de adenosina, receptores β-adrenérgicos e proteína Gα_s, que ativa a adenilato ciclase (Harrison et al., 2003). A proteína Gα_s é internalizada no vacúolo parasitóforo juntamente com receptores β-adrenérgicos (Harrison et al., 2003) enquanto outras proteínas de membrana de eritrócito, como banda 3 não são internalizadas (Murphy et al., 2007). Sinalização via proteína G do eritrócito é importante no processo de invasão de *P. falciparum*, pois a incubação de culturas de parasitas com um peptídeo de parte de Gα_s, importante na interação com receptores, inibe a entrada de parasitas no eritrócito (Harrison et al., 2003). Além disso, a utilização de agonistas do receptor de adenosina e do receptor β-adrenérgico aumentam a invasão, que é inibida ao se utilizar

concomitantemente antagonistas desses receptores (Harrison et al., 2003). Os autores sugerem que a elevação dos níveis de AMP cíclico, gerada pela ativação da proteína $G\alpha_s$ do eritrócito, pode levar a um remodelamento do citoesqueleto da hemácia, facilitando a invasão (Harrison et al., 2003).

Recentemente, foi demonstrado que as fases intraeritrocíticas de *P. falciparum* de trofozoíto e esquizonte apresentam um aumento sustentado de $[Ca^{2+}]_{cit}$ quando estimulados com os nucleotídeos ATP e UTP (Levano-Garcia et al., 2010). Interessantemente, a resposta foi completamente abolida na ausência de cálcio extracelular (Levano-Garcia et al., 2010). Os autores sugerem o envolvimento de um receptor de ATP do tipo canal de cálcio. Utilizando diversos inibidores de receptores purinérgicos disponíveis comercialmente, os autores notaram, interessantemente, que todos os compostos foram capazes de abolir o aumento citosólico de cálcio, sugerindo a presença de um receptor muito diferente dos receptores identificados até agora (Levano-Garcia et al., 2010). Incubando os parasitas na presença de apirase, uma enzima que hidrolisa ATP, os autores demonstraram que a invasão de eritrócitos pelo parasita é diminuída significativamente (Levano-Garcia et al., 2010) sugerindo assim um papel funcional do ATP na invasão. A participação do ATP na invasão é reforçada pela incubação de culturas do parasita com inibidores de receptores purinérgicos, que também diminuem a invasão, porém não impedem a progressão do ciclo intraeritrocítico do parasita, demonstrando não haver efeito tóxico dos compostos (**Figura 5**, Levano-Garcia et al., 2010). A origem do ATP extracelular que estimula o parasita ainda não foi demonstrada. Foi demonstrado que ATP é liberado através de canais na membrana do eritrócito em células infectadas por *P. falciparum*, porém não em eritrócitos não infectados (Akkaya et al., 2009). Utilizando técnicas de eletrofisiologia (clampeamento em célula inteira), os autores demonstraram que um inibidor de canal aniônico diminui o fluxo de ATP para fora da célula (Akkaya et al., 2009). Pode ser argumentado porém, que o ATP assim liberado é rapidamente degradado, não ficando disponível para estimular o parasita. O ATP extracelular, por outro lado, também pode ser gerado através da perturbação que o parasita causa na membrana da hemácia antes da invasão (Dvorak et al., 1975). Pressão em membranas é um mecanismo conhecido de liberação de ATP (Wan et al., 2008). Outra possível proveniência do ATP é durante a lise do eritrócito no final da esquizogonia.

Figura 5 - ATP gera aumento de cálcio em fases intraeritrocíticas do parasita (par) através de um receptor do tipo canal de cálcio.

Ao menos três processos podem gerar ATP extracelular: deformação do eritrócito (Eri_d) pelo merozoítio (mer) no momento da invasão, canais de ATP (cATP) induzidos pelo parasita no eritrócito infectado (iEri), ruptura do eritrócito carregando fases maduras do parasita. A diminuição de ATP no meio extracelular através do uso de uma apirase diminui a invasão do parasita. Pi: fosfato inorgânico. Setas tracejadas apresentam processos hipotéticos. Fonte: Modificado de Budu e Garcia (2012).

1.4 O Sistema de Sinalização Purinérgico é ubiqüitário entre os seres vivos

Receptores para purinas provavelmente surgiram cedo na evolução dos seres vivos (revisado em Burnstock e Verkhratsky, 2009). A vida primitiva evoluiu em um ambiente aquático, no qual a opção de sinalizadores se restringia a moléculas solúveis em água, que não fossem abundantes no meio (o que excluiria alguns íons) e que estivessem disponíveis em grande quantidade no interior de organismos (revisado em Burnstock e Verkhratsky, 2009). As purinas são moléculas ubiqüitárias, presentes em grande concentração no interior de células por fazerem parte de um grande número de reações enzimáticas celulares endergônicas e constituem o material genético da célula. Além disso, podem ser liberadas para o meio extracelular por processos diferentes: lise celular, exocitose, canais de membrana

e transportadores (revisado em Burnstock e Verkhratsky, 2009). Os três últimos processos são considerados fisiológicos. Transportadores ABC e receptores de ATP do tipo canal são sugeridos como prováveis vias de liberação de ATP para o meio extracelular (revisado em Burnstock, 2009).

Por serem moléculas sinalizadoras altamente conservadas, não é surpreendente que organismos dos filos mais diversos possuam algum tipo de resposta a elas: bactérias, nas quais foram observadas aceleração ou inibição do crescimento em resposta a ATP; *Paramecium* (protozoário ciliado), no qual ATP e GTP geram despolarização da célula devido a influxo de magnésio e sódio via canais de membrana, o que gera a abertura de canais de cálcio; *Ostreococcus taurii* (alga unicelular, com um genoma de 1 bilhão de anos) que possui um receptor purinérgico do tipo canal iônico; e vertebrados, nos quais ATP participa como cotransmissor tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico, além de muitos outros tipos celulares não nervosos (revisado em Burnstock e Verkhratsky, 2009). Em lagartos, foi demonstrado farmacologicamente que eritrócitos das espécies *Ameiva ameiva* e *Tupinambis merianae* possuem receptor metabotrópico para ATP e UTP (Beraldo et al., 2001). Em eritrócitos de *Iguana iguana* há evidências para um receptor para ATP, GTP e UTP porém este parece ser ionotrópico, pois ao se retirar o cálcio do meio extracelular a resposta é abolida (revisado em Bagnaresi et al., 2007). As diferenças farmacológicas suportam a classificação filogenética desses animais, ressaltando a importância desta via de sinalização (revisado em Bagnaresi et al., 2007).

Os efeitos mediados pelos receptores de ATP são os mais diversos, dependendo não apenas do tipo celular mas também do subtipo de receptor expresso: efeitos apoptóticos, proliferação celular, diferenciação, mobilidade celular, quimiotaxia, secreção e neuromodulação são alguns dos processos mediados, em um amplo espectro temporal (revisado em Burnstock, 2009).

1.4.1 Subtipos de Receptores Purinérgicos

Os receptores purinérgicos em humanos estão divididos em duas grandes classes: P1 e P2. Os últimos estão subdivididos em P2X e P2Y (Burnstock, 2007; Burnstock, 2009; Burnstock e Verkhratsky, 2009). Receptores do tipo P1 possuem sete domínios transmembrânicos, têm como ligante a adenosina e são divididos em quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Esses receptores em geral acoplam-se à adenilato ciclase via proteína G_i ou G_s,

porém acoplamento com proteína $G_{q/11}$ e PLC também foi reportado para o subtipo A_{2B} (Burnstock, 2007).

A família P2 é constituída por receptores ativados por ATP e outros nucleotídeos. Receptores P2X são canais iônicos permeáveis a sódio, potássio, cálcio entre outros, divididos em sete subtipos ($P2X_{1-7}$), alguns com *splicing* alternativo dos genes codificantes. O canal iônico funcional é formado por três subunidades, cada qual possuindo dois domínios transmembrânicos com os domínios amina e carboxila terminais intracelulares. Os canais funcionais podem ser homoméricos ou heteroméricos, sendo que alguns subtipos são funcionais apenas na forma heteromérica e outros têm seletividade a cátions diminuída quando expostos durante muito tempo a ATP (i.e., passam a permitir a entrada de cátions maiores, Burnstock, 2007). A família P2Y é composta por 8 subtipos de receptores de sete domínios transmembrânicos, a maioria dos quais transduzem sinal através da proteína G_q , acoplando PLC e levando à produção de IP_3 (Burnstock, 2007). Esses receptores também podem levar, em certos tipos celulares, via proteína G , à abertura ou fechamento de canais de potássio e canais de cálcio voltagem-dependentes de membrana (Burnstock, 2007). Efeitos *downstream* incluem a ativação de várias quinases como PKC, MAPK e PI3K (revisado em Volonte et al., 2006). Além disso, está descrita homodimerização de receptores P2Y e heterodimerização com outros receptores, como P1 e β -adrenérgico, o que modifica a farmacologia dos receptores P2Y. Por exemplo, no caso de heterodimerização de P2Y com P1 o estímulo com ATP gera acoplamento com a proteína G_i , inibição da adenilato ciclase e diminuição da concentração intracelular de AMP cíclico em vez de acoplamento com G_q e consequente ativação da PLC, efeito da maioria dos subtipos de receptores P2Y (revisado em Burnstock, 2007; Volonte et al., 2006). Receptores P2Y podem ser ativados também por pirimidinas, como CTP e UTP (Burnstock, 2007).

1.5 Receptores de sete domínios transmembrânicos (7-TMR): sinalização, expressão, tráfego e classificação

A existência física dos receptores de sete domínios transmembrânicos (7-TMRs) foi, durante muito tempo, colocada em dúvida. Avanços iniciais se deram através do estudo dos 7-TMRs α e β -adrenérgicos. Através do uso de colunas de sefarose ligadas a antagonistas de receptores α e β -adrenérgicos, nas quais se passavam preparações de membrana solubilizadas, foi possível verificar que os receptores eram glicoproteínas de cadeia única e tinham entre 60 e 65 kDa (revisado em Lefkowitz, 2007). Com os receptores β -adrenérgicos purificados em

mãos foi possível incluí-los em vesículas de fosfolípidos reconstituí-los em oócitos de *Xenopus* que não possuem tais receptores. Ensaios de medida da atividade da adenilato ciclase mostraram que havia geração de AMP cíclico em oócitos de *Xenopus* após a reconstituição dos receptores, em um sistema previamente desprovido de atividade β -adrenérgica (Cerione et al., 1983; revisado em Lefkowitz, 2007).

A identificação da estrutura primária dos primeiros 7-TMRs tem uma história interessante. A rodopsina, receptor de luz presente em cones, teve a sua sequência de aminoácidos determinada por degradação de Edman e sequenciamento proteico (Ovchinnikov, 1982). Isso foi possível pois a proteína está presente em grande quantidade na membrana plasmática. Já o receptor β -adrenérgico é quase que um contaminante na preparação de membranas (revisado em Lefkowitz, 2007). Apenas a sequência de alguns aminoácidos foi identificada e esta utilizada para gerar oligonucleotídeos que foram usados para achar a sequência completa em uma biblioteca de cDNA. A sequência de aminoácidos do receptor mostrou sete domínios transmembrânicos, assim como o receptor de rodopsina. Assim se notou que esses sete domínios poderiam ser um aspecto comum desses receptores (revisado em Lefkowitz, 2007). Atualmente, sabe-se que 7-TMRs são a maior classe de receptores de sinal identificados, incluindo por volta de 1000 membros. Eles podem ser ativados por uma ampla gama de estímulos, como peptídeos, luz, íons, proteases, lipídeos e nucleotídeos (revisado em Lefkowitz, 2007).

Durante a tradução, 7-TMRs são importados para o retículo endoplasmático através da ligação de uma partícula reconhecedora de sinal ao peptídeo nascente. Isso recruta o ribossomo e o peptídeo nascente para canais do retículo endoplasmático, formados pelo complexo sec61p. Após a tradução e liberação do receptor para a membrana do retículo endoplasmático, o 7-TMR interage com chaperonas (Bip, calnexina, calreticulina, *heat shock proteins*), que estabilizam conformações intermediárias do receptor, auxiliando em seu dobramento. Caso o receptor não adquira um dobramento correto, as chaperonas continuam ligadas a ele e o receptor é degradado pelo proteassomo. Receptores corretamente dobrados são exportados, via vesículas recobertas com COPII para o complexo de Golgi, e finalmente para a membrana plasmática. O transporte, e ligação de vesículas a membranas é controlado por diversas GTPases, específicas para cada compartimento, chamadas Rab (revisado em Dong et al., 2007).

7-TMRs classicamente utilizam a proteína G heterotrimérica como transdutora de sinal (revisado em Lefkowitz, 2007). Proteínas G heterotriméricas possuem três subunidades: α , β e γ . Ao ligar um agonista, o 7-TMR é estabilizado em uma conformação ativa, expondo sítios

de interação com a proteína G heterotrimérica. A interação entre a proteína G e o receptor ativado promove a troca de GDP por GTP na subunidade α da proteína G, separando a subunidade α das subunidades $\beta\gamma$. A subunidade α pode ativar geradores de segundos-mensageiros, como fosfolipase C (no caso de uma subunidade α do subtipo q) ou adenilato ciclase (no caso de uma subunidade α do subtipo s). Ainda, subunidades α do tipo i podem diminuir a atividade da adenilato ciclase. A fosfolipase C ativada leva à geração do segundo-mensageiro inositol -1,4,5-trifosfato (IP_3), enquanto a adenilato ciclase leva à geração do segundo-mensageiro AMP cíclico a partir de ATP. IP_3 induz aumento de cálcio citosólico que ativa diversos efetores, dentre eles a proteína quinase C. O AMP cíclico, por sua vez, pode ativar o efector proteína quinase A, entre outros (revisado em Selbie e Hill, 1998).

Diversas proteínas que agem na dessensibilização de receptores de sete domínios transmembrânicos foram descobertas; entre elas podem ser citadas quinases de receptores ligados a proteínas G (GRKs) e β -arrestinas. As primeiras fosforilam o receptor ativado, recrutando a β -arrestina. As últimas servem como proteínas andaime e adaptadoras, recrutando várias proteínas para o receptor, dentre as quais se destacam a fosfodiesterase 4, que atua na degradação do AMP cíclico levando à diminuição da atividade da proteína quinase A e consequentemente parando os efeitos de sinalização dependentes de proteína G, e clatrina, proteína associada à internalização do receptor. A β -arrestina pode ser ubiquitinada, levando à internalização do receptor em vesículas (sendo esse processo dependente da clatrina, revisado em Lefkowitz et al., 2006). O próprio receptor pode ser ubiquitinado durante a internalização, o que pode levar à degradação pelo lisossomo (revisado em Marchese et al., 2008). Alternativamente, o receptor pode ser reciclado para a membrana plasmática através de interação de fatores com motivos na porção C-terminal do receptor (Moore et al., 2007). É interessante que apesar de agir inibindo a transdução de sinal via proteína G, a β -arrestina recruta MAP quinases. Essas proteínas são exclusivamente citosólicas, contrastando com MAP quinases ativadas através de PKC, que se localizam também no núcleo. Assim, existe uma segunda via de transdução de sinal via receptores de sete domínios transmembrânicos que é independente de proteína G. Existem agonistas tendenciosos que ativam apenas a sinalização via β -arrestina (revisado em Lefkowitz et al., 2006).

Em suma, a magnitude da resposta celular a partir do estímulo de determinado 7-TMR depende dos processos de transporte anterógrado, dessensibilização, degradação e reciclagem para a membrana plasmática (**Figura 6**).

Figura 6 - Exportação e Sinalização de 7-TMR.

AP2: proteína adaptadora 2, Ub: ubiquitina, SRP: partícula reconhecadora de sinal, PKA: proteína quinase A, PKC: proteína quinase C. Setas tracejadas: transporte, Setas cheias: ativação de um processo, traço perpendicular: inibição. Fonte: Baseado em Selbie e Hill (1998), Dong et al. (2007), Lefkowitz (2007) e Marchese et al. (2008).

Dentro da grande diversidade de 7-TMRs, muitos ainda são órfãos (sem agonistas identificados). Os receptores são subdivididos em famílias distintas com base em classificação em similaridade de sequência. Há, porém, diversas propostas de grupos de classificação (Kolakowski, 1994, Fredriksson et al., 2003). A classificação de Fredriksson, 2003, divide os receptores em cinco famílias: rodopsina, secretina, adesão, *Frizzled/Taste2* e glutamato.

A família da rodopsina é a maior, possuindo 672 receptores identificados (revisado em Lagerstrom et al., 2008) dos quais mais da metade são órfãos. A família é bastante heterogênea, porém uma característica comum é a presença de uma cauda N-terminal

extracelular curta. A essa família pertencem receptores purinérgicos do tipo P2Y além dos dois receptores cristalizados: rodopsina e β -adrenérgico (Millar et al., 2010). A cristalização desses receptores em estados inativos e ativos permitiu a descoberta de diferenças conformacionais entre os dois estados. Particularmente, os domínios transmembrana 5 e 6 da rodopsina têm um significativo deslocamento entre os dois estados (Millar et al., 2010). Os agonistas dos receptores da família rodopsina costumam se ligar aos domínios transmembrana e *loops* extracelulares (revisado em Lagerstrom et al., 2008).

A família dos receptores secretina têm sítios de ligação de hormônio extracelulares, sendo a porção N-terminal importante nessa função. Em geral ligam hormônios peptídicos (revisado em Lagerstrom et al., 2008). A família de receptores adesão é formada por membros que ligam agonistas de matriz extracelular, possuindo um grande domínio N-terminal, bastante distinto entre os seus membros (revisado em Lagerstrom et al., 2008). Os receptores do tipo glutamato ligam seus agonistas na região N-terminal. Membros da família são o receptor sensor de cálcio, gabaérgicos, e metabotrópicos de glutamato, além de receptores gustativos (revisado em Lagerstrom et al., 2008). A última família, *Frizzled/Taste2* engloba receptores do *frizzled*, ativados pela proteína Wnt e importantes no desenvolvimento embrionário e polaridade tecidual. Receptores *Taste2* estão relacionados à gustação de amargo e possuem alta diversidade entre espécies (revisado em Lagerstrom et al., 2008).

1.5.1 Identificação de 7-TMR no genoma de *P. falciparum*

Aspectos *downstream* da sinalização celular via melatonina e outras moléculas estão caracterizados com certo detalhamento no parasita, porém nenhuma informação havia sobre receptores dos hormônios em *Plasmodium*. Há a possibilidade da participação de 7-TMR na sinalização via melatonina em *Plasmodium*. Isso é sugerido pelos dados de inibição obtidos com o antagonista de receptor de melatonina do tipo MT2 luzindol (Beraldo e Garcia CR, 2005; Hotta et al., 2000) e participação da fosfolipase C na sinalização (Beraldo e Garcia CR, 2005; Hotta et al., 2000).

O sequenciamento do genoma de *Plasmodium falciparum*, cepa 3D7, foi concluído em 2002 (Gardner et al., 2002). O genoma nuclear de 23 Mb está organizado em 14 cromossomos e apresenta cerca de 80% de bases A-T. Aproximadamente 60% das 5300 ORFs anotadas no genoma não apresentam função predita devido às proteínas codificadas não apresentarem similaridades em nível de estrutura primária com outros organismos já sequenciados. Em uma primeira análise, não foram encontrados receptores de melatonina no genoma de *P.*

falciparum. Tampouco foram encontradas proteínas G clássicas, apesar de existirem evidências bioquímicas de sua existência (Dyer e Day, 2000).

A partir dos dados do genoma, duas hipóteses poderiam ser elaboradas: a) o parasita se diferenciou tanto de outros organismos que comparações de similaridades são dificultadas ou b) a riqueza em bases A-T “mascara” as similaridades existentes. Sabe-se que a riqueza de A-T promove a maior frequência de certos aminoácidos, como lisina e asparagina, e a menor frequência de outros, como arginina, alanina e prolina. Isso causa regiões de baixa complexidade expostas a baixa pressão seletiva. Callebaut et al. (2005) conseguiu identificar fatores basais de transcrição associados à RNA polimerase II hipotetizando que os aminoácidos deveriam ser conservados em centros hidrofóbicos de domínios globulares de proteínas e utilizando comparações em nível de estrutura secundária. Baseando-se apenas em comparação de sequências, estudos anteriores não haviam sido capazes de identificar esses fatores (Coulson et al., 2004) bastante conservados em eucariotos. Assim, é possível que a riqueza em A-T do genoma mascare similaridades existentes entre algumas ORFs de *P.falciparum* e outros eucariotos.

Utilizando métodos *in silico* restritivos, Madeira et al. (2008) identificaram quatro fortes candidatos a 7-TMRs chamados PFSR1, PFSR10, PFSR12 e PFSR25. Dois dos receptores putativos –PFSR10 e PFSR12– possuem similaridades com 7-TMRs de outros organismos (Madeira et al., 2008) suportando sua classificação dentro da categoria. Os receptores tiveram a expressão demonstrada no ciclo intraeritrocítico através de *real-time* PCR (Madeira et al., 2008).

2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram caracterizar funcionalmente dois receptores hipotéticos de sete domínios transmembrânicos de *Plasmodium falciparum*-PFSR10 e PFSR25. Com a finalidade de obter evidências funcionais dos receptores, os objetivos específicos incluíram ensaios em *Plasmodium falciparum* e em sistema heterólogo:

- a) demonstração da expressão e localização de pfsr10 e pfsr25 no ciclo eritrocítico de *Plasmodium falciparum* através de *western blot* e imunofluorescência;
- b) identificação de prováveis parceiros moleculares dos receptores putativos pfsr10 e pfsr25 através de ensaios de imunoprecipitação;
- c) identificação do efeito dos anticorpos anti-pfsr10 e anti-pfsr25 na invasão de *P. falciparum*;
- d) ensaios de dinâmica de cálcio em *P. falciparum* com parasitas nocaute para PFSR25;
- e) ensaios de contagem de fases intraeritrocíticas em *P. falciparum*;
- f) demonstração da expressão e localização de pfsr10 e pfsr25 em sistema heterólogo (células de mamífero) através de *western blot* e imunofluorescência;
- g) ensaios de dinâmica de cálcio em linhagens de células de mamíferos transfectadas com PFSR10 ou PFSR25;
- h) perfil de fosforilação em linhagem de células de mamíferos transfectadas com PFSR10.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de células de mamíferos

Células de mamíferos foram cultivadas em estufa com atmosfera de CO₂, a 37 °C. O meio de cultura utilizado foi DMEM (Gibco, E.U.A.), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e estreptomicina/penicilina (100 µg/mL, Cultilab, Brasil). Células foram repicadas utilizando solução de tripsina/EDTA (Cultilab, Brasil). Células de mamíferos HEK293T foram utilizadas até a vigésima passagem.

3.2 Cultivo e sincronização de fases intraeritrocíticas de *P. falciparum*

Plasmodium falciparum foi mantido em cultura conforme descrito em Trager e Jensen, (1976) e sincronizado, quando indicado, através do método do sorbitol, segundo Lambros e Vanderberg (1979).

3.3 Clone de *P. falciparum* nocaute para *pfsr25*

O nocaute de *pfsr25* em *P. falciparum* e a seleção clonal foram executados pelo Dr. Julio Levano Garcia e pela Dra Miriam Moraes, respectivamente, utilizando o plasmídeo pCAM-BSD, cedido pelo prof. Christian Doerig (Dorin-Semblat et al., 2008).

3.4 Plasmídeos para expressar PFSR10 e PFSR25 em células de mamíferos

As sequências das ORFs completas de PFSR10 e PFSR25 são flanqueadas pelos sítios de enzima de restrição Xho-I (5') e Bam-HI (3'). As ORFs possuem uma sequência consenso KOZAK (GCCGCC) inserida na extremidade 5' e uma sequência para o epítipo FLAG em sua porção 3'. O epítipo FLAG permite o monitoramento da expressão através de anticorpo monoclonal anti-FLAG M1 (Sigma, E.U.A.). A estratégia de expressão foi elaborada pela Doutora Luciana Madeira. As sequências foram códon-otimizadas para expressão em células de mamíferos pela empresa DNA 2.0 (www.dna20.com, E.U.A.). As sequências foram clonadas em plasmídeo pcDNA 3.1 (-) (Invitrogen, E.U.A.).

3.5 Anticorpo anti-pfsr10

O anticorpo anti-pfsr10 foi desenvolvido pela empresa Genscript (www.genscript.com, E.U.A.) em coelho, utilizando-se como epítopo o peptídeo N-terminal IFENVGISTTDNKN da proteína pfsr10. O pacote de serviço solicitado à empresa foi SC1031. O número de acesso da ORF de pfsr10 no banco de dados PlasmoDB (www.plasmodb.org) é PFL0765w.

3.6 Anticorpo anti-pfsr25

O anticorpo anti-pfsr25 foi desenvolvido pela empresa Proteimax (Brasil) em coelho, utilizando-se como epítopo os aminoácidos N-terminais GTGEVKW de pfsr25 (número de acesso PlasmoDB MAL7P1.64).

3.7 Anticorpo anti-msp1

O anticorpo anti-msp1(19)-GST foi cedido pelo Prof. Gerhard Wunderlich (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Departamento de Parasitologia).

3.8 Detecção da expressão de pfsr10, pfsr25 e msp-1 em *P. falciparum* através de imunofluorescência

Hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7) e merozoítos foram incubados com 5 µg/mL de Brefeldina A (Sigma) durante 3h, a 37°C quando indicado. Procedeu-se à lavagem com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) durante 1 min, 300 g. A lavagem foi repetida mais duas vezes. As células foram fixadas segundo protocolo modificado de Tonkin et al. (2004). A fixação foi executada em 4% (m/v) de paraformaldeído, 0,075% (m/v) de glutaraldeído em PBS durante 30 min, à temperatura ambiente. As células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (Merck) em PBS durante 10 min. Após lavagem em PBS (300 g, 1 min), as células foram incubadas em solução de 0,15% glicina (m/v) e 0,24% NH₄Cl (m/v) durante 20 min para redução de grupos aldeído livres. Após uma lavagem em PBS (300 g, 1 min), as células foram incubadas durante 1 h em PBS contendo 3% albumina bovina (m/v). Após uma lavagem com PBS, as células foram incubadas *overnight* a 4°C em 3% albumina bovina com anti-msp-1(19)

induzido em camundongo, e/ou anti-pfsr10 (coelho) e/ou anti-pfsr25 (coelho) utilizados na diluição de 1:50, 1:250 e 1:100, respectivamente. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG coelho conjugado a Alexa 488 (Invitrogen) e/ou anti IgG camundongo conjugado a Alexa 546 (Invitrogen), na diluição de 1:300 em PBS contendo 3% de albumina bovina (m/v) durante 1 h à temperatura ambiente, sob agitação. Após três lavagens em PBS (1 min, 300g), as células foram incubadas com marcador de DNA DAPI (Invitrogen) 0.01 mg/mL durante 5 min. Após outras três lavagens as lâminas foram montadas com conservador de fluorescência Vectashield (Vector, E.U.A.). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal LSM 510 Meta (Zeiss, Alemanha). Os fluoróforos foram excitados em 488 nm (Alexa 488), 548 nm (Alexa 546) ou 350 nm (DAPI). Os dióicos principais utilizados foram, respectivamente, UV/488, 477/573 e UV (375). A fluorescência foi coletada, respectivamente, com os filtros *band-pass* 501-587, 554-704 e 415-480. Utilizou-se uma objetiva plan-neofluar 100x com abertura numérica 1.3 para visualizar os parasitas.

3.9 Lise de hemácias para isolamento de parasitas *P. falciparum*

Hemácias parasitadas foram lavadas em PBS (5 min, 300 g) e ressuspensas em PBS contendo 0,3% (m/v) saponina e dos seguintes inibidores de proteases: benzamidina (400 µM, Sigma), antipain, pepstatina A, leupeptina e quimostatina (Sigma, todos 20 µg/mL). Após centrifugação a 13000g durante 10 min, 4 °C, as hemácias foram lavadas três vezes em tampão PBS com os inibidores de proteases nas concentrações indicadas acima (300 g, 5 min).

3.10 Detecção de pfsr10 e pfsr25 em estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum* através de western blot

Parasitas *P. falciparum* (cepa 3D7) foram sincronizados diversas vezes. As sincronizações foram efetuadas de 48 h em 48 h. A fase do parasita foi acompanhada através de coloração de Giemsa (Merck, E.U.A.). Aliquotas de parasitas foram isoladas através de lise com saponina em estágios jovens, intermediários e maduros do desenvolvimento. Parasitas isolados foram lisados em tampão de lise (1% Triton X-100, 50 mM Tris, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, pH 7,2) suplementado com benzamidina (400 µM, Sigma), antipain, pepstatina A, leupeptina, quimostatina (todos 20 µg/mL, Sigma) e PMSF 1 mM (Sigma). As

amostras foram incubadas em gelo durante 20 min e centrifugadas a 13000 g durante 10 min. A proteína foi quantificada através do método BCA (Pierce, E.U.A.). 50 µg de proteína do sobrenadante foram fervidos em tampão de amostra de Laemmli durante 10 min. As amostras foram corridas em gel de poliacrilamida 10% m/v a 100 V em tampão de corrida (4M Tris, 1,92 M Glicina, 0,1% SDS). A transferência para membrana de PVDF (Ge Healthcare, E.U.A.) foi executada a 300 mA durante 2 h em tampão contendo 3 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 20% metanol. O bloqueio foi executado *overnight* a 4 °C em TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05% v/v) contendo 5% (m/v) de leite desnatado. A incubação com anticorpo primário (anti-pfsr10 1:2000 ou anti-pfsr25 1:2000) foi executada a 4 °C durante 8 h sob agitação em TBST contendo 5% (m/v) de albumina bovina (Sigma). Após três lavagens em TBST (10 min cada) a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase 1:10000 (anti IgG rabbit HRP, Ge Healthcare) em TBST durante 1 h sob agitação, a temperatura ambiente. Após três lavagens (10 min cada) em TBST, a membrana foi revelada utilizando o *kit* ECL Plus (GE Healthcare). Para controle de carregamento no gel, os anticorpos foram removidos da membrana seguindo protocolo do fabricante e a membrana foi exposta a anticorpo anti-actina (1:5000, em TBST) desenvolvido em coelho (Sigma). Incubação com anticorpo secundário e revelação foram executadas conforme acima.

3.11 Co-imunoprecipitação de parceiros moleculares dos receptores putativos pfsr10 e pfsr25 em *P. falciparum*

A fase de parasitas *P. falciparum* (cepa 3D7) sincronizados foi acompanhada através de lâminas coradas pelo método de Giemsa (Merck). Parasitas nas fases de trofozoíto maduro e esquizonte foram isolados de hemácias.

Quando indicado, os parasitas isolados foram estimulados, em PBS, com 50 µM de ATP durante 10 min. Os parasitas foram ressuspensos em 2 mL tampão de lise de IP (1% v/v Triton X-100, 50 mM Tris pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 % v/v glicerol, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA) contendo os inibidores de proteases benzamidina (4 mM), PMSF (1 mM), antipaína, pepstatina A, quimostatina e leupeptina (todos 200 µg/mL) e os inibidores de fosfatases NaF (1,8 mM) e ortovanadato de sódio (6,7 mM). Os parasitas foram congelados *overnight* a -80 °C. Após o descongelamento, os parasitas foram centrifugados a 13000 g durante 10 min , 4 °C. O sobrenadante foi incubado durante 30 min em agitador com 50 µL de resina sefarose conjugada a proteína A (Ge Healthcare) com o intuito de retirar proteínas com afinidade à resina. Após centrifugação e retirada da resina, o sobrenadante foi incubado *overnight* com 20

µg de anticorpo anti-pfsr10 ou anti-pfsr25 sob agitação a 4 °C. O sobrenadante foi incubado durante 3 h com 50 µL de resina ligada a proteína A. Após a incubação, a resina foi lavada uma vez com tampão de lavagem (LiCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8.6) para reduzir ligações inespecíficas e três vezes em PBS suplementado com inibidores de proteases antipaína, pepstatina A, quimostatina e leupeptina (todos 20 µg/mL). O controle negativo passou pelos mesmos passos, com exceção da adição de anticorpos. Os *beads* foram incubados durante 10 min em tampão de Laemmli (50 µL) e o sobrenadante foi submetido a SDS-PAGE. O gel foi fixado durante 1h com solução de 50% etanol (v/v) e 10% ácido acético (v/v), lavado overnight com solução 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético, corado durante 4 h sob agitação com Coomassie blue R350 (Merck) e descorado com solução 50% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético, sob agitação. As bandas de interesse foram recortadas do gel e as proteínas foram digeridas com tripsina e identificadas através de separação por cromatografia líquida e injeção em espectrômetros de massa em tandem. A digestão e identificação das proteínas através de espectrometria de massa foi executada pela *Protein Core Facility* da Universidade de Columbia (New York, E.U.A.), no caso dos tratamentos com ATP ou pela *Taplin Biological Mass Spectrometry Facility* da universidade de Harvard (Boston, E.U.A.). A análise dos resultados foi executada em programa Excel 2010 (Microsoft). Proteínas identificadas no controle negativo foram comparadas com proteínas encontradas na imunoprecipitação.

3.12 Incubação de eritrócitos parasitados por esquizontes de *P. falciparum* com anticorpo anti-pfsr10 ou anti-pfsr25 e contagem de parasitemia

Plasmodium falciparum (cepa 3D7) mantido em cultura e sincronizado diversas vezes com sorbitol foi incubado, na fase de esquizonte segmentado, com anticorpo anti-pfsr10 ou anti-pfsr25 em diversas concentrações. As hemácias infectadas (< 5% parasitemia) foram pipetadas em placas ELISA de 24 *wells*, em um volume de meio RPMI 1640 (Gibco) de 1 mL e em um hematócrito de 2.5%. A placa foi incubada durante 6 h a 37 °C em câmara com mistura de gases (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂) e, após adição de 10% (v/v) de soro humano A⁺, a placa foi incubada durante 18 h adicionais sob as mesmas condições acima. As hemácias foram peletadas e lavadas uma vez com PBS (1 min, 300 g), fixadas em solução 2% (v/v) formaldeído em PBS *overnight* a temperatura ambiente, lavadas uma vez com PBS (1 min, 300 g), incubadas com RNase A 0,5 mg/mL (Sigma) e Triton X-100 0,1% (v/v) em PBS durante 30 min a 37 °C, e expostas a 1 µM de marcador de DNA YOYO-1 (Invitrogen). A

contagem das células foi efetuada em citômetro FACScalibur (BD, E.U.A.). Hemácias infectadas formam um pico isolado de hemácias não infectadas, possibilitando o cálculo da parasitemia e estágios do parasita, conforme descrito em Schuck et al. (2011).

3.13 Ensaios de dinâmica de cálcio em *P. falciparum*

Parasitas *P. falciparum* (cepa 3D7) foram sincronizados. Aproximadamente 24 h após a sincronização, quando os parasitas se encontravam entre as fases de trofozoíto maduro e esquizonte jovem, a cultura foi coletada e os parasitas foram isolados através de lise com saponina. Os parasitas isolados foram lavados três vezes (13000 g, 5 min) 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 50 min a 37°C em tampão M com 5 µM de Fluo-4 AM (Invitrogen) e 250 µM de probenecida (Sigma). Parasitas foram lavados três vezes em tampão M contendo 250 µM de probenecida. 3*10⁷ parasitas foram lavados em tampão M sem KCl, com a molaridade acertada com NaCl, contendo CaCl₂, exceto em experimentos com EGTA (Sigma), nos quais CaCl₂ foi suprimido do tampão. Alguns inibidores foram adicionados ao tampão, quando indicado, pouco antes do início do ensaio. A fluorescência do Fluo-4 AM foi monitorada em um espectrofluorímetro (RF5301PC Shimadzu, Japão). Fluo-4 AM foi excitado em 505 nm com a lâmpada de Xe e a fluorescência emitida foi captada em 530 nm, com frequência de 1 Hz. A concentração de cálcio foi determinada usando a fórmula:

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

[Ca] é a concentração de cálcio, F_{max} é a fluorescência máxima obtida através da adição de digitonina (Merck) ao final do experimento, F_{min} é a fluorescência mínima obtida através da adição de EGTA, após a adição de digitonina, F é a fluorescência em um dado momento e Kd é a constante de dissociação do Fluo-4 AM, considerada 345 nM. As drogas foram adicionadas utilizando seringas Hamilton (U. S. A.). O volume máximo de adição foi 10 µL. O volume do tampão no ensaio foi de 1 mL. No caso de experimentos com cálcio extracelular quelado por EGTA, a concentração citosólica de cálcio não pôde ser calculada, e a fluorescência foi normalizada pela linha basal (média de 10 pontos da fluorescência basal). Nos experimentos com parasitas nocaute, a fluorescência foi normalizada pela linha basal para clareza de apresentação dos resultados.

3.14 Contagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de parasitas *P. falciparum* incubados com KCl

P. falciparum (cepa 3D7) foi mantido em cultura em parasitemia <5%. Parasitas foram sincronizados com sorbitol durante diversos ciclos. A fase do parasita foi seguida através de lâminas. Cultura contendo trofozoítos maduros e esquizontes jovens (por volta de 24 h após a sincronização) foi peletada a 300 g, 5 min e o sobrenadante foi descartado. A cultura foi dividida em cinco partes. Cada parte foi ressuspensa em 10 mL de uma das seguintes soluções: RPMI 1640 (Gibco) sem soro (controle), tampão rico em KCl com CaCl_2 2 mM, tampão rico em NaCl com CaCl_2 2 mM, tampão rico em KCl com 2 mM EGTA ou tampão rico em NaCl com 2 mM EGTA. A receita comum dos tampões foi: 5 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 5,6 mM D-glicose, 25 mM HEPES-KOH, pH 7,2. Os tampões foram suplementados com 142 mM NaCl (tampão rico em sódio) ou 142 mM KCl (tampão rico em potássio). Após 30 min a 37 °C, os eritrócitos infectados foram centrifugados (300 g, 5 min) e ressuspensados em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro humano A⁺. A cultura foi transferida para uma placa ELISA estéril (1 mL por poço, cada tratamento foi dividido em quatro poços). A placa foi incubada em uma câmara em atmosfera de 5% CO_2 , 5% O_2 , e 80% N_2 , a 37 °C, durante 6 h. Lâminas foram montadas e coradas para contagem de fases em microscópio de luz, contando ao menos 1000 eritrócitos. Apenas as fases intraeritrocíticas de esquizonte e anel foram analisadas, já que trofozoítos foram encontrados em porcentagens baixas no experimento. A fim de contar parasitemia, foi utilizado um citômetro (FACS calibur, BD), seguindo um protocolo descrito anteriormente (Schuck et al., 2011). Os dados foram normalizados pela média do controle (RPMI) e analisados estatisticamente utilizando One-Way ANOVA com pós-teste de Newman Keuls no programa GraphPad Prism v 4.03. Significância estatística foi considerada para $p < 0.05$. Foram executados três experimentos independentes.

3.15 Transfecção e ensaios de dinâmica de cálcio em células 1321N1

Células 1321N1 foram transfectadas utilizando o eletroporador Microporator (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante e utilizando o programa 17 (850V, 20 ms, 2 pulsos). Células foram cotransfectadas com pcDNA3.1(-)-PFSR10 e/ou pcDNA3.1(-) $\text{G}\alpha_{15}$ e/ou plasmídeo vazio e plasmídeo codificante de aequorina citosólica (Brini, 2008), nas combinações indicadas. As quantidades de DNA utilizadas foram de 0,5 μg (aequorina

citossólica), e 2 µg, no total, dos demais plasmídeos. (i.e., para cotransfecção de PFSR10 e $G\alpha_{15}$, foi utilizado 1 µg de cada plasmídeo; para transfecção de apenas plasmídeo vazio, foram utilizados 2 µg do plasmídeo; para transfecção de PFSR10, foi utilizado 1 µg de PFSR10 e 1 µg de plasmídeo vazio). Portanto, as quantidades de DNA foram mantidas constantes entre as transfecções.

Experimentos de dinâmica de cálcio foram executados em um luminômetro, 24 h após a transfecção, conforme descrito em Brini (2008).

3.16 Transfecção de células HEK293T

Células embrionárias de rim humanas expressando o antígeno T (HEK293T) foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm² e crescidas com meio DMEM rico em glicose (Gibco) com soro fetal bovino 10% e estreptomicina/penicilina em estufa de CO₂ a 37°C durante 24 h. As células, com 90% de confluência, foram transfectadas com Lipofectamina 2000 (20 µL / 8 µg de DNA, Invitrogen) segundo o protocolo do fabricante e utilizando DMEM sem soro e sem antibióticos.

Para ensaios com pfsr10, as transfecções foram executadas com 8 µg de pcDNA 3.1 (-) ou 8 µg pcDNA 3.1 (-)-PFSR10 ou 4 µg de pcDNA3.1(-)- $G\alpha_{15}$ e 4 µg de pcDNA 3.1 (-)-PFSR10 ou 4 µg de pcDNA3.1(-)- $G\alpha_{15}$ e 4 µg de pcDNA 3.1 (-). Para ensaios com pfsr25, foram utilizados 8 µg pcDNA3.1(-) ou 8 µg pcDNA 3.1 (-)-PFSR25. Após 6 h de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C o meio foi trocado por DMEM contendo 10 % v/v de soro fetal bovino.

3.17 Ensaios de dinâmica de cálcio em células HEK293T transfectadas com pcDNA3.1-PFSR10 ou pcDNA3.1-PFSR25

Após 24 h de transfecção, as células foram tripsinizadas e contadas utilizando câmara de Neubauer. As células transfectadas foram crescidas durante mais 24 h em placas de 96 poços pretas com fundo transparente (Costar, E.U.A.) em meio DMEM com 10% v/v soro fetal bovino (100 µL de meio por poço, 3*10⁴ células por poço). O meio foi retirado e as células marcadas com 40 µL de DMEM 10% v/v soro fetal bovino contendo 5 µM Fluo-4 AM (Invitrogen) durante 1 h a 37 °C em estufa de CO₂. As células foram lavadas duas vezes com HBSS (5,4 mM KCl, 0,3 mM Na₂PO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 0,5 mM

MgCl₂, 0,6 mM MgSO₄, 5,6 mM D-glucose, 136,9 mM NaCl) contendo CaCl₂ 2 mM (200 µL/poço). Após as lavagens, foi adicionado um volume de 190 µL de HBSS contendo inibidores, quando indicado. A leitura e adição de drogas foi feita em sistema Flexstation 3 (Molecular Devices, E.U.A.), utilizando o modo Flex, excitando o marcador Fluo-4 AM em 488 nm e coletando a fluorescência em 525 nm. Foi utilizado um espelho dicróico de barragem da fluorescência de excitação em 515 nm. Foi tomada uma linha de base durante 50 segundos. Após esse tempo, 10 µL da droga 20 vezes concentrada foi adicionada e a fluorescência foi registrada durante mais 225 segundos. Os gráficos foram reduzidos através do programa SoftMax Pro 5.2 de maneira que a linha basal fosse 100%, após *smoothing* do gráfico utilizando a média de nove pontos. Os dados de três experimentos independentes foram normalizados pelo controle (transfectado com pcDNA3.1(-) ou pcDNA3.1(-)-Gα₁₅). A resposta (Fluorescência Máxima – Fluorescência Basal) foi comparada por One-Way ANOVA com pós-teste de Newman Keuls através do programa GraphPad Prism 4.03. Diferença significativa foi considerada para $p < 0,05$.

3.18 Crescimento de células HEK293T

Células HEK293T foram cotransfectadas com os plasmídeos conforme indicado para os experimentos de dinâmica de cálcio. Células foram plaqueadas em placas de ELISA de 24 poços e contadas em câmara de Neubauer após crescimento.

3.19 Experimentos de fosforilação em células HEK 293T transfectadas com pcDNA3.1(-)-PFSR10 e pcDNA3.1(-)-Gα₁₅

Células HEK293T transfectadas com pcDNA3.1(-) e pcDNA3.1(-)-Gα₁₅ ou pcDNA3.1(-)-PFSR10 e pcDNA3.1(-)-Gα₁₅ foram tripsinizadas e divididas em 8 placas de Petri de 100 mm de diâmetro (Corning), sendo 4 placas de células transfectadas com pcDNA3.1(-) e Gα₁₅ e 4 placas de células transfectadas com PFSR10 e Gα₁₅. Após cultivo em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino durante 24 h, as células foram cultivadas durante mais 24 h em DMEM sem soro fetal bovino (carenciamento). Após troca do meio por DMEM sem soro (5 mL por placa), as células foram estimuladas com ATP 100 nM, ATP 1 µM, ATP 50 µM (Sigma) e incubadas durante 10 min a 37 °C. Algumas células não foram estimuladas e também foram incubadas 10 min a 37 °C. As células foram lavadas três vezes em PBS gelado imediatamente após o estímulo e raspadas em 500 µL de tampão de lise (Tris 50 mM,

5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 10% glicerol, pH 8,0) contendo os inibidores de proteases antipaína, pepstatina, quimostatina e leupeptina nas concentrações de 20 µg/mL cada, 400 µM de benzamidina e 1 mM de PMSF e também os inibidores de fosfatases ortovanadato de sódio (1 mM) e fluoreto de sódio (1 mM). Após repouso no gelo durante 20 min, os lisados foram centrifugados durante 10 min a 13000 g, o sobrenadante separado e as proteínas quantificadas pelo método BCA. 50 µg de proteína do sobrenadante de cada amostra foram fervidas durante 10 min a 100 °C em tampão de amostra de Laemmli, aplicada em gel de poliacrilamida 10% e corrida a 80 V em tampão contendo SDS. As proteínas do gel foram transferidas para membranas de PVDF a 300 mA durante 2 h e a membrana bloqueada 2 h em TBST 5% leite desnatado (m/v) à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas em TBST contendo 5% leite desnatado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-fosfotirosina (539236, Calbiochem, E.U.A.) ou anti-fosfoserina (KP30601, Calbiochem, U.S.A.) overnight a 4 °C no mesmo tampão acima. Após 3 lavagens de 5 min cada em TBST, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG mouse HRP 1:10000 (no caso de membranas incubadas com anti-fosfoserina) ou anti-IgG rabbit HRP 1:10000 (no caso de membranas incubadas com anti-fosfotirosina) durante 1 h em TBST 5% de leite desnatado. Após 3 lavagens de 5 min cada em TBST, as membranas foram reveladas com o kit ECL Plus (Ge Healthcare). Os anticorpos foram retirados das membranas através de incubação a 50 °C durante 30 min em tampão 100 mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS (m/v), 62,5 mM Tris HCl pH 6,7. Após sucessivas lavagens com TBST, as membranas foram bloqueadas *overnight* e incubadas com anticorpo anti-actina desenvolvido em coelho (Sigma) 1:2000, durante 4 h em TBST 5% leite desnatado. Após 3 lavagens em TBST, com duração de 5 min cada, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG mouse HRP 1:10000 em TBST durante 1 h. Após três lavagens de 5 min cada em TBST as membranas foram reveladas com o *kit ECL plus* (Ge Healthcare). Os experimentos de fosforilação foram repetidos três vezes para anti-fosfotirosina e três vezes para anti-fosfoserina. Bandas em alturas diferentes das membranas que apareceram nos três experimentos foram selecionadas para quantificação com a utilização do programa Scion Image (Scion Corporation, E.U.A.), *plugin gelplot2*. As intensidades das bandas de fosforilação foram normalizadas pelas intensidades das bandas de actina para cada linha do gel. Foram utilizadas exposições menores da membrana para normalizar bandas muito intensas. Os valores assim obtidos foram normalizados pelos respectivos controles (i.e., proteína proveniente de tratamento com ATP de células transfectadas com PFSR10 e Gα₁₅ normalizada por proteína sem tratamento com ATP de células transfectadas com PFSR10 e

$G\alpha_{15}$ e proteína proveniente do tratamento com ATP de células transfectadas com pcDNA3.1(-) e $G\alpha_{15}$ normalizada por proteína sem tratamento com ATP de células transfectadas com pcDNA3.1(-) e $G\alpha_{15}$. Para verificar se a fosforilação basal era diferente entre células transfectadas com pcDNA3.1(-) e $G\alpha_{15}$ e células transfectadas com PFSR10 e $G\alpha_{15}$, dividimos a intensidade das bandas normalizadas da transfecção de PFSR10 e $G\alpha_{15}$ pela intensidade das bandas normalizadas da transfecção de pcDNA3.1(-) e $G\alpha_{15}$ das transfecções não tratadas com ATP.

Os dados foram plotados em gráficos no programa GraphPad Prism versão 4.03 e analisados pelo teste t não pareado, comparando as duas condições de transfecção entre si para um mesmo tratamento (*i.e.*, controle sem ATP, ATP 100 nM, ATP 1 μ M e ATP 50 μ M). Valores significativamente diferentes foram considerados para $p < 0,05$.

Para verificar o estado de fosforilação das proteínas ERK1/2 em células HEK293T transfectadas com pfsr10, a membrana foi incubada *overnight* a 4 °C com anti-ERK 1/2 fosforilada (p44/p42 MAPK, 9102, Cell Signaling, E.U.A.) na diluição 1:2000 em TBST 5% BSA. Após três lavagens em TBST, 10 min cada, a membrana foi incubada durante 1 h em TBST com anti rabbit HRP 1:10000 (GE Healthcare). Após três lavagens com TBST (10 min cada), a membrana foi revelada com o *kit* ECL Plus (GE Healthcare).

Para incubação com o anticorpo que reconhece ERK 1/2 total (p44/p42 MAPK, 9101 Cell Signaling), os anticorpos foram removidos da membrana PVDF através de protocolo do fabricante (GE Healthcare). A membrana foi bloqueada e incubada com anticorpo primário anti ERK 1/2 total nas mesmas condições acima. A incubação com anticorpo secundário e revelação foram efetuadas conforme as condições descritas acima.

3.20 Detecção da expressão de pfsr10 e pfsr25 em linhagens de células de mamíferos transfectadas através de imunofluorescência

Células HEK293T foram transfectadas com pcDNA3.1(-)-PFSR10 ou pcDNA3.1(-)-PFSR25 foram crescidas em placas de microscopia confocal (Mattek, U.S.A.) durante 48 h. Células foram incubadas com 10 μ g/mL de aglutinina conjugada a Alexa Fluor 594 (WGA-Alexa 594, Invitrogen) em HBSS com 2 mM $CaCl_2$ durante 10 min a 37 °C. As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído, 20% de sacarose em PBS durante 15 min a temperatura ambiente, lavadas em PBS três vezes e incubadas em solução de *quenching* contendo 0,15% de glicina (m/v) e 0,24% de NH_4Cl (m/v) durante 20 min. As células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (Merck) em PBS durante 3 min. Após 30 min de incubação em

solução de bloqueio contendo 10% soro equino, 5% BSA e 0,05% de gelatina, as células foram lavadas duas vezes com 500 µL de PBS e incubadas com anticorpo anti-FLAG (Sigma) 1:500 (camundongo) em solução de bloqueio durante 1 h. Após 3 lavagens em PBS, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado a Alexa Fluor 488 1:300 (Invitrogen) em solução de bloqueio durante 1 h à temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS 3 vezes e incubadas com DAPI 0,01 mg/mL por 10 min em PBS. As células foram lavadas duas vezes com PBS durante 5 min e analisadas em microscópio confocal Carl Zeiss LSM 510 Meta (Alemanha), de maneira similar à descrita para imunofluorescência de parasitas *P. falciparum*. Para células 1321N1, o protocolo de imunofluorescência foi essencialmente o mesmo, com a diferença de que DAPI e aglutinina não foram utilizados.

3.21 Detecção da expressão de pfsr10 e pfsr25 em células HEK293T transfectadas através de imunoprecipitação seguida de *western blot*

Células HEK293T foram transfectadas com pcDNA3.1(-)-PFSR10 ou pcDNA3.1(-)-PFSR25 conforme descrito para experimentos de dinâmica de cálcio. As células foram lisadas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10%, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, pepstatina 20 µg/mL, leupeptina 20 µg/mL, quimostatina 20 µg/mL, antipainá 20 µg/mL, PMSF (Sigma) 0,2 mM, ortovanadato de sódio 1mM, fluoreto de sódio 5 mM) por 30 min a 4 °C. O lisado celular foi centrifugado a 13000 g por 30 min. 50 µl de proteína A/G (Ge Healthcare) 50% (v/v) foi adicionado e incubado por 30 min a 4° C. O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de Bradford. Aproximadamente 2,5 mg de proteína, adicionou-se 40 µl de anti-flag M2 conjugado a proteína G (Sigma). As amostras foram mantidas a 4 °C sob agitação por 16 h. Em seguida, as amostras foram lavadas 1 vez com tampão de lavagem (LiCl 500mM, Tris-HCl 100mM pH8.6), seguida por 3 lavagens com PBS por 2 min a 300 g. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra 2 vezes (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% (m/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 2% (v/v) β-mercaptoetanol, 25 mM EDTA, 0,04% (m/v) azul de bromofenol). Proteínas foram separadas em 10% SDS-PAGE sob condições redutoras e transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare). A membrana foi bloqueada por 1 h a temperatura ambiente em TBST contendo 5% (v/v) leite desnatado (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,01%, pH 7,4). A membrana foi incubada por 2 h a temperatura ambiente com anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) diluído 1:5000 em TBS-T contendo 5% (v/v) de leite desnatado ou

overnight a 4° C com anticorpo específico anti-pfsr10 1:2000 em TBST contendo 5% (v/v) de leite desnatado. A membrana foi lavada 3 vezes, 15 min cada lavagem, em TBST e incubada por 1 h com anticorpo anti-IgG camundongo/coelho conjugado a HRP (Ge Healthcare). Após lavagem três vezes, 15 min cada, com TBST, a atividade de peroxidase foi detectada pela técnica de ECL (Ge Healthcare).

4 RESULTADOS

4.1 Receptor Serpentino putativo PFSR10

4.1.1 Expressão proteica e localização de pfsr10 em fases sanguíneas de Plasmodium falciparum: o receptor putativo é expresso em todas as fases do ciclo intraeritrocítico e transita pela via de exportação proteica

Com a finalidade de verificar a presença de pfsr10 ao longo do ciclo intraeritrocítico utilizamos a técnica de *western blot*. Em parasitas sincronizados e isolados, demonstramos a expressão de pfsr10 nas fases de anel, trofozoíto e esquizonte (**Figura 7 A**). O anticorpo reconheceu, nas três fases intraeritrocíticas, uma única banda de aproximadamente 80 kDa, que está próximo do peso molecular predito da proteína (aproximadamente 78 kDa). Interessantemente, quando efetuamos o *western blot* em condições não redutoras, verifica-se que o anticorpo reconhece bandas de alto peso molecular (**Figura 7 B**).

A fim de verificar colocalização de pfsr10 com a membrana plasmática do parasita, utilizamos marcação conjunta de pfsr10 e anti-msp1, uma proteína de superfície de merozoíto (**Figura 8, Figura 9**). Verificamos, assim, que pfsr10 possui forte colocalização com a membrana em merozoítos e anéis (**Figura 8**), porém não em esquizontes jovens e esquizontes maduros (**Figura 9**).

Em trofozoítos, msp1 e pfsr10 não colocalizam, porém msp1 parece estar localizada ao redor do vacúolo digestivo nessa fase (**Figura 9**). Assim, a partir desses dados, não podemos determinar a localização de pfsr10 em trofozoítos, apesar de ser pouco provável que pfsr10 possua forte localização com a membrana plasmática nessa fase uma vez que o padrão de fluorescência é citoplasmático.

A fim de verificar se havia reação cruzada entre anticorpos primários e anticorpos secundários, anti-msp1 (camundongo) foi incubado com anti-IgG de coelho ligado a Alexa 488. Em outra incubação, anti-pfsr10 (coelho) foi incubado com anti-IgG de camundongo ligado a Alexa 546. Em ambos os casos, não foi observada fluorescência nos parasitas (dados não mostrados).

Figura 7 - Detecção de pfsr10 em *P. falciparum* através de *western blot*.

A: Detecção de pfsr10 em fases do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Parasitas isolados de *P. falciparum*, sincronizados nas fases de anel, trofozoíto e esquizonte foram lisados e a proteína das amostras foi quantificada. Após SDS-PAGE, transferência para membrana de PVDF e bloqueio, a membrana foi incubada com anti-pfsr10 de coelho (1:2000) e anti- IgG de coelho conjugado a HRP. O controle de carregamento de proteína no gel foi efetuado com anti-actina (1:5000). **B:** Detecção de oligômeros envolvendo pfsr10 em *P. falciparum*. Extratos protéicos de parasitas dessincronizados foram incubados com o agente redutor de pontes dissulfeto β-mercaptoetanol (+ β-mercaptoetanol) ou na ausência do agente redutor (- β-mercaptoetanol). *Western blot* foi executado da mesma maneira que em A.

Em experimentos de imunofluorescência o anticorpo anti-pfsr10 marca diferentes fases sanguíneas do parasita, conforme demonstrado pela marcação conjunta com DAPI (**Figura 8**, **Figura 9**). Nas fases de merozoíto e anel, a localização de pfsr10 é periférica (**Figura 8**), ao passo que a partir da fase de trofozoíto, esquizonte jovem e esquizonte maduro a marcação de pfsr10 é mais internalizada (**Figura 9**).

Figura 8 - Localização subcelular de pfsr10 em fases jovens de *P. falciparum*.

Hemácias infectadas fixadas e bloqueadas foram incubadas com anti-pfsr10 desenvolvido em coelho (1:250), anti-msp1 desenvolvido em camundongo (1:50) e anticorpos secundários anti-IgG de coelho ligado a Alexa 488 e anti-IgG de camundongo ligado a Alexa 546. Colocalização entre msp1 e pfsr10 foi analisada com programa ImageJ, *plugin* colocalization Colormap. Cores próximas ao vermelho indicam boa colocalização (barra). Para diferenciar fases intraeritrocíticas, o DNA dos parasitas foi marcado com DAPI.

Figura 9 - Localização subcelular de pfsr10 em fases maduras de *P. falciparum*.

Hemácias infectadas fixadas e bloqueadas foram incubadas com anti-pfsr10 desenvolvido em coelho (1:250), anti-msp1 desenvolvido em camundongo (1:50) e anticorpos secundários anti-IgG de coelho ligado a Alexa 488 e anti-IgG de camundongo ligado a Alexa 546. Colocalização entre msp1 e pfsr10 foi analisada com programa ImageJ, *plugin* colocalization Colormap. Cores próximas ao vermelho indicam boa colocalização (barra). Para diferenciar fases intraeritrocíticas, o DNA dos parasitas foi marcado com DAPI.

A especificidade do anticorpo anti-pfsr10 pelo epítipo é demonstrada pela ausência de marcação no parasita quando se adiciona o peptídeo utilizado para a síntese do anticorpo durante a incubação com anticorpo primário (**Figura 10**).

Figura 10 - Controle de especificidade do anticorpo anti-pfsr10 nos ensaios de imunofluorescência.

Hemácias infectadas fixadas e bloqueadas foram incubadas com anti-pfsr10 (1:250) e anticorpo secundário apropriado (anti-IgG rabbit conjugado a Alexa 488, 1:300, em verde na figura). Uma parte das hemácias infectadas fixadas foram incubadas com anticorpos na presença de peptídeo utilizado como antígeno para desenvolver o anticorpo anti-pfsr10. DNA foi marcado com DAPI (em azul na figura). Setas apontam parasitas em que foi detectada fluorescência verde, indicativa de reconhecimento de pfsr10 pelo anticorpo anti-pfsr10.

Tendo em vista que pfsr10 colocaliza com a membrana plasmática na fase de anel, resolvemos verificar se a proteína entra na via exocítica. Assim, utilizamos um inibidor de transporte entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, Brefeldina A. Ao incubarmos o parasita com o inibidor verificamos que a distribuição de pfsr10 é grandemente alterada, passando de uma distribuição periférica no parasita para uma localização pontual (**Figura 11**).

Figura 11 - Efeito da brefeldina A na localização subcelular de pfsr10.

Hemácias infectadas no estágio de anel foram incubadas durante 3 h com brefeldina A na concentração de 5 µg/mL (+BFA) ou com veículo (metanol, -BFA). Hemácias foram fixadas, bloqueadas e incubadas com anticorpo anti-pfsr10 (1:250) e com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a Alexa 546 (1:500). O núcleo dos parasitas foi marcado com DAPI.

4.1.2 Anticorpo anti-pfsr10 não altera significativamente invasão e desenvolvimento intraeritrocítico de *P. falciparum*

Com a finalidade de verificar se o anticorpo anti-pfsr10 poderia influenciar o processo de invasão de eritrócitos, incubamos esquizontes segmentados com diversas concentrações do anticorpo. Durante a fase de merozoíto, o esperado é que o anticorpo desenhado contra a porção N-terminal de pfsr10 tenha acesso à proteína, já que pfsr10 colocaliza com a membrana plasmática nessa fase (**Figura 8**). Contamos a parasitemia em um citômetro de fluxo 24 h após a invasão. Verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, com diversas concentrações de anti-pfsr10 tanto na distribuição de fases intraeritrocíticas quanto em parasitemia (**Figura 12 A-C**).

Figura 12 - Distribuição de fases e parasitemia após invasão de hemácias por *P. falciparum* em presença de diversas concentrações de anticorpo anti-pfsr10.

Esquizontes tardios de *P. falciparum* foram incubados com anticorpos em meio de cultura sem soro, durante 6 h. O soro foi acrescentado e os parasitas foram cultivados durante 18 h antes da contagem de parasitemia utilizando citômetro de fluxo. **A**: proporção de fases intraeritrocíticas jovens e avançadas. **B**: Parasitemia, **C**: Histogramas representativos sobrepostos sem anticorpo e com 5 µg/mL de anti-pfsr10. Erit.: eritrócitos. Os resultados são de três experimentos independentes. Dados estão indicados como média $\pm$ erro padrão. Dados foram estatisticamente analisados por One-Way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.

4.1.3 Em sistema heterólogo, pfsr10 é identificada como proteína de aproximadamente 80 kDa e colocaliza parcialmente com a membrana plasmática

A fim de executar ensaios funcionais com pfsr10, transfectamos o candidato a receptor em sistema heterólogo. Células HEK293T-PFSR10 foram incubadas com anticorpo anti-flag e marcador de membrana plasmática (aglutinina). A proteína pfsr10 foi detectada em maior ou menor grau, através de imunofluorescência, em parte da população de células HEK293T-PFSR10 (**Figura 13**) enquanto células HEK293T-vazio não tiveram fluorescência evidente nas mesmas condições experimentais (resultados não mostrados). Após tomada de imagens por microscopia confocal, foi verificado que pfsr10 possui colocalização com a membrana plasmática de células HEK293T (**Figura 14**). Foi observada variação entre as células no que diz respeito à proporção de pfsr10 que colocaliza com a membrana plasmática (**Figura 14**).

Figura 13 - Proporção de células HEK293T com expressão de pfsr10 identificada.

Células foram fixadas, bloqueadas e incubadas com anti-flag (1:500) e anticorpo anti-IgG de camundongo ligado a fluoróforo (em verde, na figura). O DNA foi marcado com DAPI (em azul).

A fim de verificar se pfsr10 é expresso em seu tamanho predito em células HEK293T, extratos de células HEK293T-PFSR10 foram submetidos a imunoprecipitação utilizando resina ligada ao anticorpo anti-Flag. Submetemos o imunoprecipitado a *western blot*. Para detectar pfsr10, utilizamos tanto anticorpo anti-pfsr10, direcionado contra uma porção N-terminal da proteína quanto anticorpo anti-flag, direcionado contra uma porção C-terminal da proteína (**Figura 15 A-C**). Em ambos os casos verificamos a presença de uma banda de aproximadamente 80 kDa, condizente com o peso molecular predito da proteína.

Figura 14 - Localização subcelular de pfsr10 em células HEK293T.

48 h após a transfecção, células HEK293T-PFSR10 foram incubadas com o marcador de membrana aglutinina ligado a Alexa 594 (10 µg/mL). As células foram fixadas, bloqueadas e incubadas com anti-Flag obtido em camundongo (1:500), anticorpo que reconhece um epítipo adicionado a C-terminal de pfsr10. Células foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo ligado a Alexa 488 (1:300). O DNA das células foi marcado com DAPI. A colocalização entre o epítipo flag e aglutinina foi obtida através do programa ImageJ, utilizando o *plugin* colocalization Colormap. Cores próximas ao vermelho indicam maior colocalização. As três células na figura apresentam algum grau de colocalização de pfsr10 com aglutinina (membrana plasmática).

Figura 15 - Detecção de pfsr10 em células HEK293T através de imunoprecipitação seguida de *western blot*.

Extratos celulares de células HEK293T-PFSR10 foram imunoprecipitados com anticorpo anti-Flag. Os imunoprecipitados foram submetidos a SDS-PAGE e transferidos para membrana de PVDF. Após bloqueio da membrana, esta foi submetida a incubação com anticorpo anti-pfsr10 (**A**) ou anticorpo anti-flag (**B**), e anticorpo secundário anti-IgG de coelho HRP. IP (-): imunoprecipitação executada apenas com resina. IP (+): imunoprecipitação executada com resina e anti-Flag. **C**- Esquema de ligação dos anticorpos utilizados na imunoprecipitação e *western blot* à proteína pfsr10 com relação às porções C- e N-terminal da proteína.

4.1.4 Screening de agonistas para pfsr10: alguns nucleotídeos promovem maior aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em células HEK293T-PFSR10+ $G_{\alpha 15}$

A fim de efetuar o *screening* de agonistas para o receptor serpentina putativo pfsr10 utilizamos compostos conhecidos por promoverem algum tipo de resposta fisiológica no parasita (melatonina, N-acetilserotonina, serotonina, KCl, ácido xanturênico, nucleotídeos, AMP cíclico) e outros compostos de que dispúnhamos em nosso laboratório (**Tabela 1**). Para os ensaios de dinâmica de cálcio em sistema heterólogo, transfectamos PFSR10 na linhagem celular HEK293T ou cotransfectamos PFSR10 com a proteína $G_{\alpha 15}$, que acopla

promiscuamente diversos receptores serpentinos, ligando os mesmos à fosfolipase C (Offermanns e Simon, 1995). Marcamos as células com indicador fluorescente de $[Ca^{2+}]_{cit}$, Fluo-4 AM. Nos ensaios, adicionamos cálcio ao meio extracelular quando indicado ou quelamos o cálcio do meio extracelular com EGTA (**Tabela 1**). Não observamos aumento estatístico das respostas de cálcio induzidas pelos compostos acima nas células HEK293T-PFSR10 ou HEK293T-PFSR10+ $G_{\alpha 15}$ em relação aos respectivos controles negativos (**Tabela 1**).

Tabela 1 - *Screening* de agonistas para pfsr10 em células HEK293T.

Composto	Transfecção	Meio extracelular	% da resposta de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em relação à resposta do controle; (número de gráficos/número de experimentos)
Melatonina 100 nM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	94±8; (20/3)
N-acetilserotonina 100 nM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	88±5; (30/5)
Serotonina 100 nM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	122±8; (20/5)
Triptamina 100 nM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	93±12; (3/1)
Acetilcolina 10 µM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	93±16; (4/4)
Acetilcolina 10 µM	PFSR10 + $G_{\alpha 15}$	CaCl ₂ 2 mM	113±6; (24/3)
Acetilcolina 10 µM	PFSR10 + $G_{\alpha 15}$	EGTA 2 mM	94±6; (22/3)
Ácido Xanturênico 100 nM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	131±23; (7/2)
KCl 142 mM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	95±5; (15/3)
KCl 142 mM	PFSR10 + $G_{\alpha 15}$	CaCl ₂ 2 mM	106±5; (21/3)
KCl 142 mM	PFSR10 + $G_{\alpha 15}$	EGTA 2 mM	114±6; (4/1)
AMPc 1 µM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	46±7*; (3/1)
Somatostatina 100 nM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	87±3; (3/1)
Angiotensina 100 nM	PFSR10	CaCl ₂ 2 mM	114±11; (3/1)
CaCl ₂ 2 mM	PFSR10	CaCl ₂ 0 mM	104±4; (6/1)

O aumento de fluorescência do marcador de cálcio Fluo-4 AM após estímulo com os compostos foi calculado através da diferença entre fluorescência máxima e fluorescência mínima após a normalização dos gráficos pela fluorescência basal. O aumento de cálcio nas transfecções com PFSR10 ou PFSR10 e $G_{\alpha 15}$ (proteína G promíscua) foram comparados com os aumentos nos respectivos controles, transfectados com plasmídeo vazio ou plasmídeo vazio e $G_{\alpha 15}$. O meio

extracelular foi suplementado com CaCl_2 quando indicado ou teve o cálcio extracelular quelado com EGTA, exceto no estímulo com CaCl_2 executado em meio extracelular sem adição de cálcio. Os dados foram submetidos a teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0.05$). Dados estão na forma média $\pm$ erro padrão.

Decidimos também utilizar como agonistas os nucleotídeos ATP, ADP, GTP, UTP e adenosina, alguns dos quais induzem aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ em parasitas do gênero *Plasmodium* (da Cruz et al., 2012; Levano-Garcia et al., 2010; Ono et al., 2008). Em células HEK293T-PFSR10 notamos aumento similar de cálcio citosólico após estímulo com ATP em relação a células transfectadas apenas com plasmídeo vazio (**Figura 16 A**). Quando células HEK293T-PFSR10+ $G_{\alpha 15}$ foram estimuladas com ATP, porém, notamos uma resposta estatisticamente maior ($1,89 \pm 0,08$, média $\pm$ erro padrão) dessas células em relação a células HEK293T-vazio+ $G_{\alpha 15}$ (**Figura 16 B**). Interessantemente, quando o experimento é executado na ausência de cálcio extracelular (presença do quelante de cálcio EGTA) verificamos que a resposta diferencial é abolida (**Figura 16 C**). O mesmo padrão de resposta foi obtido com ADP, GTP e UTP, sendo que a análise estatística apontou para aumento significativo da resposta de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ versus o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ em células HEK293T-vazio+ $G_{\alpha 15}$, na presença de cálcio extracelular (aumentos de, respectivamente, $1,7 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,1$ e $1,40 \pm 0,03$ **Figura 16 D**). Porém, da mesma maneira que ATP, os nucleotídeos ADP, GTP e UTP, não promoveram aumento diferencial de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ em células HEK293T-PFSR10 + $G_{\alpha 15}$ em relação a células HEK293T-vazio+ $G_{\alpha 15}$ quando o cálcio do meio extracelular foi quelado com EGTA (**Figura 16 D**). Células HEK293T-PFSR10 estimuladas com ADP, GTP ou UTP não apresentaram aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ estatisticamente diferentes de células HEK293T-vazio (**Figura 16 D**), sugerindo que $G_{\alpha 15}$ é importante para a resposta de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ dependente de PFSR10.

Figura 16 - Dinâmica de cálcio em células HEK293T transfectadas com PFSR10 e estimuladas com nucleotídeos (50 μ M).

A,B,C: Gráficos representativos de dinâmica de cálcio obtidos com ATP (gráficos na forma de % de aumento de fluorescência em relação à linha basal). **A:** Transfecção de PFSR10 ou plasmídeo vazio, experimento na presença de 2 mM de cálcio extracelular. **B:** cotransfecção de PFSR10 e $G\alpha_{15}$ ou cotransfecção de plasmídeo vazio e $G\alpha_{15}$, experimento na presença de 2 mM de cálcio extracelular. **C:** cotransfecção de PFSR10 e $G\alpha_{15}$ ou cotransfecção de plasmídeo vazio e $G\alpha_{15}$, experimento na presença de 2 mM de quelante extracelular de cálcio (EGTA). **D:** análise estatística do aumento de cálcio nos diferentes tratamentos e transfecções. Aumentos de cálcio citosólico em células transfectadas com PFSR10 foram normalizados pelos aumentos citossólicos de cálcio dos respectivos controles (linha tracejada). - $G\alpha$ + Ca^{2+} : células transfectadas apenas com PFSR10, ensaio na presença de cálcio extracelular. + $G\alpha$ + Ca^{2+} : células cotransfectadas com PFSR10 e $G\alpha_{15}$, ensaio na presença de cálcio extracelular. + $G\alpha$ +EGTA: células cotransfectadas com PFSR10 e $G\alpha_{15}$, ensaio executado na presença do quelante extracelular de cálcio EGTA. * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (One-Way ANOVA com teste de Newman-Keuls). Os resultados são de três experimentos independentes. Os números acima das barras indicam o número de gráficos de fluorescência analisados. Dados estão plotados na forma de média e erro padrão.

Comparando as respostas de $[Ca^{2+}]_{cit}$ estatisticamente distintas, em relação aos controles, promovidas por ATP, GTP, UTP e ADP em células HEK293T-PFSR10+ $G_{\alpha 15}$ em meio extracelular contendo cálcio, verificamos uma clara diferença de potência dos agonistas: ATP > GTP > UTP > ADP (**Figura 16 D**).

Interessantemente, para adenosina, não observamos resposta diferencial entre transfecções com PFSR10 e controles em nenhum dos casos (**Figura 16 D**). Para verificar se as diferenças notadas não seriam devidas a um crescimento diferencial das células (*i.e.*, que houvesse um maior número de células HEK293T-PFSR10+ $G_{\alpha 15}$ que células HEK293T-vazio+ $G_{\alpha 15}$ em nossos experimentos de dinâmica de cálcio), efetuamos contagens das células transfectadas, verificando que o número de células entre as transfecções não foi estatisticamente diferente ao longo de 24, 48 e 120 h (**Figura 17**).

Figura 17 - Crescimento de células HEK293T-PFSR10+ $G_{\alpha 15}$ ou HEK293T-vazio+ $G_{\alpha 15}$.

Dados normalizados pelo número de células inicial (transfectadas em 0 h). O número acima das barras indica o número de replicas. Dados estão plotados na forma de média e erro padrão. Resultados são de três experimentos independentes. Dados foram analisados estatisticamente por teste t não pareado, não sendo observadas diferenças estatísticas.

Obtivemos, assim, resultados de dinâmica de cálcio em células HEK293T que sugerem que pfsr10 participa na via de transdução de sinal induzida por ATP. Porém a alta expressão de receptores purinérgicos endógenos em HEK293T celular dificulta uma análise conclusiva do papel de pfsr10. Desse modo, decidimos utilizar a linhagem celular 1321N1, comumente utilizada para a caracterização funcional de receptores purinérgicos. Utilizamos, também, outra técnica de medida de cálcio através da utilização de aequorina (Brini et al.,

1995). Essa técnica é indicada para medir dinâmica de cálcio apenas em células transfectadas, visto que a aequorina é cotransfectada com PFSR10.

Figura 18 - Ensaios de cálcio utilizando aequorina em células 1321N1 transfectadas com PFSR10 e expressão e localização do receptor em células 1321N1.

A: Ensaios de cálcio em células transfectadas com PFSR10, plasmídeo vazio e $G\alpha_{15}$ nas combinações indicadas. As linhas transversais tracejadas indicam perfusão do(s) composto(s) indicado(s). ATP foi utilizado na concentração de 50 μM . Carbacol (carb.) e ácido ciclopiazônico (CPA) foram utilizados na concentração de 500 μM e 20 μM , respectivamente. EGTA foi utilizado na concentração de 600 μM . **B:** Imunofluorescência de PFSR10 transfectado em células 1321N1. O anticorpo anti-flag foi utilizado para detectar localização de pfsr10.

A cotransfecção de PFSR10, $G\alpha_{15}$ e aequorina nessas células não induziu aumentos intracelulares de cálcio em resposta a ATP (**Figura 18 A**). Porém, em ensaios de imunofluorescência em células 1321N1 a proteína pfsr10 parece estar localizada intracelularmente, com baixa localização de membrana (**Figura 18 B**) e também foi observado que poucas células parecem expressar pfsr10. Além disso, é importante notar que a aequorina foi cotransfectada com PFSR10 e $G\alpha_{15}$ inclusive na metade da concentração dos primeiros dois plasmídeos e a amplitude da resposta obtida após estímulo com carbacol e ácido ciclopiazônico (controle positivo) é alta (**Figura 18 A**) indicando boa eficiência de transfecção. Assim, a baixa expressão de pfsr10 não se deve à baixa eficiência de transfecção.

4.1.5 Transfecção de PFSR10 e $G\alpha_{15}$ promove aumento de fosforilação em células HEK293T

Testamos a capacidade de PFSR10 alterar componentes *downstream* de sinalização verificando o padrão de fosforilação de proteínas de células HEK293T-PFSR10+ $G\alpha_{15}$ quando estimuladas com ATP. Utilizamos para tanto células estimuladas com diferentes concentrações do nucleotídeo e incubamos membranas de *western blot* com anticorpos anti-fosfoserina (**Figura 19 A**) e anti-fosfotirosina (**Figura 19 B**), normalizando a intensidade das bandas escolhidas pela intensidade das bandas de actina, utilizadas como controle da quantidade de proteína aplicada no gel.

Tratamentos com ATP promoveram um aumento na fosforilação de proteínas em relação a células não tratadas com ATP, na maioria dos casos (**Figura 20 A**, **Figura 20 B**). Em células HEK293T-PFSR10+ $G\alpha_{15}$, para as concentrações de ATP de 100 nM, 1 μ M e 50 μ M, houve tendência geral de menor aumento de fosforilação de proteínas em resíduos de serina (**Figura 20 A**) e em resíduos de tirosina (**Figura 20 B**) em relação a células HEK293T-vazio+ $G\alpha_{15}$ estimuladas com as mesmas concentrações de ATP. Porém, para uma banda fosforilada em resíduos de tirosina, com massa molecular entre 130 kDa e 170 kDa, foi observada significância estatística entre o aumento de fosforilação em células HEK293T-vazio+ $G\alpha_{15}$ e a fosforilação de células HEK293T-PFSR10+ $G\alpha_{15}$ (**Figura 20 B**).

Figura 19 - Fosforilação de proteínas de células HEK293T-PFSR10+G α_{15} ou HEK293T-vazio+G α_{15} .

A: Proteínas fosforiladas detectadas com anti-fosfoserina. **B:** Proteínas fosforiladas detectadas com anti-fosfotirosina. Algumas bandas presentes nos três experimentos executados (indicadas por flechas) foram selecionadas para quantificação relativa da fosforilação. As concentrações de ATP utilizadas para o estímulo, que teve duração de 10 minutos, estão indicadas. O controle do carregamento do gel foi executado detectando-se actina.

Como a fosforilação de proteínas de células tratadas com ATP havia sido normalizada pelos respectivos controles sem estímulo de ATP (HEK293T-vazio+G α_{15} ou HEK293T-PFSR10+G α_{15}), decidimos verificar se a fosforilação basal nas duas transfecções na ausência de estímulo era diferente. De fato, a fosforilação basal de células HEK293T-PFSR10+G α_{15} teve tendência de ser maior em todas as bandas analisadas, tanto no caso de uso do anticorpo anti-fosfoserina (**Figura 21 A**) quanto no caso de uso de anti-fosfotirosina (**Figura 21 B**). No caso da banda com massa molecular entre 130 kDa e 170 kDa a fosforilação foi significativamente diferente em relação a HEK293T-vazio+G α_{15} .

Figura 20 - Alteração de fosforilação de proteínas após estímulo com ATP em células HEK293T-PFSR10+G α_{15} ou HEK293T-vazio+G α_{15} .

Bandas fosforiladas foram normalizadas pelo controle de carregamento do gel (actina) e em seguida, foram normalizadas pelo respectivo controle sem estímulo com ATP (cotransfecção com plasmídeo vazio e G α_{15} ou cotransfecção com PFSR10 e G α_{15}). Os controles estão indicados através de traços no gráfico. * indica diferença significativa entre as alterações de fosforilação indicadas (teste t não pareado). Dados estão plotados na forma de média e erro padrão. Resultados são de três experimentos independentes. **A**: Fosforilação relativa de proteínas em resíduos de fosfoserina. **B**: Fosforilação relativa de proteínas em resíduos de fosfotirosina.

É conhecido que diversos receptores de sete domínios transmembrânicos ativam MAPK (revisado em Seger e Krebs, 1995). As proteínas MAPK são ativadas, via fosforilação, por proteínas MAPKK. Como observamos que a cotransfecção de PFSR10 e G α_{15} provocou um aumento da fosforilação em proteínas de células HEK293T, decidimos verificar se proteínas MAPK poderiam ser fosforiladas. Para tanto, utilizamos dois anticorpos, o primeiro que reconhece as MAPKs ERK1/2 tanto na forma fosforilada quanto na forma defosforilada (proteína total) e o segundo que reconhece as MAPKs ERK1/2 apenas forma fosforilada. ERK1 possui um tamanho aproximado de 44 kDa e ERK2, 42 kDa. O anticorpo contra proteína total reconheceu ERK 1 e ERK 2, visualizadas como bandas duplas, em todas as transfecções e tratamentos com concentrações distintas de ATP (**Figura 22**). Porém, as

formas fosforiladas de ERK 1/2 foram fracamente detectadas no *western blot* em todas as transfecções e tratamento com ATP (**Figura 22**), sugerindo a não participação destas quinases na resposta induzida por ATP em células HEK293T-PFSR10. Em geral, bandas intensas são detectadas quando há fosforilação de ERK 1/2.

Figura 22 - Fosforilação de proteínas de células HEK293T-PFSR10+G α_{15} em relação ao controle transfectado com plasmídeo vazio e G α_{15} .

A: Fosforilação em resíduos de serina, **B:** Fosforilação em resíduos de tirosina. O controle está indicado através de um traço. * indica diferença estatística em relação ao controle (One Way ANOVA, teste de Newman Keuls). Dados estão plotados na forma de média e erro padrão. Resultados são de três experimentos independentes.

Figura 21 - Análise da fosforilação de ERK1/2 em células HEK293T-PFSR10 e G α_{15} ou HEK293T-vazio+G α_{15} . Os estímulos com diferentes concentrações de ATP tiveram duração de 10 minutos. Experimento representativo de três experimentos.

Figura 23 - Imunoprecipitação de proteínas em *P. falciparum* com anticorpo anti-pfsr10.

A: *Western blot* indicando controle negativo (incubação do extrato com resina), imunoprecipitação (IP) utilizando anticorpo anti-pfsr10 e extrato imunodepletado. IgGH: cadeia pesada do anticorpo utilizado na imunoprecipitação. **B:** SDS-PAGE indicando faixas do gel (entre retângulos) enviadas para identificação de proteínas por espectrometria de massa. *Lanes:* controle negativo (uso apenas de resina na imunoprecipitação, sem anticorpo), imunoprecipitação (IP) utilizando anticorpo anti-pfsr10 e o extrato proteico restante após a imunoprecipitação (imunodepletado).

4.1.6 Proteínas candidatas a interagir com pfsr10 desempenham diversas funções celulares

Com o intuito de identificar parceiros moleculares de pfsr10 em *P. falciparum*, executamos experimentos de imunoprecipitação utilizando anticorpo anti-pfsr10. Através de *western blot*, identificamos pfsr10 no imunoprecipitado, o que valida o protocolo utilizado (**Figura 23 A**).

Para identificar proteínas parceiras moleculares de pfsr10, corremos proteínas imunoprecipitadas em SDS-PAGE e dividimos o gel em diversos pedaços (**Figura 23 B**), que foram enviados para análise de espectrometria de massa. Com a finalidade de executar uma análise mais restrigente, comparamos os resultados de imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10 com um controle negativo, no qual o extrato proteico de *P. falciparum* foi incubado apenas com resina.

Os peptídeos identificados na imunoprecipitação de proteínas de *P. falciparum* utilizando o anticorpo anti-pfsr10 corresponderam a 311 proteínas no genoma de *P. falciparum*, ao passo que no controle negativo os peptídeos identificados corresponderam 353 proteínas. Dentre as proteínas identificadas no imunoprecipitado com anticorpo anti-pfsr10, 79 não tiveram peptídeos identificados no controle negativo (**Tabela 2**). Foram observadas também 20 proteínas com o número de peptídeos identificados três ou mais vezes maior no imunoprecipitado com anti-pfsr10 em relação ao controle negativo. Nomeamos essas proteínas como proteínas enriquecidas (**Tabela 3**).

As proteínas imunoprecipitadas com o anticorpo anti-pfsr10 em *P. falciparum*, exclusivas ou enriquecidas em relação ao controle foram consideradas boas candidatas para interação com pfsr10.

O receptor putativo pfsr10 foi uma das proteínas exclusivamente identificadas na imunoprecipitação, validando a especificidade do anticorpo utilizado (**Tabela 2**).

Quando acessamos as informações das proteínas candidatas a interagir com pfsr10 no banco de dados do genoma de *P. falciparum* (PlasmoDB), verificamos que algumas não possuem função predita. A função de outras candidatas é sugerida através de comparações de similaridade a outras proteínas de função conhecida. Algumas poucas possuem evidências experimentais de função.

Algumas das proteínas candidatas a interagir com pfsr10 apresentam domínios transmembrânicos e peptídeos sinal de exportação (**Tabela 2, Tabela 3**).

As proteínas identificadas podem ser divididas em diversas categorias funcionais, entre elas: proteínas relacionadas à ubiquitinação, à endocitose, à exportação de proteínas, ao dobramento de proteínas, à tradução proteica, à proteólise, à invasão e ao estabelecimento nas células hospedeiras e à replicação do DNA (**Tabela 2, Tabela 3**).

Tabela 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10, sem peptídeos identificados no controle negativo. IP em trofozoítos e esquizontes.

(continua)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
1	pfsr10	PFL0765w	77	Sim	Sim (7)	Receptor serpentino	7
2	Fator de iniciação da tradução eucariótico 3 subunidade 6	PFE1405c	63	Não	Sim (2)	Tradução proteica	6
3	Fator de iniciação da tradução eucariótico 3 subunidade 8	PFL0310c	116	Não	Não	Tradução proteica	6
4	Proteína conservada	MAL13P1.336	79	Não	Não	Desconhecida	6
5	Fator de organização e biogênese do Golgi	PFD0880w	51	Não	Não	Organização e biogênese do Golgi	5
6	Inibidor de associação Rab-GDP	PFL2060c	52	Não	Não	Tráfego vesicular	5
7	Fator de iniciação da tradução 4 gama	MAL13P1.63	147	Não	Não	Tradução proteica	4
8	Proteína rica em asparagina clusterizada	PFL1745c	52	Não	Não	Desconhecida	4
9	ClpB	PF08_0063	122	Sim	Sim (1)	Chaperona, desfaz complexos	4
10	Glutamato tRNA ligase	PF13_0257	101	Não	Não	Tradução proteica	4
11	Proteína conservada	PF14_0191	60	Não	Não	Desconhecida	4

Tabela 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10, sem peptídeos identificados no controle negativo. IP em trofozoítos e esquizontes. (continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
12	Isocitrato desidrogenase	PF13_0242	53 kDa	Não	Não	Metabolismo energético	3
13	Fator de iniciação da tradução 3 subunidade L	PFF0590c	78	Não	Sim (2)	Tradução proteica	2
14	Subunidade do spliceossomo	PFC0375c	160	Não	Não	Maturação RNA	2
15	Glutaminocisteína sintetase gama	PFI0925w	124	Não	Não	Síntese de glutatona	2
16	Proteína conservada	PFI0465c	72	Sim	Não	Desconhecida	2
17	Proteína conservada	PFL1115w	53	Não	Sim (3)	Desconhecida	2
18	Diidropteroato sintetase	PF08_0095	83	Não	Não	Síntese de vitamina	2
19	Proteína conservada	PF08_0091	144	Sim	Não	Desconhecida	2
20	Seril-tRNA sintetase	PF07_0073	62	Não	Não	Síntese proteica	2
21	Alanina tRNA ligase	PF13_0354	165	Sim	Não	Síntese protéica	2
22	DNA ligase I	MAL13P1.22	104	Sim	Não	Replicação DNA	2
23	Proteína de remodelamento da cromatina	PF11_0053	167 kDa	Não	Não	Transcrição RNA	2

Tabela 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10, sem peptídeos identificados no controle negativo. IP em trofozoítos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
24	Fator de transcrição putativo, domínios AP2	PF10_0075	183	Não	Não	Transcrição RNA	2
25	Proteína conservada	PF14_0649	295	Não	Não	Desconhecida	2
26	Glicose-6-fosfato desidrogenase-6-fosfogluconolactonase	PF14_0511	107	Não	Não	Via pentose fosfato	2
27	Sortilina	PF14_0493	102	Não	Sim (2)	Tráfego vesicular	2
28	<i>Heat shock protein</i> 90	PF14_0417	107	Sim	Não	Dobramento proteico	2
29	Proteína de ligação a tRNA	PF14_0401	46	Não	Não	Tradução proteica	2
30	Succinil Coa sintetase	PF14_0295	52	Não	Não	Metabolismo energético	2
31	Proteína hipotética	PF14_0186	80	Sim	Não	Desconhecida	2
32	SERA-6	PFB0335c	118	Sim	Não	Protease, saída de <i>P. falciparum</i> do eritrócito	2
33	Aminoacil tRNA sintetase	PFL0670c	87	Não	Não	Tradução proteica	2
34	RON-5	MAL8P1.73	134	Não	Não	Invasão	1

Tabela 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10, sem peptídeos identificados no controle negativo. IP em trofozoítos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
35	Transportador de monocarboxilato	PFI1295c	61	Não	Sim (11)	Canal	1
36	Transportador de ânions inorgânicos	PFF0690c	97	Não	Sim (12)	Canal	1
37	Leucil tRNA sintase	PFF1095w	170	Não	Não	Tradução proteica	1
38	Proteína de ligação a coronina	PFF1110c	91	Não	Não	Endocitose	1
39	Proteína conservada	PFF1295w	44	Não	Não	Desconhecida	1
40	Proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida	PFC0140c	89	Não	Não	Fusão vesicular	1
41	Asparagina sintetase	PFC0395w	70	Não	Não	Síntese proteica	1
42	Proteína conservada	PFC0835c	53	Sim	Sim (2)	Desconhecida	1
43	Proteína conservada	PFC0730w	26	Não	Sim (3)	Desconhecida	1
44	Rab5a GTPase	PFB0500c	27	Não	Não	Endocitose	1
45	Sec31p	PFB0640c	167	Não	Não	Tráfego vesicular (cobertura de vesículas)	1
46	Proteína de ligação à cromatina	PFB0875c	57	Não	Não	Desconhecida	1

Tabela 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10, sem peptídeos identificados no controle negativo. IP em trofozoítos e esquizontes. (continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
47	Proteína conservada	PFC0315c	46	Não	Não	Desconhecida	1
48	M18 aspartil aminopeptidase	PFI1570c	66	Não	Não	Protease, digestão, saída de <i>P. falciparum</i> do eritrócito	1
49	Fator de <i>splicing</i>	PFI1215w	71	Não	Não	Maturação do RNA	1
50	Subunidade beta do complexo <i>coatomer</i>	PFI0290c	188	Não	Não	Tráfego vesicular	1
51	DNAJ	PFE1170w	62	Sim	Não	Dobramento proteico	1
52	Helicase dependente de ATP DEAD/DEAH <i>box</i>	PFE1085w	97	Não	Não	Replicação do DNA	1
53	Proteína conservada	PFE1015c	82	Não	Não	Desconhecida	1
54	Proteína ribossômica 60S	PFE0845c	28	Não	Não	Tradução proteica	1
55	Fator de <i>splicing</i>	PFE0160c	38	Não	Não	Maturação RNA	1
56	Fosfodiesterase de esfingomielina	PFL1870c	46	Não	Não	Síntese de ácidos graxos	1
57	Proteína conservada	PFL0445w	167	Não	Não	Desconhecida	1

Tabela 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10, sem peptídeos identificados no controle negativo. IP em trofozoítos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
58	Proteína de clivagem glicina T	PF13_0345 p	47	Não	Não	Metabolismo de glicina	1
59	Proteína ligadora de RNA	MAL8P1.40	32	Não	Não	Desconhecida	1
60	EBA-175	MAL7P1.176	175	Sim	Não	Invasão	1
61	Fator de alongação da transcrição s-II	PF07_0057	47	Não	Não	Transcrição RNA	1
62	Histona H2B	PF07_0054	138	Não	Não	Empacotamento do DNA	1
63	Proteína de manutenção de minicromossomo	PF07_0023	94	Não	Não	Replicação do DNA	1
64	Hidrolase de nucleotídeo trifosfato	PF13_0273	304	Não	Não	Desconhecida	1
65	Proteína conservada	MAL13P1.194	73	Não	Não	Desconhecida	1
66	Ribose fosfato fosfoquinase	PF13_0157	64	Não	Não	Metabolismo energético	1
67	Componente de 2-oxoglutarato dehidrogenase	PF13_0121	48	Não	Não	Metabolismo energético	1

Tabela 2 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr10, sem peptídeos identificados no controle negativo. IP em trofozoítos e esquizontes.

							(conclusão)
Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
68	RESA	PF11_0509	127	Não	Não	Estabelecimento do parasita no eritrócito	1
69	Subunidade gama de <i>coatamer</i>	PF11_0463	124	Não	Não	Tráfego vesicular (cobertura de vesículas)	1
70	Proteína conservada	PF11_0246	154	Sim	Sim (2)	Desconhecida	1
71	RON4	PF11_0168	135	Sim	Não	Invasão	1
72	Glioxalase I	PF11_0145	42	Não	Não	Detoxificação	1
73	Fator de transcrição com domínios AP2	PF11_0091	207	Não	Não	Transcrição de RNA	1
74	Proteína rica em glutamato	PF10_0344	141	Sim	Não	Desconhecida	1
75	Proteína perinucleolar	PF10_0278	57	Não	Não	Desconhecida	1
76	Proteína ribonuclear pequena U5	PF10_0041	143	Não	Não	Desconhecida	1
78	Proteína associada ao cromossomo	PFD0685c	141	Não	Não	Desconhecida	1
79	Fator de <i>splicing</i> putativo	MAL13P1.120	101	Não	Não	Maturação RNA	1

Tabela 3 - Proteínas enriquecidas mais de 3 vezes em relação ao controle negativo na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr10 em trofozoitos e esquizontes.

(continua)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Número de peptídeos encontrados na imunoprecipitação / Número peptídeos encontrados no controle negativo
1	Fator de iniciação da tradução eucariótico	PFE0885w	84	Não	Não	Tradução proteica	14/1
2	Fator de iniciação da tradução eucariótico 3 subunidade 7	PF10_0077	63	Não	Não	Tradução proteica	9/1
3	Antígeno associado a membrana do eritrócito 2	MAL7P1.12	263	Não	Sim (2)	Desconhecida	7/1
4	Proteína com similaridade a dinamina	PF11_0465	96	Não	Não	Tráfego vesicular	7/1
5	Treonina tRNA ligase putativa	PF11_0270	119	Sim	Não	Tradução proteica	19/3
6	DNA helicase dependente de ATP	PF13_0330	55	Não	Não	Replicação de DNA	6/1

Tabela 3 - Proteínas enriquecidas mais de 3 vezes em relação ao controle negativo na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr10 em trofozoitos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Número de peptídeos encontrados na imunoprecipitação / Número peptídeos encontrados no controle negativo
7	U2 snRNP fator auxiliary, subunidade pequena PF11_0200 35 kDa 0/0	PF11_0200	35	Não	Não	Desconhecida	6/1
8	Actina II	PF14_0124	42	Não	Não	Invasão	26/5
9	Miosina A	PF13_0233	92	Não	Não	Invasão	5/1
10	Proteína conservada	MAL8P1.103	71	Não	Não	Desconhecida	8/2
11	Proteína ligante de poliadenilato	MAL13P1.303	48	Não	Não	Desconhecida	4/1

Tabela 3 - Proteínas enriquecidas mais de 3 vezes em relação ao controle negativo na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr10 em trofozoitos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Número de peptídeos encontrados na imunoprecipitação / Número peptídeos encontrados no controle negativo
12	Fator de iniciação da tradução eucariótico 3 subunidade 10	PFL0625c	166	Não	Não	Tradução proteica	7/2
13	ATPase de divisão de ciclo celular	PF07_0047	142	Sim	Sim (1)	Controle do ciclo celular, entre outros	3/1
14	CDPK1	PFB0815w	60	Não	Não	Invasão	3/1
15	Fator de <i>splicing</i> putativo	PFE0865c	35	Não	Não	Maturação RNA	3/1
16	Proteína associada ao poro nuclear	PFE0380c	63	Não	Não	Desconhecida	3/1
17	Proteína conservada	PFL1415w	117	Sim	Sim (1)	Desconhecida	3/1

Tabela 3 - Proteínas enriquecidas mais de 3 vezes em relação ao controle negativo na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr10 em trofozoítos e esquizontes

(conclusão)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Número de peptídeos encontrados na imunoprecipitação / Número peptídeos encontrados no controle negativo
18	Enzima ativadora de ubiquitina E1	PFL1245w	132	Não	Não	Diversas funções	3/1
19	Proteína conservada	PFL0280c	39	Não	Não	Desconhecida	6/2
20	Lisil tRNA sintetase	PF13_0262	68	Não	Não	Tradução proteica	12/4

4.1.6.1 Proteínas relacionadas a tradução, via exocítica e via endocítica

Diversas proteínas que fazem parte da maquinaria da tradução de RNA foram encontradas, dentre elas fatores de iniciação da tradução (**Tabela 2**, proteínas 2 e 3).

Dentre as proteínas relacionadas com a via exocítica e/ou endocítica destacamos os seguintes fatores: proteína semelhante à dinamina (**Tabela 3**, proteína 4), a proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida (**Tabela 2**, proteína 40), Sec31p (**Tabela 2**, proteína 45), Rab5a GTPase (**Tabela 2**, proteína 44) e inibidor de associação Rab-GDP (**Tabela 2** proteína 6).

A proteína Sec31p participa do complexo COPII, que cobre vesículas nascentes do retículo endoplasmático que irão se fundir ao complexo de Golgi (Tang et al., 2000).

A dinamina, uma GTPase classicamente envolvida na formação da vesícula endocítica, destacando a vesícula em formação da membrana plasmática. A dinamina também participa da via exocítica, participando na formação de vesículas a partir das cisternas do trans-Golgi (revisado em Ramachandran 2011). A enzima possui um domínio PH (homologia a pleckstrina) para interação com a membrana plasmática, um domínio intermediário de associação com outras subunidades de dinamina, um domínio N-terminal com função GTPase e um domínio C-terminal de ligação a proteínas acessórias para direcionamento a diversos lugares de ação (revisado em Ramachandran, 2011).

A proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida, cuja unidade funcional é um homotrímero, promove a fusão de vesículas a membranas, tanto no transporte entre retículo endoplasmático e complexo de Golgi quanto entre cisternas do complexo de Golgi ou entre o complexo de Golgi e membrana plasmática através da hidrólise de ATP (Whiteheart e Hart, 1994). A função da proteína é a de promover a separação entre receptores proteicos de adesão de proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida (SNARES), receptores estes localizados nas membranas alvo (t-SNARES) e vesículas (v-SNARES), evento que ocorre pouco antes da fusão da vesícula com a membrana (Kuner et al., 2008).

A Rab5a GTPase regula a fusão de vesículas endocíticas ao endossomo inicial, assim como a fusão entre endossomos iniciais (revisado em Olkkonen e Stenmark, 1997) ao passo que a proteína inibidora de associação Rab-GDP diminui a velocidade de desligamento de diversas Rabs a GDP, o que desliga as Rabs de membranas (Ullrich et al., 1993).

4.1.6.2 Proteína relacionada à ubiquitinação

Uma proteína relacionada com ubiquitinação também foi encontrada: a enzima ativadora de ubiquitina E1 (**Tabela 3**, proteína 18). A ubiquitinação de proteínas possui diversas funções celulares, incluindo participação na endocitose de receptores na dessensibilização, degradação proteica e tráfego de proteínas (revisado em Acconcia et al., 2009).

4.1.6.3 Proteínas relacionadas à invasão e estabelecimento na célula hospedeira

Proteínas possivelmente relacionadas à invasão do eritrócito e estabelecimento na célula hospedeira também foram identificadas. Estas incluem a M18 aspartil aminopeptidase (**Tabela 2** proteína 48), EBA175 (**Tabela 2** proteína 60), RESA (**Tabela 2**, proteína 68), Miosina A (**Tabela 3**, proteína 9), CDPK1 (**Tabela 3** proteína 14), RON-4 (**Tabela 2** proteína 71), RON-5 (**Tabela 2** proteína 34) e SERA-6 (**Tabela 2** proteína 32).

A M18 aspartil aminopeptidase é uma metaloprotease que pode participar na digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo de *P. falciparum*, porém pode possuir outras funções, como ativação de proteínas pela remoção das porções N-terminais e fragilização de espectrina, que sustenta a membrana plasmática do eritrócito, participando no processo de ruptura e evasão dos merozoítos do eritrócito (Lauterbach e Coetzer, 2008). É também possível que a protease participe no processo de invasão do eritrócito, já que inibidores de metaloproteases inibem esse processo (Lauterbach e Coetzer, 2008).

A proteína EBA-175 (*erythrocyte binding antigen*) liga-se a receptores no eritrócito permitindo a interação da porção apical do merozoíto com o eritrócito (Duraisingh et al., 2003).

A proteína RESA (*ring-infected erythrocyte surface antigen*) interage com a espectrina do eritrócito, estabilizando a membrana plasmática e impedindo a invasão de novos merozoítos (Pei et al., 2007).

A proteína Miosina A é necessária para a invasão de células hospedeiras por *Toxoplasma gondii* (Meissner et al., 2002) um parasita evolutivamente próximo a *P. falciparum*, o que sugere uma função parecida em *Plasmodium falciparum*.

A proteína CDPK1 (*calcium dependent protein kinase 1*) localiza-se na periferia de merozoítos de *P. falciparum* e, portanto, possui uma localização que permite interagir com a

maquinaria relacionada à invasão de eritrócitos (Green et al., 2008). De fato, CDPK1 é capaz de fosforilar componentes da maquinaria de invasão de eritrócitos que interagem com o complexo motor de Miosina A (Green et al., 2008).

As proteínas RON-4 e RON-5 (*rhoptry neck*) fazem parte do complexo que liga a membrana do eritrócito à membrana do parasita, permitindo a invasão do eritrócito (Curtidor et al., 2011).

A proteína SERA-6 (*serine rich surface antigen*) é uma cisteína protease que localiza no vacúolo parasitóforo de estágios intraeritrocíticos do parasita. Anticorpos contra SERA impedem a saída de parasitas do eritrócito ao final da esquizogonia (Pang et al., 1999).

4.1.6.4 Chaperonas

Dentro da categoria foram identificadas a proteína ClpB (**Tabela 2** proteína 9) e a proteína hsp90 (**Tabela 2** proteína 28).

A proteína ClpB putativa (peptidase caseinolítica B) é uma chaperona com domínio ATPase da superfamília AAA (ATPases relacionadas a diversas funções celulares). A ClpB está envolvida na desagregação de agregados proteicos insolúveis e é importante para a sobrevivência celular em caso de *stress*, funcionando em conjunto com hsp70 (revisado em Doyle e Wickner, 2009). A chaperona é composta por seis subunidades idênticas que formam um canal central por onde proteínas desagregadas linearizadas pela chaperona são inseridas para posterior redobramento na configuração nativa ou degradação por componentes proteolíticos (revisado em Doyle e Wickner, 2009).

Proteínas hsp90, agindo em conjunto com cochaperonas ajudam no dobramento de proteínas através de ligação a domínios hidrofóbicos evitando interações não nativas, na desagregação de complexos proteicos e no encaminhamento de proteínas mal dobradas para degradação via proteassomo (revisado em Taipale et al., 2010).

4.1.6.5 Outras proteínas

Uma ATPase da família cdc48 foi encontrada, ATPase do tipo cdc (**Tabela 3** proteína 13). A proteína em questão possui similaridade com uma ATPase transicional de retículo endoplasmático (VCP), que funciona nos processos celulares de fusão vesicular, degradação proteica e controle do ciclo celular (revisado em Wang et al., 2004). VCP age juntamente com

cdc48 no controle do ciclo celular (revisado em Wang et al., 2004). A proteína cdc48 participa na desmontagem do fuso mitótico no final da anáfase, com dois mecanismos sugeridos de ação: apresentação de proteínas ubiquitinadas do fuso mitótico ao proteassomo para degradação ou rompimento das ligações entre proteínas e microtúbulos do fuso, uma função chaperona (revisado em Cheeseman e Desai, 2004).

Algumas relacionadas à replicação e transcrição do DNA foram identificadas: helicases (**Tabela 3** proteína 6) e fatores de transcrição (**Tabela 2** proteína 24). Proteínas relacionadas ao metabolismo energético também foram encontradas (**Tabela 2** proteína 12).

4.1.7 Imunoprecipitação de parceiros moleculares de *pfsr10* após estímulo com ATP

A fim de verificar se eventualmente, após o estímulo dos parasitas com ATP, havia alteração na qualidade ou quantidade das proteínas que interagiam com o receptor putativo *pfsr10*, executamos imunoprecipitação do receptor após estímulo com ATP, ou na ausência do estímulo.

Após corrida em gel de poliacrilamida e coloração com coomassie, foram observadas algumas bandas no gel (**Figura 24**), com tamanhos de 100 kDa, 70 kDa, duas bandas por volta de 55 kDa, 25 kDa e 20 kDa. A banda mais intensa de 55 kDa é a cadeia pesada de anticorpo. A presença dessa cadeia revela que houve ligação do anticorpo à proteína. A banda de 20 kDa (**Figura 24**, seta 3) foi recortada e identificada por espectrometria de massa, porém a única proteína identificada foi a cadeia leve de IgG. Assim, decidimos identificar as bandas de 100 kDa e 70 kDa, que se encontram bastante distantes da cadeia pesada de IgG (55 kDa, **Figura 24**). Essas bandas são identificadas no gel como banda 1 e banda 2, respectivamente (**Figura 24**, setas 1 e 2). Recortamos e identificamos as proteínas das bandas tanto no controle quanto no tratamento com ATP (**Tabela 4**).

Figura 24 - Imunoprecipitação de proteínas de *P. falciparum* com anti-*pfsr10* após estímulo com ATP.

Bandas enviadas para análise de espectrometria de massa estão indicadas pelas setas 1, 2 e 3. As setas indicam bandas enviadas nos dois tratamentos (sem ATP e com 50 μ M de ATP). IP em trofozoítos e esquizontes.

Tabela 4 - Proteínas identificadas em imunoprecipitado com anticorpo anti-pfsr10 em *P. falciparum*.

Proteína de <i>P. falciparum</i> identificada	Número de peptídeos identificados (-ATP/+ATP)	Número de acesso PlasmoDB	Domínios Conservados	Tamanho predito	Possível Função
Proteína Heat Shock 86	25/26	PF07_0029	HATPaseC, domínios HSP90	86 kDa	Chaperona
Treonina tRNA ligase, putativa	5/10	PF11_0270	Domínios tRNA ligase	120 kDa	Síntese proteica
Proteína de ligação a RNA, putativa	3/8	PFF_0250w	Domínio KH, processamento RNA	86 kDa	Processamento de RNA
Precursor homólogo de endoplasmína, putativo	0/1	PFL1070C	HATPaseC, domínios HSP90	95 kDa	Chaperona, tampão de cálcio
Proteína conservada de <i>Plasmodium</i>	25/26	MAL8P1.103	DUF2009	71 kDa	Desconhecida
Homólogo de Heat Shock 70 (HSP70)	20/21	PFI0875w	PTZ00009	72 kDa	Chaperona
Proteína Heat Shock 70	10/19	PF08_0054	PTZ00009	74 kDa	Chaperona
Proteína conservada de <i>Plasmodium</i>	13/13	PFC0500w	Não encontrado	73 kDa	Desconhecida
Proteína conservada de <i>Plasmodium</i>	0/2	PF14_0191	Não encontrado	60 kDa	Desconhecida
Aconitase	1/0	PF13_0229	AcnA_IRP	103 kDa	Metabolismo energético (ciclo de Krebs)

(-) ATP: Parasitas sem exposição a 50 μ M ATP. (+) ATP: parasitas com exposição a 50 μ M ATP. As quatro primeiras proteínas foram identificadas na banda 1 do gel (100 kDa). As demais proteínas foram identificadas na banda 2 do gel (70 kDa). IP em trofozoítos e esquizontes.

4.2 Receptor Serpentino putativo PFSR25

4.2.1 Expressão proteica e localização de *pfsr25* em fases sanguíneas de *Plasmodium falciparum*: o receptor putativo é mais expresso nas fases de trofozoíto e esquizonte do ciclo intraeritrocítico

A fim de identificar a expressão de *pfsr25* ao longo do ciclo intraeritrocítico, sincronizamos parasitas *P. falciparum* e seguimos a fase dos parasitas através de lâminas. Submetemos alíquotas de parasitas, retirados nos tempos pós-sincronização indicados, a *western blot* (**Figura 25**). A proteína *pfsr25* foi detectada, especificamente, em uma altura de aproximadamente 45 kDa, o que condiz com seu tamanho predito (**Figura 25**). Além disso, a quantidade de *pfsr25* expressa no estágio de anel foi menor que a quantidade de *pfsr25* detectada nos estágios tardios (**Figura 25**).

Figura 25 - Detecção de *pfsr25* em *P. falciparum* através de *western blot*.

Detecção de *pfsr25* em fases do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Parasitas isolados de *P. falciparum* foram sincronizados e lisados nas horas pós sincronização (hps) indicadas. A proteína das amostras foi quantificada. Após SDS-PAGE, transferência para membrana de PVDF e bloqueio, a membrana foi incubada com anti-*pfsr25* de coelho (1:2000) e anti- IgG de coelho conjugado a HRP. O controle de carregamento de proteína no gel foi efetuado com anti-actina (1:5000). Os estágios observados através de lâminas em cada extração estão indicados. A: anel, T: trofozoíto, E: esquizonte.

Utilizando anticorpo anti-*pfsr25* desenvolvido em coelho verificamos, através de experimentos de imunofluorescência, que houve detecção de *pfsr25* nas fases de trofozoíto e

esquizonte (**Figura 26**), enquanto na fase jovem de anel não detectamos o receptor putativo (**Figura 26**), o que está de acordo com o observado através de *western blot* (**Figura 25**).

Em merozoítos, detectamos pfsr25, porém fracamente (**Figura 26**). A fim de verificar a localização de pfsr25 em relação à membrana de *P. falciparum* efetuamos experimentos de imunofluorescência utilizando anticorpo contra a proteína msp1, que está localizada na membrana plasmática durante fases maduras do desenvolvimento (Dluzewski et al., 2008). Verificamos, assim, que há colocalização parcial de pfsr25 com a membrana plasmática dos parasitas durante fases maduras do desenvolvimento (**Figura 27**).

Figura 26 - Detecção através de imunofluorescência da expressão de pfsr25 em fases do ciclo eritrocítico de *P. falciparum*.

Hemácias infectadas fixadas e bloqueadas foram incubadas com anti-pfsr25 desenvolvido em coelho (1:100) e anticorpo secundário anti-IgG coelho ligado a Alexa 546. Para diferenciar fases intraeritrocíticas, o DNA dos parasitas foi marcado com DAPI. Traços vermelhos: escala (2μm).

Figura 27 - Localização subcelular de pfsr25 em fase madura de *P. falciparum*.

Hemácias infectadas fixadas e bloqueadas foram incubadas com anti-pfsr25 desenvolvido em coelho (1:100), anti-msp1 desenvolvido em camundongo (1:50) e anticorpos secundários anti-IgG de coelho ligado a Alexa 488 e anti-IgG de camundongo ligado a Alexa 546. Colocalização entre msp1 e pfsr25 foi analisada com programa ImageJ, *plugin* colocalization Colormap. Cores próximas ao vermelho indicam boa colocalização (barra). O DNA dos parasitas foi marcado com DAPI.

4.2.2 Anticorpo anti-pfsr25 não altera invasão de hemácias por *P. falciparum*

Com a finalidade de verificar se o anticorpo anti-pfsr25 poderia interferir com o a progressão do ciclo eritrocítico de *P. falciparum*, incubamos esquizontes segmentados com diversas concentrações do anticorpo.

Tendo em vista que pfsr25 é expresso na membrana plasmática de *P. falciparum* na fase de esquizonte (**Figura 28**), momento no qual a célula hospedeira é bastante permeável a macromoléculas (Kutner et al., 1983) e anti-pfsr25 foi desenvolvido contra uma porção N-terminal da proteína, é esperado que o anticorpo tenha acesso a pfsr25. Contamos a parasitemia em um citômetro de fluxo 24 h após a invasão. Não foram encontradas diferenças de parasitemia ou porcentagem de fases em relação ao controle (**Figura 28 A-C**).

Figura 28 - Distribuição de fases e parasitemia após invasão de hemácias por *P. falciparum* em presença de diversas concentrações de anticorpo anti-pfsr25.

Esquizontes tardios de *P. falciparum* foram incubados com anticorpo em meio de cultura sem soro, durante 6 h. O soro foi acrescentado e parasitas cultivados durante 18h antes de contagem de parasitemia utilizando citômetro de fluxo. **A**: proporção de fases intraeritrocíticas jovens e avançadas. **B**: Parasitemia, **C**: Histogramas representativos sobrepostos sem anticorpo e com 5 µg/mL de anti-pfsr25. Erit.: eritrócitos. Os resultados são de três experimentos independentes. Dados estão indicados como média $\pm$ erro padrão. Dados foram estatisticamente analisados por One-Way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.

4.2.3 Em sistema heterólogo, pfsr25 é identificada como proteína de aproximadamente 40 kDa e colocaliza parcialmente com a membrana plasmática

A fim de executar ensaios funcionais, transfectamos PFSR25 em sistema heterólogo. Células HEK293T-PFSR25 foram submetidas a ensaios de imunocitoquímica. A proteína pfsr25 foi detectada em maior ou menor grau, através de imunofluorescência, em parte da população de células HEK293T-PFSR10 (**Figura 29**) enquanto células não transfectadas com o receptor não apresentam fluorescência evidente (dados não mostrados). Através de tomada de imagens com microscópio confocal e uso de aglutinina, um marcador de membrana plasmática, demonstramos que pfsr25 e aglutinina colocalizam parcialmente (**Figura 30**).

Além disso, observamos que houve uma variação fenotípica no que diz respeito ao grau de localização entre pfsr25 e membrana plasmática (*i.e.*, algumas células apresentaram mais colocalização que outras, **Figura 30**).

Figura 29 - Proporção de células HEK293T com expressão de pfsr25 identificada.

Células foram fixadas, bloqueadas e incubadas com anti-flag (1:500) e anticorpo anti-IgG de camundongo ligado a fluoróforo (em verde, na figura). O DNA foi marcado com DAPI (em azul).

Através de imunoprecipitação de extratos de células HEK293T-PFSR25 com anticorpo anti-flag com posterior *western blot*, determinamos que a proteína PFSR25 é expressa em células HEK293T em um tamanho de aproximadamente 40 kDa, condizente com o tamanho predito (**Figura 31**).

Figura 30 - Localização subcelular de pfsr25 em células HEK293T.

48h após a transfecção, células HEK293T-PFSR25 foram incubadas com o marcador de membrana aglutinina ligado a Alexa 594 (10 µg/mL). As células foram fixadas, bloqueadas e incubadas com anti-flag obtido em camundongo (1:500), anticorpo que reconhece um epítipo adicionado à porção C-terminal de pfsr25. Células foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo ligado a Alexa 488 (1:300). O DNA das células foi marcado com DAPI. A colocalização entre o epítipo flag e aglutinina foi obtida através do programa ImageJ, utilizando o *plugin* colocalization Colormap. Cores próximas ao vermelho indicam maior colocalização. As três células na figura apresentam algum grau de colocalização de pfsr25 com aglutinina (membrana plasmática).

Figura 31 - Detecção de pfsr25 em células HEK293T através de imunoprecipitação seguida de *western blot*.

Extratos celulares de HEK293T-PFSR25 foram imunoprecipitados com anticorpo anti-flag. Os imunoprecipitados foram submetidos a SDS-PAGE e transferidos para membrana de PVDF. Após bloqueio da membrana, esta foi submetida a incubação com anticorpo anti-flag e anticorpo secundário anti-IgG de coelho HRP. IP (-): imunoprecipitação executada em células transfectadas com plasmídeo vazio. IP (+): imunoprecipitação executada em células transfectadas com plasmídeo contendo ORF de PFSR25.

4.2.4 Screening de agonistas para o candidato a receptor serpentina pfsr25: KCl promove maior aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em células HEK293T-PFSR25

A fim de fazer o *screening* de agonistas para o receptor putativo pfsr25, procedemos de maneira similar ao *screening* executado com pfsr10. Marcamos células HEK293T-PFSR25 com o indicador fluorescente de $[Ca^{2+}]_{cit}$, Fluo-4 AM e utilizamos um ensaio de *high-throughput* em fluorímetro de placa. Selecionamos os agonistas a serem testados baseando-nos em compostos com efeitos fisiológicos descritos em *P. falciparum*, assim como compostos que possuíamos no laboratório. Adicionamos os potenciais agonistas de pfsr25, calculando os respectivos aumentos de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em células HEK293T-PFSR25 em relação aos aumentos de $[Ca^{2+}]_{cit}$ dos controles negativos, HEK293T-vazio (**Tabela 5**). Os agonistas da **Tabela 5** não foram capazes de promover um aumento diferencial de $[Ca^{2+}]_{cit}$ entre células HEK293T-PFSR25 e células HEK293T-vazio.

Tabela 5 - Screening de agonistas para pfsr25 em células HEK293T.

Composto	Meio extracelular	% da resposta de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em relação à resposta do controle; (número de gráficos/número de experimentos)
Adenosina 50 μ M	2 mM $CaCl_2$	88 ± 3 ; (35/5)
Angiotensina 100 nM	2 mM $CaCl_2$	89 ± 3 ; (3/1)
ATP 50 μ M	2 mM $CaCl_2$	88 ± 4 ; (35/5)
AMPC 1 μ M	2 mM $CaCl_2$	106 ± 5 ; (15/3)
Endotelina 100 nM	2 mM $CaCl_2$	111 ± 1 ; (3/1)
GTP 50 μ M	2 mM $CaCl_2$	97 ± 5 ; (27/4)
Somatostatina 100 nM	2 mM $CaCl_2$	96 ± 1 ; (3/1)
Ácido Xanturênico 100 nM	2 mM $CaCl_2$	81 ± 8 ; (10/2)
UTP 50 μ M	2 mM $CaCl_2$	92 ± 5 ; (19/3)
Melatonina 100 nM	2 mM $CaCl_2$	110 ± 12 ; (11/2)
N-acetilserotonina 100 nM	2 mM $CaCl_2$	101 ± 10 ; (10/2)
Serotonina 100 nM	2 mM $CaCl_2$	107 ± 10 ; (11/2)
$CaCl_2$ 2 mM	0 mM $CaCl_2$	104 ± 5 ; (12/2)
ADP 50 μ M	2 mM $CaCl_2$	89 ± 5 ; (15/2)

O aumento de fluorescência do marcador de cálcio Fluo-4 AM após estímulo com os compostos foi calculado através da diferença entre fluorescência máxima e fluorescência mínima após a normalização dos gráficos pela fluorescência basal. O aumento de cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_{cit}$) nas transfecções com PFSR25 foi comparado com os aumentos nos respectivos controles, transfectados com plasmídeo vazio. O meio extracelular foi suplementado com $CaCl_2$ quando indicado exceto no estímulo com $CaCl_2$ executado em meio extracelular sem adição de cálcio. Os dados foram submetidos a teste estatístico One-Way ANOVA com pós-teste de Dunnett. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle para nenhum dos compostos. Dados estão na forma média $\pm$ erro padrão.

Em busca de um agonista para PFSR25 utilizamos KCl, que aumenta invasão de hepatócitos por esporozoítos (Kumar et al., 2007; Ono et al., 2008). Diminuições na concentração de KCl extracelular também promove secreção de proteínas importantes para a invasão em merozoítos da fase sanguínea de *P. falciparum* (Singh et al., 2010).

Quando estimulamos células HEK293T-PFSR25 com KCl observamos um aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ superior àquele de células HEK293T-vazio (**Figura 32 A**). O aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ observado em HEK293T-PFSR25 foi 1.31 ± 0.03 maior que o observado em HEK293T-vazio (**Figura 32 E**). A fim de verificar se essa diferença observada era devida a um efeito osmótico, utilizamos NaCl para estimular células HEK293T (**Figura 32 B, Figura 32 E**). Verificamos que apesar de NaCl provocar um aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ tanto em HEK293T-PFSR25 quanto em HEK293T-vazio (**Figura 32 B**), não houve diferença estatística entre esses dois aumentos de $[Ca^{2+}]_{cit}$ (**Figura 32 E**). Um agonista não relacionado, acetilcolina, utilizado na mesma série de experimentos, também não foi capaz de promover um aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ diferencial entre células HEK293T-PFSR25 e células HEK293T-vazio (**Figura 32 E**).

A fim de explorar o mecanismo através do qual KCl promove aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em células HEK293T-PFSR25, utilizamos o quelante de cálcio extracelular EGTA. Sob essas condições, o aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ promovido por KCl em células HEK293T-PFSR25 foi praticamente abolido (**Figura 32 C**) e também não foi observada diferença estatística em relação a HEK293T-vazio (**Figura 32 E**). Exploramos, também, o efeito de inibidores de canais iônicos na resposta de $[Ca^{2+}]_{cit}$ promovida por KCl em células HEK293T-PFSR25. Os inibidores de canais de cálcio de membrana La^{3+} , Gd^{3+} (**Figura 32 D**), Ni^{2+} e nifedipina assim como os inibidores de canal de potássio de membrana Ba^{2+} e TEA promoveram a inibição do aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ promovido por KCl em células HEK293T-PFSR25 (**Figura 32 E**).

A fim de verificar se o aumento diferencial de $[Ca^{2+}]_{cit}$ promovido por KCl em células HEK293T-PFSR25 em relação a HEK293T-vazio não seria devido a um maior crescimento de células HEK293T-PFSR25, efetuamos uma contagem de células ao longo de 120 h após a transfecção (**Figura 33**). Observamos que não houve diferenças entre o número de células HEK293T-vazio e HEK293T-PFSR25 em nenhum dos pontos de tempo (**Figura 33**).

Figura 32 - Dinâmica de cálcio em células HEK293T-PFSR25 estimuladas com KCl, NaCl e acetilcolina.

A,B,C,D: Gráficos representativos de dinâmica de cálcio obtidos com estímulos de KCl 142 mM (**A**), NaCl 142 mM (**B**), KCl 142 mM na presença de 4 mM EGTA extracelular (**C**) e KCl 142 mM na presença de 5 mM Gd³⁺ extracelular (**D**). Gráficos apresentados na forma de % de aumento de fluorescência em relação à fluorescência basal. Transfecções de plasmídeo vazio ou PFSR25 estão indicadas. **E:** Análise estatística do aumento de cálcio de células transfectadas com PFSR25 em relação ao aumento de cálcio das respectivas células controle (indicado pela linha tracejada). Barras pretas: estímulos com KCl, NaCl ou acetilcolina. Barras cinza: estímulo com KCl em células incubadas com os inibidores indicados. * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (One-Way ANOVA com teste de Newman-Keuls). Os resultados são de ao menos três experimentos independentes. Os números acima das barras indicam o número de gráficos de fluorescência analisados. Dados estão plotados na forma de média e erro padrão.

Figura 33 - Crescimento de células HEK293T-PFSR25 ou HEK293T-vazio.

Dados normalizados pelo número de células inicial (transfectadas em 0 h). O número acima das barras indica o número de replicas. Dados estão plotados na forma de média e erro padrão. Resultados são de três experimentos independentes. Dados foram analisados estatisticamente por teste t não pareado, não sendo observadas diferenças estatísticas.

4.2.5 KCl provoca aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ dependente de *pfsr25*, em trofozoítos maduros de *P. falciparum* e modula a ruptura de eritrócitos infectados por esses estágios

O KCl é importante em diferentes estágios de vida de *P. falciparum*. KCl aumenta a invasão de hepatócitos por esporozoítos (Kumar et al., 2007; Ono et al., 2008). Além disso, a diminuição da concentração extracelular de KCl decorrente da ruptura de esquizontes com consequente exposição dos merozoítos à concentração plasmática de KCl (5 mM) gera secreção de proteínas importantes para a invasão na membrana plasmática do merozoíto (Singh et al., 2010) processo que é dependente de aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ a partir de estoques internos do parasita (Singh et al., 2010). Como obtivemos evidências de que *pfsr25* é um sensor de KCl (**Figura 32**) e é expresso principalmente em fases intraeritrocíticas de *P. falciparum* (**Figuras 25 e 26**), decidimos verificar se KCl seria capaz de sinalizar em parasitas intraeritrocíticos e se *pfsr25* estaria envolvido no processo. Para tanto, nos valem de experimentos de dinâmica de cálcio utilizando parasitas marcados com o indicador fluorescente Fluo-4 AM.

Quando estimulamos trofozoítos maduros isolados de hemácias com KCl, verificamos um aumento transiente da concentração de $[Ca^{2+}]_{cit}$ (**Figura 34 A**). Esse aumento é dose-dependente e aconteceu em concentrações milimolar de KCl (**Figura 34 B**). Quando quelamos cálcio extracelular com EGTA, o aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ após estímulo com KCl é mantido (**Figura 34 C**). Porém, quando depletamos estoques internos de cálcio com ácido ciclopiazônico ou thapsigargina (**Figura 34 D e 34 E**) ou utilizamos um inibidor de fosfolipase C, U73122 (**Figura 34 F**), verificamos inibição do aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ provocado por KCl. Um análogo inativo do inibidor de fosfolipase C, U73343, não promove inibição do transiente de $[Ca^{2+}]_{cit}$ promovido por KCl (**Figura 34 G**).

Figura 34 - Aumento de concentração citossólica de cálcio em trofozoítos maduros de *P. falciparum* em resposta a KCl.

O tampão de ensaio foi suplementado com $CaCl_2$, EGTA, U73122 ou U73343 nas concentrações indicadas. 0 mM $CaCl_2$: tampão sem cálcio nominal. THG: thapsigargina, inibidora de ATPase de cálcio do retículo endoplasmático. CPA: ácido ciclopiazônico, inibidor de ATPase de cálcio do retículo endoplasmático. F1: fluorescência em um ponto de tempo; F0: média da fluorescência da linha de base, antes da adição de KCl.

A fim de verificar se *pfsr25* participa no processo de transdução de sinal induzido por KCl em parasitas intraeritrocíticos, utilizamos um clone de *P. falciparum* nocaute para PFSR25, gerados em nosso laboratório pelo Dr. Julio Garcia. KCl não foi capaz de promover um aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em trofozoítos maduros isolados de parasitas nocaute para *pfsr25*.

(Figura 34 H) e a adição de thapsigargina após KCl demonstrou que havia cálcio em estoques internos do parasita passível de ser mobilizado (Figura 34 H). Em experimentos concomitantes, KCl foi capaz de aumentar $[Ca^{2+}]_{cit}$ em parasitas selvagens (Figura 34 H).

Com a finalidade de verificar a função de KCl no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*, incubamos eritrócitos infectados com trofozoítos maduros sincronizados com KCl ou NaCl, na presença de cálcio extracelular ou na presença do quelante de cálcio extracelular EGTA. Após incubação, contamos parasitemia e a proporção de fases em cada tratamento. Verificamos que KCl promoveu um aumento da proporção de anéis e diminuição da proporção de esquizontes em relação ao controle após incubação com KCl, mesmo na ausência de cálcio externo (Figura 35 A). NaCl, por outro lado, não promoveu uma alteração da proporção de fases quando o meio extracelular foi suplementado com cálcio (Figura 35 A). Porém, na presença de quelante extracelular de cálcio EGTA, NaCl causou um aumento da proporção de fases maduras de *P. falciparum* (Figura 35 A). Isso sugere que a falta de cálcio extracelular retarda o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*, efeito já observado anteriormente (Gazarini et al., 2003). KCl promoveu uma queda na parasitemia, seja na presença de cálcio extracelular ou na presença de EGTA (Figura 35 B). NaCl, por outro lado, não causou alterações na parasitemia em relação ao controle (Figura 35 B).

Figura 35 - Efeito do KCl na progressão do ciclo de *P. falciparum*.

A: distribuição de fases intraeritrocíticas. A- anel, E- esquizonte. **B:** parasitemia. Culturas sincronizadas na fase de esquizonte jovem foram tratadas por 30 minutos com tampão com alto KCl ou tampão com alto NaCl contendo 2mM de Ca^{2+} ou 2 mM de EGTA. Após 6h, parasitemia e fases foram contadas, respectivamente, manualmente em lâminas ou através de citômetro de fluxo. * indica diferença estatística entre as barras indicados por linhas (One-Way ANOVA com teste de Newman Keuls).

4.2.6. Proteínas candidatas a interagir com pfsr25 desempenham diversas funções celulares

A fim de encontrar parceiros moleculares de pfsr25 em *P. falciparum* utilizamos um experimento de imunoprecipitação similar àquele efetuado para identificar parceiros moleculares de pfsr10. Executamos um *western blot* do imunoprecipitado (**Figura 36 A**), no qual identificamos pfsr25, o que validou o experimento de imunoprecipitação. Corremos proteínas do imunoprecipitado em SDS-PAGE e recortamos bandas, tanto do imunoprecipitado quanto do controle negativo, para identificação de peptídeos através de espectrometria de massa (**Figura 36 B**). Encontramos 65 proteínas exclusivamente presentes no imunoprecipitado (**Tabela 6**), assim como 15 proteínas três ou mais vezes enriquecidas no imunoprecipitado (**Tabela 7**).

As proteínas imunoprecipitadas com o anticorpo anti-pfsr25 em *P. falciparum*, exclusivas ou enriquecidas em relação ao controle foram consideradas candidatas para interação com pfsr25.

Após acesso das informações das proteínas no banco de dados do genoma de *Plasmodium*, PlasmodB, verificamos que algumas candidatas a interagir com pfsr25 não possuem função predita, enquanto outras possuem função predita através de comparações de similaridade. Algumas poucas possuem evidências experimentais de função.

Algumas das proteínas candidatas a interagir com pfsr25 apresentam domínios transmembrânicos e peptídeos sinal de exportação (**Tabela 6, Tabela 7**).

As proteínas identificadas podem ser divididas em diversas categorias funcionais, entre elas: proteínas relacionadas à tradução, à ubiquitinação, à endocitose, à exportação de proteínas, ao dobramento de proteínas, à proteólise, à invasão e estabelecimento nas células hospedeiras e à replicação do DNA (**Tabela 6, Tabela 7**). Algumas proteínas em comum com a imunoprecipitação de candidatos a parceiros moleculares de pfsr10 foram encontradas, e sua função encontra-se explorada em maiores detalhes na seção de resultados da imunoprecipitação de pfsr10.

Figura 36 - Imunoprecipitação de proteínas em *P. falciparum* com anticorpo anti-pfsr25.

A: Western blot do imunoprecipitado, indicando *input* (extrato total) e imunoprecipitação (IP) utilizando anticorpo anti-pfsr25. IgGH: cadeia pesada do anticorpo utilizado na imunoprecipitação. **B:** SDS-PAGE indicando faixas do gel (entre retângulos) enviadas para identificação de proteínas por espectrometria de massa. *Lanes:* controle negativo (uso apenas de resina na imunoprecipitação, sem anticorpo), imunoprecipitação (IP) utilizando anticorpo anti-pfsr25 e o extrato protéico restante após a imunoprecipitação (imunodepletado).

4.2.6.1 Proteínas relacionadas a tradução, via exocítica e via endocítica

Diversas proteínas que fazem parte da maquinaria da tradução de RNA foram encontradas, incluindo uma subunidade do ribossomo (**Tabela 7** proteína 1).

Dentre as proteínas relacionadas com a via exocítica e/ou endocítica destacamos os seguintes fatores: proteína semelhante à dinamina (**Tabela 7** proteína 7), PfPAST (**Tabela 7** proteína 15), a proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida (**Tabela 6** proteína 3), Sec31p (**Tabela 6** proteína 31) e Sec63p (**Tabela 6** proteína 7).

A proteína Sec63p compõe o canal de retículo endoplasmático que se liga a ribossomos no processo de tradução de proteínas com peptídeo sinal. Classicamente, proteínas que possuem um peptídeo sinal nascente se ligam a uma partícula reconhecedora de peptídeo sinal (SRP), que recruta a proteína nascente e o ribossomo para o canal de retículo

endoplasmático, onde a proteína pode ser inserida na membrana ou passar para o lúmen do retículo. Proteínas assim traduzidas podem ser exportadas para organelas membranares (o próprio retículo endoplasmático, a membrana plasmática, lisossomos e endossomos, revisado em Rapoport, 1992).

Outra proteína identificada, PfPAST, possui similaridade com a proteína humana EHD2, pertencente à classe das dinaminas. EHD2 é uma GTPase envolvida na endocitose independente de clatrina e reciclagem de proteínas a partir do endossomo (Daumke et al., 2007).

4.2.6.2 *Proteínas relacionadas à ubiquitinação*

Uma proteína relacionada à ubiquitinação, a enzima ativadora de ubiquitina E1 foi encontrada (**Tabela 7**, proteína 12).

A ubiquitinação de proteínas pode ter diversas funções celulares como reciclagem de receptores de membrana plasmática, regulação de atividade enzimática, permitir interação com outras proteínas e degradação proteica (Acconcia et al., 2009). Com relação ao último exemplo, uma subunidade do proteassomo, responsável pela degradação de proteínas ubiquitinadas foi identificada (**Tabela 6** proteína 50).

4.2.6.3 *Proteínas relacionadas à saída de eritrócitos, invasão e estabelecimento na célula hospedeira*

Proteínas possivelmente relacionadas à invasão do eritrócito e estabelecimento na célula hospedeira também foram identificadas. Estas incluem a M18 aspartil aminopeptidase (**Tabela 6** proteína 4), a msp6 (**Tabela 6** proteína 48), a EBA175 (**Tabela 6** proteína 14), RESA (**Tabela 6** proteína 18) e miosina A (**Tabela 7** proteína 10).

A proteína MSP-6 (proteína de superfície de merozoíto 6) interage com outras proteínas de superfície relacionadas à invasão, msp1 e msp7 (Kauth et al., 2006). Anticorpos contra msp1 inibem a invasão de eritrócitos (Woehlbier et al., 2010).

4.2.6.4 *Chaperonas*

Dentro da categoria foram identificadas uma cochaperona (**Tabela 7** proteína 14), a proteína ClpB (**Tabela 6** proteína 1), e uma proteína hsp90 (**Tabela 6** proteína 56).

As cochaperonas, em conjunto com hsp90, ajudam no dobramento de proteínas através de ligação a domínios hidrofóbicos evitando interações não nativas, na desagregação de complexos proteicos e no encaminhamento de proteínas mal dobradas para degradação via proteassomo (revisado em Taipale et al., 2010).

4.2.6.5 Outras proteínas

Uma ATPase da família cdc48 foi encontrada (**Tabela 7** proteína 8). Algumas proteínas relacionadas à replicação e transcrição do DNA foram identificadas: helicases (**Tabela 6, Tabela 7**) e fatores de transcrição (**Tabela 6**).

Proteínas relacionadas ao metabolismo energético também foram encontradas (**Tabela 6**, proteína 46).

Duas fosfatases de serina/treonina também foram identificadas (**Tabela 6** proteínas 42 e 62).

Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25, em trofozoítos e esquizontes.

(continua)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
1	Proteína ClpB	PF08_0063	122	Sim	Sim (1)	Chaperona, desfaz agregados	8
2	Subunidade de complexo de manutenção de minicromossomo	PF13_0291	105	Não	Não	Replicação de DNA	5
3	Proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida	PFC0140c	89	Não	Não	Fusão de vesículas	3
4	M18 aspartil aminopeptidase	PFI1570c	65	Não	Não	Evasão do eritrócito entre outras funções	3
5	Proteína 6-cisteína	PFE0395c	40	Sim	Sim (1)	Desconhecida. Possui âncora de GPI	3
6	Fator de iniciação de transcrição subunidade alfa	PF07_0117	37	Não	Não	Transcrição de DNA	3
7	Sec63p	PF13_0102	75	Não	Sim (3)	Exportação	3

Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25, em trofozoitos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
8	Antígeno de membrana associado à roptria	MAL7P1.208	103	Sim	Não	Desconhecido	2
9	Leucil RNA sintase	PFF1095w	170	Não	Não	Tradução de RNA	2
10	Fator de replicação c subunidade 1	PFB0895c	104	Não	Não	Replicação do DNA	2
11	Proteína putativa de ligação ao RNA	PFI0820c	45	Não	Não	Desconhecida	2
12	Hidrolase carboxil terminal de ubiquitina	PFE1355c	70	Não	Não	Diversos Processos	2
13	Sintetase de dihidropteroato	PF08_0095	83	Não	Não	Síntese de vitamina	2
14	EBA 175	MAL7P1.176	174	Sim	Não	Invasão de eritrócito	2
15	Seril tRNA sintetase putativa	PF07_0073	62	Não	Não	Tradução de RNA	2
16	Ala tRNA ligase	PF13_0354	165	Sim	Não	Tradução RNA	2

Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25, em trofozoitos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
17	Proteína Kelch, putativa	PF13_0238	83	Não	Não	Homologia com proteína adaptadora de E3 ubiquitina ligase, Ubiquitinação	2
18	RESA	PF11_0509	126	Sim	Não	Estabelecimento na célula hospedeira	2
19	Fenilalanil tRNA sintetase cadeia beta, putativa	PF11_0051	72	Não	Não	Tradução de RNA	2
20	Proteína rica em glutamato	PF10_0344	141	Sim	Não	Desconhecida	2
21	Proteína de reparo de DNA RAD32	PF10_0114	44	Não	Não	Reparo de DNA	2
22	Sortilina, putativa	PF14_0493	102	Não	Sim (2)	Exportação de proteínas para lisossomo	2
23	Proteína conservada	PF14_0191	59	Não	Não	Desconhecida	2

Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25, em trofozoitos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
24	Proteína conservada	PF14_0186	80	Sim	Não	Desconhecida	2
25	DNA ligase	MAL13P1.22	104	Sim	Não	Replicação de DNA	2
26	Regulador de condensação cromossômica	MAL7P1.38	79	Não	Não	Desconhecida	1
27	Proteína putativa de roptria 5	MAL8P1.73	133	Não	Não	Desconhecida	1
28	Fator de iniciação de transcrição 4γ	MAL13P1.63	146	Não	Não	Transcrição de RNA	1
29	Proteína conservada	PFF0835w	53	Não	Não	Desconhecida	1
30	Transportina	PFF1345w	132	Não	Não	Exportação para o núcleo	1
31	Proteína sec31	PFB0640c	166	Não	Não	Cobertura de Vesículas	1
32	Ubiquitina carboxil terminal hidrolase	PFD0680c	98	Não	Não	Deubiquitinação	1
33	Simporter de lipídeo/sterol:H ⁺	PFA0375c	170	Não	Sim (12)	Transporte de lipídeos	1

Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25, em trofozoitos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
34	Decarboxilase de fosfatidilserina	PFI1370c	41	Não	Não		1
35	Proteína exportada	PFE1600w	60	Não	Não	Desconhecida	1
36	Proteína de manutenção de minicromossomo 3	PFE1345c	109	Não	Não	Replicação do DNA	1
37	Fator de iniciação de transcrição eucariótico 5	PFL0335c	64	Não	Não	Transcrição de RNAm	1
38	Proteína com domínio CS	MAL8P1.96	37	Não	Não	Desconhecida	1
39	Antígeno de micronema	PF08_0008	85	Sim	Sim (2)	Desconhecida, possui âncora de GPI	1
40	Proteína similar à ferr. redutase	PF07_0085	72	Não	Não	Metabolismo de ácidos graxos	1

Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25, em trofozoitos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
41	Fator licenciamento replicação (mcm7)	PF07_0023	94	Não	Não	Replicação do DNA	1
42	Serina/treonina fosfatase	MAL13P1.274	76	Não	Não	Desconhecida	1
43	Transportador de nucleosídeo	PF13_0252	47	Não	Sim (9)	Transporte de nucleosídeos	1
44	Fator de <i>splicing</i>	MAL13P1.120	100	Não	Não	Processamento de RNAm	1
45	Carbamil fosfato sintetase	PF13_0044	273	Não	Não	Síntese de pirimidina e arginina, ciclo da uréia	1
46	Succinil CoA sintetase α	PF11_0097	35	Não	Não	Metabolismo energético	1
47	Proteína de remodelamento da cromatina	PF11_0053	167	Não	Não	Desconhecida	1
48	MSP6	PF10_0346	42	Não	Não	Invasão do eritrócito	1
49	Proteína conservada	PF10_0126	43	Não	Não	Desconhecida	1

Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25, em trofozoitos e esquizontes.

(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
50	Subunidade beta de Proteassomo 20S	PF10_0111	30	Não	Não	Proteólise	1
51	Fator de transcrição putativo com domínios AP2	PF10_0075	182	Não	Não	Transcrição de RNA	1
52	Proteína PF70	PF10_0025	69	Não	Sim (1)	Desconhecida	1
53	Proteína conservada	PF14_0714	46	Não	Sim (6)	Desconhecida	1
54	Antiporter de íons inorgânicos	PF14_0679	75	Não	Sim (11)	Transporte de íons	1
55	Helicase DEAD box putativa	PF14_0563	84	Não	Não	Replicação do DNA	1
56	<i>Heat shock protein</i> 90	PF14_0417	107	Sim	Não	Dobramento de proteínas	1
57	Proteína putativa de ligação a tRNA	PF14_0401	46	Não	Não	Desconhecida	1
58	Proteína putativa	PF14_0390	26	Não	Não	Desconhecida	1
59	Succinil CoA ligase, putativa	PF14_0357	111	Não	Não	Metabolismo energético	1

Tabela 6 - Proteínas identificadas exclusivamente na imunoprecipitação com anticorpo anti-pfsr25, em trofozoitos e esquizontes.

(conclusão)							
Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Peptídeos Encontrados na Espectrometria de Massa
60	DNA topoisomerase 2	PF14_0316	169	Não	Não	Replicação do DNA	1
61	Pseudouridina sintase, putativa	PF14_0174	59	Não	Não	Tradução de RNA	1
62	Serina/Treonina fosfatase	PF14_0142	34	Não	Não	Desconhecida	1
63	Proteína de ligação a reticulocito	PF13_0198	370	Não	Não	Desconhecida	1
64	Proteína homóloga a SEY1	PF14_0159	110	Não	Sim (2)	SEY1: fusão e fissão de túbulos retículo endoplasmático	1
65	Tioredoxina Redutase 2	PFI1170c	68	Não	Não	Redução de pontes dissulfeto	1

Tabela 7 - Proteínas enriquecidas mais que 3 vezes em relação ao controle na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr25, em trofozoítos e esquizontes.

(continua)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Número de peptídeos encontrados na imunoprecipitação / Número peptídeos encontrados no controle negativo)
1	Proteína ribossômica 60S L40/UBI putativa	PF13_0346	14	Não	Não	Tradução de RNA	16/4
2	Proteína de ligação à isoleucina, tRNA ligase	PF13_0179	151	Não	Não	Tradução de RNA	8/2
3	Antígeno associado à membrana do eritrócito	MAL7P1.12	263	Não	Sim (2)	Desconhecido	5/1
4	DNA helicase dependente de ATP	PF13_0330	54	Não	Não	Replicação de DNA	4/1
5	Proteína conservada	PFC0435w	154	Sim	Não	Desconhecido	4/1

Tabela 7 - Proteínas enriquecidas mais que 3 vezes em relação ao controle na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr25.
(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Número de peptídeos encontrados na imunoprecipitação / Número peptídeos encontrados no controle negativo)
6	Fator de iniciação da tradução, subunidade 3	PFE0885w	84	Não	Não	Tradução de RNA	4/1
7	Proteína semelhante à dinamina	PF11_0465	96	Não	Não	Formação de vesículas	4/1
8	ATPase da família cdc48	PF07_0047	142	Sim	Sim (1)	Similaridade à ATPase transicional de retículo endoplasmático (VCP), Envolvida com fusão vesicular, dobramento proteico, degradação proteica	3/1

Tabela 7 - Proteínas enriquecidas mais que 3 vezes em relação ao controle na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr25
(continuação)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Número de peptídeos encontrados na imunoprecipitação / Número peptídeos encontrados no controle negativo)
9	DNA helicase dependente de ATP	PF13_0330	54	Não	Não	Replicação de DNA	3/1
10	Miosina A	PF13_0233	92	Não	Não	Tráfego de vesículas	3/1
11	Fator de iniciação da tradução eucariótico 3 subunidade 5	PFI0895c	36	Não	Não	Tradução de RNA	3/1
12	Enzima ativadora de ubiquitina E1 ligase	PFL1245w	131	Não	Não	Diversos processos	3/1
13	Sintetase de glutaminil tRNA	PF13_0170	108	Não	Não	Tradução de RNA	3/1
14	Subunidade de Cochaperona	PF11_0292	29	Não	Não	Desconhecida	3/1

Tabela 7 - Proteínas enriquecidas mais que 3 vezes em relação ao controle na imunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-pfsr25
(conclusão)

Número da proteína	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número de Acesso PlasmodB	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Peptídeo Sinal predito?	Domínios Transmembrana preditos? (número)	Possível Função	Número de peptídeos encontrados na imunoprecipitação / Número peptídeos encontrados no controle negativo)
15	PfPAST-1	PFC0190c	62	Não	Não	Similaridade a EHD2, proteína envolvida com endocitose	3/1

5 DISCUSSÃO

5.1 Receptor serpentino putativo PFSR10

5.1.1 Expressão e localização de *pfsr10* em fases sanguíneas de *P. falciparum*

PFSR10, identificado por análise *in silico* em *Plasmodium* como um receptor serpentino, possui um domínio da família de receptores órfãos de pulmão, sugerindo fortemente a classificação de PFSR10 como um 7-TMR (Madeira et al., 2008). Utilizando um anticorpo policlonal contra uma porção N-terminal de *pfsr10* conseguimos identificar a expressão da proteína em fases intraeritrocíticas do parasita (**Figura 7 A**). Não é intrigante que a proteína *pfsr10* seja expressa nesses estágios, já que experimentos de PCR em tempo real mostraram que o transcrito de PFSR10 está presente em todos os estágios intraeritrocíticos (Madeira et al., 2008).

Quando executamos o *western blot* em condições menos denaturantes, verificamos que *pfsr10* pode formar oligômeros (**Figura 7 B**). Alternativamente, *pfsr10* pode interagir com outras proteínas formando complexos de maior tamanho molecular (**Figura 7 B**). É conhecido que receptores serpentinicos podem interagir entre si durante a exportação para a membrana plasmática (revisado em Gurevich e Gurevich, 2008). Além disso, a dimerização também pode alterar a farmacologia dos receptores (revisado em Gonzalez-Maeso, 2011).

Em fases de merozoíto e anel (**Figura 8**), verificamos que existe uma boa colocalização de *pfsr10* com a membrana plasmática do parasita. Por outro lado, nas fases de esquizonte jovem e esquizonte tardio, a colocalização não é observada (**Figura 9**). A proteína *pfsr10* entra na via de exportação via retículo endoplasmático, pois Brefeldina A altera a distribuição intracelular do receptor putativo na fase de anel (**Figura 11**). Além disso, a entrada de *pfsr10* na via de exportação é predita pela análise *in silico*, pois *pfsr10* possui um peptídeo sinal de exportação. Esses dados em conjunto sugerem que há um tráfego do receptor putativo através de transporte vesicular para a membrana do parasita e também indicam que pode haver endocitose do receptor. A endocitose de receptores serpentinicos é importante nos processos de dessensibilização e ativação de outras vias de sinalização celular (revisado em Lefkowitz, 2007).

A proteína *msp1*, que reconhecidamente está presente na superfície do parasita durante as fases tardias do desenvolvimento intraeritrocítico (Dluzewski et al., 2008) e durante a fase de

merozoíto (Heidrich et al., 1986) foi utilizada como marcador da membrana plasmática nessas fases. É conhecido que a proteína msp1 é sintetizada, em esquizontes, em um tamanho de 200 kDa, ancorada a membranas do parasita através de GPI e processada em tamanhos menores no esquizonte maduro (revisado em Holder et al., 1992). Durante a invasão, grande parte de msp1 é clivada e apenas um fragmento de 19 kDa é mantido ligado à membrana plasmática do parasita (Blackman et al., 1990). Durante a fase de trofozoíto, a proteína msp1 é endocitada e passa a colocalizar com a membrana do vacúolo parasitóforo (Dluzewski et al., 2008). Em nosso experimento de imunofluorescência, observamos que o anticorpo anti-msp1 identifica preferencialmente uma proteína na periferia do parasita nas fases de esquizonte, merozoíto e anel, proteína que passa a localizar-se no entorno do vacúolo parasitóforo na fase de trofozoíto (**Figuras 8 e 9**). Assim sendo, temos evidência que o anticorpo anti-msp1 utilizado no ensaio de imunofluorescência esteja efetivamente reconhecendo a proteína msp1.

A localização subcelular diferencial de pfsr10 durante as fases intraeritrocíticas é interessante do ponto de vista funcional, sugerindo que pfsr10 pode participar de diferentes processos durante diferentes fases eritrocíticas do parasita.

5.1.2 Anticorpo anti-pfsr10: invasão e desenvolvimento intraeritrocítico de *P. falciparum*

Alguns anticorpos contra 7-TMR podem funcionar como agonistas (By et al., 2009; Elies et al., 1998; Lebesgue et al., 1998) ou antagonistas (Goetzl et al., 2004) desses receptores, ou seja, podem aumentar ou diminuir a atividade de 7-TMR. Além disso, anticorpos podem impedir que proteínas de membrana do parasita reconheçam ligantes da célula hospedeira durante a invasão. Esse é o caso para anticorpos anti-msp1, que impedem invasão de hemácias por merozoítos de *P. falciparum* (Moss et al., 2012). Como pfsr10 é expresso na superfície de merozoítos (**Figura 8**), forma infectiva de hemácias, decidimos incubar fases maduras do parasita com pfsr10 e observar se havia efeito sobre a invasão. Porém não observamos diferença estatística de parasitemia ou distribuição de fases em nenhuma condição de incubação (**Figura 12**). Assim sendo, esse experimento não nos ofereceu evidências de um eventual envolvimento de pfsr10 no processo de invasão de hemácias pelo parasita. O resultado não exclui a possibilidade de pfsr10 ter um papel neste processo, uma vez que o anticorpo pode estar interagindo com uma região que não é importante para a atividade do receptor.

5.1.3 Expressão de *pfsr10* em sistema heterólogo

A dificuldade em expressar receptores serpentinos em sistema heterólogo é conhecida (revisado em Dunham e Hall, 2009). Muitos receptores serpentinos transfectados não localizam com a membrana plasmática, sendo retidos na via exocítica (revisado em Dunham e Hall, 2009). Diversas estratégias são utilizadas para melhorar a localização de receptores com a membrana plasmática, incluindo coexpressão com chaperonas, remoção de parte da sequência da proteína ou adição de um peptídeo sinal à proteína (revisado em Dunham e Hall, 2009). Outro problema enfrentado ao se expressar proteínas em sistema heterólogo, particularmente proteínas de membrana, é conseguir que a proteína adquira uma conformação nativa.

No caso de *pfsr10*, experimentos de *western blot* são capazes de detectar a proteína em extratos celulares, porém há também a detecção de diversas bandas inespecíficas (resultados não mostrados). Importante mencionar que o anticorpo utilizado nesse caso, anti-flag, é monoclonal e altamente específico. Além disso, o plasmídeo utilizado para expressar *pfsr10* em sistema heterólogo possui um promotor de expressão forte. Assim, o esperado seria que *pfsr10* fosse detectado em experimentos de *western blot* como banda única. Como este não é o caso, é possível hipotetizar que grande parte de *pfsr10* sintetizado seja degradado. Para comprovar, indubitavelmente, que *pfsr10* é expresso em sistema heterólogo no tamanho esperado, imunoprecipitamos *pfsr10*, o que promoveu um enriquecimento do receptor putativo, e executamos o *western blot* a partir da imunoprecipitação, utilizando dois anticorpos diferentes, direcionados para as porções N- e C- terminal de *pfsr10*. Os resultados são claros em mostrar que *pfsr10* é expresso em HEK293T no tamanho predito (**Figura 15**).

Quanto à localização subcelular de *pfsr10*, observamos que parte da proteína é intracelular, porém também podemos concluir, objetivamente, através de colocalização de *pfsr10* com aglutinina fluorescente, que parte do receptor putativo é translocado para a membrana plasmática (**Figura 14**).

Os resultados de expressão em sistema heterólogo possibilitaram prosseguir para experimentos de caracterização funcional do receptor serpentino putativo.

5.1.4 Ensaios de $[Ca^{2+}]_{cit}$ com nucleotídeos em células HEK293T-PFSR10+G α_{15}

A proteína pfsr10 possui sete domínios transmembrânicos, um peptídeo sinal preditos *in silico* e um domínio da família de receptor serpentino de pulmão (Madeira et al., 2008). Essas observações permitem considerar pfsr10 um bom candidato a receptor de sete domínios transmembrânicos, que são classicamente acoplados a proteína G (revisado em Lefkowitz, 2007). Interessantemente, *P. falciparum* não possui proteína G predita em seu genoma através de análise de similaridade, porém existem evidências experimentais de que proteínas G existam no parasita (Dyer e Day 2000). Além disso, novas vias de sinalização independentes de proteína G e ativadas por receptores serpentinicos vêm sendo descritas (revisado em Lefkowitz, 2007).

A fim de caracterizar funcionalmente pfsr10, utilizamos um ensaio fluorimétrico de detecção da concentração do segundo mensageiro intracelular cálcio, detectando o aumento do íon após a adição de agonistas.

Estudos demonstraram a importância de nucleotídeos na invasão de células hospedeiras por *Plasmodium* (Levano-Garcia et al., 2010; Ono et al., 2008) e no aumento de atividade proteolítica e cálcio intracelular (da Cruz et al., 2012). Decidimos, assim, selecionar nucleotídeos entre os agonistas utilizados para caracterização funcional de pfsr10. Interessantemente, em células de mamíferos cotransfectadas com PFSR10 e G α_{15} observamos aumento de cálcio citosólico estatisticamente maior em relação aos controles, quando estimulamos células com ATP, GTP e UTP (**Figura 16 D**). Na ausência de cálcio extracelular ou em transfecções apenas com PFSR10, a diferença estatística não foi observada (**Figura 16 D**), sugerindo influxo de cálcio a partir do meio extracelular e participação de proteína G na transdução de sinal de pfsr10. Além disso, adenosina não foi capaz de promover aumento de cálcio na transfecção com PFSR10 e G α_{15} na presença de cálcio extracelular (**Figura 16 D**). Há evidências de que *Plasmodium falciparum* possua receptores purinérgicos, ativados por ATP e UTP e dependentes de cálcio extracelular, o que sugere a presença de receptores purinérgicos do tipo canal com farmacologia parecida a pfsr10 (Levano-Garcia et al., 2010).

Como a linhagem celular HEK293T possui uma alta resposta endógena a nucleotídeos, decidimos transfectar PFSR10 na linhagem celular 1321N1, comumente utilizada para ensaios com receptores purinérgicos por possuir baixa resposta endógena a nucleotídeos (Filtz et al., 1994). Não observamos aumento de cálcio em resposta a ATP quando transfectamos PFSR10 e

$G\alpha_{15}$ nessas células (**Figura 18**), porém tampouco observamos localização de pfsr10 com a membrana plasmática em 1321N1, e a expressão de pfsr10 era baixa (**Figura 18**). É possível que pfsr10 seja tóxico a essas células ou que o dobramento de pfsr10 não ocorra de maneira correta, levando à degradação do receptor.

Podemos hipotetizar dois mecanismos funcionais para pfsr10: o receptor serpentino putativo poderia ligar nucleotídeos e ativar uma proteína G, que levaria à ativação de canais de cálcio de membrana plasmática endógenos (**Figura 37 A**) ou pfsr10 poderia ser um canal de cálcio de membrana plasmática aberto por nucleotídeos (**Figura 37 B**). Quando analisamos a segunda hipótese, poderíamos, em um primeiro momento, tentar classificar pfsr10 como um receptor purinérgico do tipo P2X (revisado em Burnstock, 2007). Porém, receptores desse tipo não apresentam resposta a UTP (revisado em Burnstock, 2007), ao passo que pfsr10 apresenta resposta ao nucleotídeo, o que credita pfsr10 a ser incluído em uma nova classe de receptores.

É especialmente interessante pfsr10 gerar aumento de cálcio intracelular a partir do meio extracelular e, ao mesmo tempo, ter atividade dependente de $G\alpha_{15}$. Em *Drosophila*, foi identificado um receptor olfativo de sete domínios transmembrana que possui atividade ionotrópica e, ao mesmo tempo, gera segundos-mensageiros através de proteína G (Wicher et al., 2008). A atividade ionotrópica desse receptor é dependente de um parceiro molecular que possui topologia de receptor de sete domínios transmembrânicos invertida e independente de GTP (Wicher et al., 2008).

Por fim, ensaios de *binding* com ATP em pfsr10 são interessantes para dar suporte aos ensaios funcionais, bem como ensaios de eletrofisiologia, que poderão oferecer evidências sobre uma eventual natureza ionotrópica de pfsr10. Para tanto, conseguir a expressão de pfsr10 em um sistema sem receptores purinérgicos endógenos é fundamental.

Figura 37 - Hipóteses sobre a natureza molecular de pfsr10.

A: pfsr10 como um receptor de sete domínios transmembrânicos ativado por ATP, ligado a proteína $G\alpha$ que ativa um canal edógeno de cálcio de membrana plasmática em células HEK293T. **B:** pfsr10 como um canal de membrana dependente de proteína $G\alpha$, aberto por ATP. E: meio extracelular, I: meio intracelular, $G\alpha_{15}$: proteína G, subunidade α_{15} (promíscua). O traço verde representa a membrana plasmática.

5.1.5 Fosforilação em HEK293T-PFSR10+ $G\alpha_{15}$

O processo de fosforilação de proteínas é universalmente utilizado para alterar atividade enzimática, ligação a parceiros moleculares e localização celular (revisado em Tan, 2011). A fosforilação de proteínas é utilizada em vias de transdução de sinal, nas quais a dessensibilização de receptores (Lefkowitz, 2007) modulação da abertura de canais iônicos (Scheuer, 2011) ativação de fatores de transcrição (Chang Foreman et al., 2012) entre outros podem ser reguladas por fosforilação.

Quando PFSR10 e $G\alpha_{15}$ foram cotransfectados em células HEK293T observou-se um aumento na fosforilação basal de algumas proteínas da célula (**Figura 21 A, B**). É conhecido que receptores serpentinicos oscilam entre diversas conformações, algumas ativas e outras inativas, possuindo, portanto, atividade constitutiva. Conformações ativas são estabilizadas através da ligação de agonistas (revisado em Vauquelin e Van Liefde, 2005). O aumento da fosforilação basal de proteínas após cotransfecção de PFSR10 e $G\alpha_{15}$ sugere que o candidato a receptor serpentino PFSR10 possa ter uma atividade basal. Por outro lado, é conhecido que ATP pode ser liberado de células através da lise das mesmas (revisado em Burnstock e Verkhratsky, 2009) e, portanto, não se pode excluir que ATP tenha estimulado a maior fosforilação de proteínas em células HEK293T-PFSR10+ $G\alpha_{15}$.

Quando estimulamos com ATP células HEK293T-PFSR10+G α_{15} observamos que o aumento de fosforilação dessas células, em alguns casos, tem tendência a ser menor que o aumento de fosforilação de células transfectadas com HEK293T-vazio+G α_{15} (**Figura 20 A**, **Figura 20 B**, banda entre 130 kDa e 170 kDa). Como já existe uma fosforilação basal maior em células HEK293T-PFSR10+G α_{15} em relação a células HEK293T-vazio+G α_{15} (**Figura 21**), pode-se sugerir que o número de sítios disponíveis para fosforilação no primeiro caso são menores, o que impede um grande aumento na fosforilação nesse caso.

As bandas selecionadas para análise de fosforilação provavelmente incluem mais de uma proteína, pois o SDS-PAGE foi corrido em apenas uma dimensão. Assim, não é possível identificar a identidade molecular das proteínas fosforiladas. Como havia indicação de que a cotransfecção de PFSR10 e G α_{15} causa aumento de fosforilação de proteínas e de que MAPKs são fosforiladas via ativação de receptores serpentinicos (revisado em Seger e Krebs 1995) decidimos verificar se MAPKs eram ativadas pela cotransfecção de PFSR10 e G α_{15} e estímulo com ATP. Porém, não foi detectada fosforilação evidente de MAPKs em nenhuma das condições (**Figura 22**). É conhecido que a fosforilação de MAPKs ativado via proteína G é transiente e esperada durante os primeiros minutos de estímulo (Shenoy et al., 2006). Assim sendo, o estímulo de 10 minutos pode ter sido demasiado para detectar fosforilação da MAPK. Por outro lado, a fosforilação de MAPK via beta arrestina ocorre após os primeiros minutos de estímulo (Shenoy et al., 2006) e nesse caso deveria ser observada no experimento. Nossos dados não oferecem evidências de que MAPKs sejam ativadas pela cotransfecção de PFSR10 e G α_{15} ou pelo estímulo com ATP em células HEK293T.

As quinases e fosfatases de *P. falciparum* são diferentes daquelas expressas em células de mamíferos. Porém, a capacidade de pfsr10 aumentar a fosforilação em células transfectadas (**Figura 21**) é um indicativo de que o receptor esteja envolvido na promoção de fosforilação no parasita.

5.1.6 Imunoprecipitação de candidatos a parceiros moleculares de pfsr10 em *P. falciparum*

Com a finalidade de identificar parceiros moleculares de pfsr10, imunoprecipitamos o candidato a receptor serpentino utilizando anticorpo anti-pfsr10 e comparamos as proteínas identificadas com as proteínas obtidas em um controle negativo. A imunoprecipitação de

candidatos a parceiros moleculares de pfsr10 sugere que o receptor pode interagir com um grande número de proteínas de diversas funções celulares (**Tabela 2, Tabela 3**). Não é surpreendente a identificação de proteínas tão diversas, pois para a imunoprecipitação foram utilizadas fases de trofozoíto, esquizonte jovem e esquizonte maduro, fases que estão comprometidas com diferentes processos celulares, como crescimento, divisão celular, evasão da célula hospedeira e invasão da célula hospedeira. Além disso, o grande número de proteínas identificadas também poderia ser explicado por interações indiretas de pfsr10 com alguns dos candidatos.

As proteínas identificadas puderam ser divididas em subgrupos de acordo com o processo celular em que participam. As diversas proteínas relacionadas com tradução de RNA encontradas são comuns à síntese de proteínas e espera-se que interajam com pfsr10.

As chaperonas encontradas ajudam no dobramento de diversas classes de proteínas, incluindo fatores de transcrição, receptores nucleares e proteínas relacionadas a via secretória (revisado em Taipale et al., 2010). Como o processo de dobramento de proteínas é geral, a coimunoprecipitação de chaperonas e pfsr10 não é surpreendente.

Proteínas relacionadas com os processos celulares de endocitose, exocitose, invasão e estabelecimento na célula hospedeira chamam atenção, por serem associados especificamente com proteínas exportadas. Existem fortes indícios de que o receptor serpentina putativo pfsr10 entra na via de exportação de proteínas, pois possui um peptídeo sinal e sete domínios transmembrânicos (Madeira et al., 2008). Além disso, o uso de Brefeldina A retém a exportação de pfsr10 (**Figura 11**), sugerindo que a proteína trafega via retículo endoplasmático. Existem também evidências de que pfsr10 possa interagir com proteína relacionada à ubiquitinação. A ubiquitinação de receptores serpentinicos é um processo comum para dessensibilização da via clássica de sinalização através de proteína G e promove a endocitose dos receptores, levando à ativação de outras vias de sinalização em mamíferos (revisado em Lefkowitz, 2007). Importante mencionar que a proteína Rab5a, relacionada com tráfego de proteínas para o endossomo inicial, é um candidato a parceiro molecular de pfsr10. O receptor pode seguir dois caminhos: ser deubiquitinado e reciclado para a membrana plasmática ou degradado via lisossomo (revisado em Hislop e von Zastrow, 2011). Por outro lado, a ubiquitinação possui várias outras funções celulares, como degradação de proteínas com dobramento incorreto, também uma possibilidade para a ubiquitinação do receptor. É interessante notar que pfsr10 colocaliza com a membrana do parasita nas fases de anel e merozoíto de *P. falciparum* e parece ter localização intracelular

durante trofozoítos e esquizontes (**Figuras 8 e 9**), sugerindo que a exista efetivamente endocitose de pfsr10 entre as fases de anel e trofozoíto.

Proteínas com função predita de saída e invasão de eritrócitos por *P.falciparum* (EBA175, M18 aspartil amiopeptidase, RESA, Miosina A, CDPK1, SERA-6, RON-4, RON-5, **Tabela 2 e Tabela 3**) são candidatas interessantes à interação com pfsr10, já que outras observações nos permitem hipotetizar que pfsr10 possa estar relacionado à função de invasão. O processo de invasão de eritrócitos por merozoítos de *P. falciparum* é dependente de ATP (Levano-Garcia et al., 2010) e existem evidências de que pfsr10 participe na via de transdução de sinal induzida pelo nucleotídeo (**Figura 16**). A proteína CDPK1, em particular, é um efetor da via do cálcio, que é aumentado no citosol do parasita após adição de ATP extracelular.

Utilizando um anticorpo anti-pfsr10, não obtivemos evidências de que pfsr10 estivesse relacionado à invasão (**Figura 12**). Apesar disso, não se pode concluir o contrário, já que a porção da proteína a que anti-pfsr10 se liga pode não ser essencial para o processo de invasão de eritrócitos.

Por fim, é importante evidenciar que o método utilizado para a imunoprecipitação de parceiros moleculares de pfsr10 foi bastante adstringente. Apesar disso, é provável que algumas das proteínas candidatas a interação com pfsr10 sejam falsos positivos. Esse pode ser o caso de algumas proteínas nucleares relacionadas à transcrição ou replicação do DNA como helicases e ligases, já que a proteína pfsr10 não colocaliza com o núcleo. Uma possibilidade é que essas proteínas tenham sido imunoprecipitadas devido a sua grande abundância celular.

Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de que fatores de transcrição possam ser translocados para o núcleo a partir do citosol. Para separar falsos positivos de interações reais é importante que seja executada a imunoprecipitação das proteínas candidatas com anticorpos específicos com posterior *western blot* do imunoprecipitado utilizando anticorpo anti-pfsr10.

Em resumo, nós identificamos algumas proteínas que podem interagir com pfsr10. Esta identificação e a validação destes parceiros podem resultar em um melhor entendimento sobre a atividade deste receptor e também um quadro mais completo sobre a sua função celular e/ou regulação.

5.1.7 Imunoprecipitação de parceiros moleculares de *pfsr10* em *P. falciparum* após estímulo com ATP

Como temos evidência de que *pfsr10* esteja envolvido na sinalização via ATP (**Figura 16**), decidimos verificar se algum fator de *P. falciparum* era capaz de interagir com *pfsr10* após estímulo com o nucleotídeo, utilizando para tanto fases maduras do parasita isoladas da célula hospedeira.

Esperávamos observar bandas presentes no tratamento com ATP e ausentes no controle negativo, porém isso não foi observado (**Tabela 4**). Uma possibilidade é a de que durante a lise dos eritrócitos para isolar parasitas, ATP tenha sido liberado do citosol da célula hospedeira estimulando ambos os grupos de parasitas (experimental e controle negativo) e diminuindo o poder da análise. Apesar disso, uma proteína de função desconhecida (número de acesso do PlasmoDB PF14_0191) foi enriquecida no tratamento com ATP (**Tabela 4**). A proteína hsp70 (número de acesso do PlasmoDB PF08_0054) também é uma candidata para interação com *pfsr10* após estímulo com ATP, já que o número de peptídeos identificados é duas vezes maior no tratamento com o nucleotídeo em relação ao controle negativo (**Tabela 4**). Não é clara a razão pela qual a interação entre *pfsr10* e hsp70 seja aumentada após estímulo com ATP. Por outro lado, deve-se ter em mente que para um 7-TMR transmitir um sinal extracelular para dentro da célula ele deve ser transportado para a superfície celular. Já foi demonstrado que o processamento de 7-TMR é influenciado por diversas proteínas acessórias (revisado em Tan et al., 2004), sendo que algumas destas proteínas têm função de chaperona. Tem-se tornado evidente que hsp70 desempenha uma importante função no transporte de 7-TMR para a membrana celular (Neuhaus et al., 2006). Estes dados sugerem que estas proteínas podem estar desempenhando função semelhante para o correto transporte de *pfsr10*.

5.2 Receptor serpentino putativo PFSR25

5.2.1 Expressão de *pfsr25* em *P. falciparum*

Os resultados de expressão em *Plasmodium falciparum* para *pfsr25* demonstram claramente que o receptor putativo é expresso principalmente nas fases intraeritrocíticas de

trofozoíto e esquizonte (**Figura 25** e **Figura 26**). Assim sendo, é provável que pfsr25 exerça suas funções durante esses estágios de desenvolvimento. Além disso, pfsr25 colocaliza parcialmente com a membrana plasmática de fases maduras de *Plasmodium falciparum* (**Figura 27**), o que está de acordo com o predito pela análise *in silico*, que identificou um peptídeo sinal em pfsr25 (Madeira et al., 2008).

5.2.2 Anticorpo anti-pfsr25 e invasão de hemácias por *P. falciparum*

Tendo em vista que possuímos evidências de que KCl esteja envolvido com a saída de esquizontes de *P. falciparum* de hemácias (**Figura 35**), que pfsr25 está envolvido com a percepção de KCl (**Figura 34 H**) e que anticorpos podem interferir com atividade de receptores (By et al., 2009; Elies et al., 1998; Goetzl et al., 2004; Lebesgue et al., 1998) resolvemos verificar se o anticorpo anti-pfsr25 poderia influenciar na progressão do ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (**Figura 28**).

Os resultados obtidos em esquizontes incubados com anticorpo anti-pfsr 25 não oferecem evidências da importância do receptor putativo no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (**Figura 28**). Porém, é necessário considerar que o epítipo utilizado como indutor do anticorpo pode não ser essencial para a função de pfsr25.

5.2.3 Expressão de pfsr25 em sistema heterólogo

Apesar dos problemas comumente enfrentados para expressar receptores serpentinicos em sistema heterólogo, como exportação fraca para a membrana plasmática e dobramento incorreto da proteína, observamos que há colocalização parcial de pfsr25 com a membrana plasmática de células HEK293T (**Figura 30**), bem como o tamanho predito de pfsr25, de aproximadamente 40 kDa, foi observado em experimentos de imunoprecipitação com posterior detecção através de *western blot* (**Figura 31**). Os resultados possibilitaram prosseguir com a caracterização funcional de pfsr25.

5.2.4 Ensaios de cálcio em células HEK293T transfectadas com PFSR25 e estimuladas com KCl

A importância do KCl no ciclo de vida de *P. falciparum* foi reportada por diferentes grupos (Kumar et al., 2007; Ono et al., 2008; Singh et al., 2010). KCl é capaz de aumentar a infectividade de hepatócitos por esporozoítos (Kumar et al., 2007; Ono et al., 2008). Além disso, os inibidores de canais de potássio de membrana plasmática cloroquina e TEA inibem o aumento da invasão de hepatócitos por esporozoítos, mostrando que canais iônicos de membrana plasmática estão envolvidos no processo (Kumar et al., 2007). Em outro parasita do filo Apicomplexa, *Toxoplasma gondii*, a diminuição da concentração de KCl na célula hospedeira é responsável pela ruptura da mesma pelo parasita, processo que depende de cálcio intracelular e fosfolipase C (Fruth e Arrizabalaga, 2007; Moudy et al., 2001).

Nossos experimentos em sistema heterólogo demonstraram que pfsr25 está envolvido com a percepção de KCl extracelular (**Figura 32 A, E**). Além disso, o sinal de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em células HEK293T-PFSR25 promovido por KCl é dependente de influxo de cálcio extracelular e de canais iônicos de cálcio e/ou potássio na membrana plasmática (**Figura 32 C-E**).

Os experimentos com parasitas nocaute para PFSR25 indicam fortemente que pfsr25 seja um sensor de KCl (**Figura 34 H**), porém o exato mecanismo de ativação do receptor não foi definido através dos experimentos de dinâmica de $[Ca^{2+}]_{cit}$ em sistema heterólogo.

Não seria surpreendente que pfsr25 fosse um receptor serpentina que tivesse como ligante o íon potássio (**Figura 38 A, B**). Existem receptores serpentina de íons, como o receptor serpentina sensor de cálcio, que pode ser ativado por diversos cátions divalentes (revisado em Magno et al., 2011). Além disso, pode-se hipotetizar que pfsr25 seja ativado por uma despolarização induzida pela entrada de K^+ a partir do meio extracelular (**Figura 38 C, D**). Existe ao menos um exemplo de receptor serpentina ativado através dessa maneira: o receptor muscarínico do subtipo 3 é capaz de ser ativado por despolarização de membrana, transduzindo o sinal através de uma proteína G e promovendo aumento de cálcio a partir de estoques internos (Liu et al., 2009).

Receptores serpentina também podem levar à abertura de canais iônicos, independentemente de proteína G, seja através de interação e ativação de canais endógenos

(Figura 38 A, C) ou formando, por si sós (Figura 38 B, D), canais iônicos ativados por um ligante (Wicher et al., 2008).

Existem, portanto, diversas possibilidades para a natureza molecular de pfsr25 (Figura 38 A-D). Para explorar a eventual natureza ionotrópica de pfsr25 fazem-se necessários experimentos de eletrofisiologia. Experimentos de *binding* poderão indicar se pfsr25 liga K^+ . Esses experimentos são muito interessantes, pois possibilitam a melhor compreensão da sinalização de *Plasmodium*.

Figura 38 - Hipóteses para o mecanismo de ativação de pfsr25.

A: pfsr25 teria K^+ como ligante e ativaria um canal endógeno de cálcio de membrana plasmática. **B:** pfsr25 seria um canal de cálcio aberto pelo ligante K^+ . **C:** pfsr25 seria ativado pela despolarização da membrana plasmática e ativaria um canal endógeno de cálcio de membrana plasmática. **D:** pfsr25 seria um canal de cálcio ativado pela despolarização da membrana plasmática. E: meio extracelular, I: meio intracelular. O traço verde representa a membrana plasmática.

5.2.5 Sinalização de KCl em parasitas intraeritrocíticos

Durante o desenvolvimento intraeritrocítico, *P. falciparum* é submetido a concentrações variáveis de potássio (Mauritz et al., 2010; Staines et al., 2001). No estágio inicial do desenvolvimento do parasita no interior do eritrócito, a concentração de K^+ no citosol do eritrócito é alta (~140 mM), e a concentração de Na^+ é baixa (~5 mM, Mauritz et al., 2010). Durante o desenvolvimento intraeritrocítico do parasita, o citosol do eritrócito progressivamente perde K^+ e ganha Na^+ devido a um aumento da permeabilidade da membrana plasmática do eritrócito, induzida pelo parasita (Staines et al., 2001). O parasita intraeritrocítico se encontra separado do citosol do eritrócito através da membrana do vacúolo parasitóforo, que é permeável a moléculas grandes (Desai et al., 1993). Assim, é provável que o ambiente iônico do citosol do eritrócito possa ser percebido pelo parasita.

Em parasitas na fase de trofozoíto maduro, KCl promove um aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ dependente de PLC a partir de estoques internos de cálcio (**Figura 34 A-G**). O aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ provocado por KCl também é dependente do receptor putativo pfsr25 (**Figura 34 H**). Em experimentos em sistema heterólogo, pfsr25 parece se acoplar a uma maquinaria de sinalização que promove aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ a partir do meio extracelular (**Figura 32**), o que contrasta com os experimentos em parasitas *P. falciparum*. Porém a diferença não é completamente inesperada, já que diferentes proteínas relacionadas com transdução de sinal são expressas por diferentes células (revisado em Berridge et al., 2003). As diferenças na expressão de proteínas relacionadas à transdução de sinal podem ser ainda mais exacerbadas quando se considera a distância filogenética entre células de mamíferos e *Plasmodium*.

Quando incubamos o parasita em um meio rico em KCl (142 mM), isso provoca uma redução da proporção de fases maduras e um aumento da proporção de fases jovens (**Figura 35 A**). Em conjunto, esses dados indicam que KCl é importante no processo da saída de parasitas maduros de hemácias. Apesar disso, a saída de parasitas de eritrócitos provocada por KCl pode ser prematura, já que existe uma queda na parasitemia (**Figura 35 B**).

Singh et al. (2010) demonstraram que uma queda na concentração extracelular de KCl promove a mobilização da maquinaria celular de *P. falciparum* responsável pela invasão de eritrócitos. Nossos dados sugerem que, durante o ciclo intraeritrocítico, KCl participa na

promoção da saída de parasitas das hemácias. O fato de parasitas nocaute para PFSR25 serem viáveis indica que existam mecanismos redundantes para as funções que pfsr25 desempenha.

5.2.6 Imunoprecipitação de candidatos a parceiros moleculares de pfsr25 em *P. falciparum*

Com a finalidade de identificar parceiros moleculares de pfsr25, imunoprecipitamos o candidato a receptor serpentina utilizando anticorpo anti-pfsr25 e comparamos as proteínas identificadas com as proteínas obtidas em um controle negativo. A imunoprecipitação de candidatos a parceiros moleculares de pfsr25 sugere que o receptor pode interagir com um grande número de proteínas de diversas funções celulares (**Tabela 6, Tabela 7**). Esse grande número de proteínas encontradas não é surpreendente, dado que foram utilizadas culturas que continham estágios de trofozoítos e esquizontes na imunoprecipitação, que possuem diferente expressão proteica.

Algumas proteínas puderam ser agrupadas de acordo com funções em processos celulares comuns. Alguns desses processos são gerais para proteínas, como dobramento proteico (Taipale et al., 2010). Proteínas identificadas relacionadas com outros processos, como endocitose e exocitose são bons candidatos para interação com pfsr25, já que pfsr25 deve passar pela via de exportação proteica (Madeira et al., 2008). Proteínas relacionadas com endocitose de pfsr25 são particularmente interessantes, já que endocitose é um processo de dessensibilização, ativação de outras vias de sinalização (revisado em Lefkowitz, 2007) ou mesmo degradação. Nesse último sentido, é importante notar que uma subunidade do proteossomo também foi encontrada na imunoprecipitação.

Proteínas relacionadas com o rompimento do eritrócito durante a saída de merozoítos são de particular interesse como bons candidatos a parceiros de pfsr25, já que temos evidências de que KCl promove um aumento de cálcio via pfsr25 em *P. falciparum* e também provoca evasão de parasitas de eritrócitos (**Figura 34, Figura 35**). A proteína M18 aspartil amiopeptidase, responsável pela fragilização da espectrina na saída de parasitas do eritrócito pode ser incluída nessa categoria.

As duas proteínas serina/tirosina fosfatases identificadas podem exercer funções de regulação da atividade enzimática de outras proteínas. Proteínas fosfatase podem estar envolvidas

em vias de transdução de sinal, ligadas a outros componentes de sinalização, como receptores, via proteínas adaptadoras (Berridge, 2012).

É provável que muitos dos candidatos a interação com pfsr25 identificados sejam falsos positivos, apesar do método adstringente utilizado na imunoprecipitação. Para separar falsos positivos de interações reais é importante que seja executada a imunoprecipitação das proteínas candidatas com anticorpos específicos com posterior *western blot* do imunoprecipitado utilizando anticorpo anti-pfsr25.

6 CONCLUSÕES

Os receptores serpentinicos putativos pfsr10 e pfsr25 são expressos ao longo do ciclo eritrocítico. O receptor pfsr10 colocaliza com a membrana plasmática do parasita principalmente na fase de merozoíto e fases intraeritrocíticas jovens. PFSR25 colocaliza com a membrana plasmática do parasita em fases intraeritrocíticas maduras.

Ambos receptores possuem parceiros moleculares putativos que participam em funções celulares como invasão e saída de eritrócitos, estabelecimento no eritrócito infectado, endocitose e exocitose.

Em sistema heterólogo (células HEK293T), pfsr10 e pfsr25 colocalizam parcialmente com a membrana plasmática o que possibilita ensaios funcionais.

Ensaio em sistema heterólogo demonstraram que PFSR10 participa na percepção de ATP extracelular, enquanto PFSR25 é um sensor de KCl. Para PFSR25, experimentos com parasitas PFSR25 nocaute demonstram que o aumento de cálcio intracelular causado por KCl é abolido, o que corrobora a hipótese da função de PFSR25 como sensor de KCl.

No caso do receptor putativo pfsr10, conseguir a expressão em um sistema heterólogo sem receptores purinérgicos endógenos é importante para claramente caracterizar ATP como um ligante para pfsr10.

Tendo em vista que existem poucos estudos sobre a função de 7-TMR em *Plasmodium*, diversas direções foram tomadas na tentativa de entender a importância de receptores serpentinicos no ciclo celular do parasita. As evidências acumuladas apontam para uma nova função para estes receptores dentro do ciclo intraeritrocítico do parasita. Portanto, os resultados abrem novos caminhos para o entendimento sobre os mecanismos de desenvolvimento de *P. falciparum* e também na interação parasita hospedeiro.

REFERÊNCIAS*

Acconcia F, Sigismund S, Polo S. Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res*. 2009;315(9):1610-8.

Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP, Conzelmann C, Methogo BG, Doucka Y, Flamen A, Mordmuller B, Issifou S, Kremsner PG, Sacarlal J, Aide P, Lanaspá M, Aponte JJ, Nhamuave A, Quelhas D, Bassat Q, Mandjate S, Macete E, Alonso P, Abdulla S, Salim N, Juma O, Shomari M, Shubis K, Machera F, Hamad AS, Minja R, Mtoro A, Sykes A, Ahmed S, Urassa AM, Ali AM, Mwangoka G, Tanner M, Tinto H, D'Alessandro U, Sorgho H, Valea I, Tahita MC, Kabore W, Ouedraogo S, Sandrine Y, Guiguemde RT, Ouedraogo JB, Hamel MJ, Kariuki S, Odero C, Oneko M, Otieno K, Awino N, Omoto J, Williamson J, Muturi-Kioi V, Laserson KF, Slutsker L, Otieno W, Otieno L, Nekoye O, Gondi S, Otieno A, Ogutu B, Wasuna R, Owira V, Jones D, Onyango AA, Njuguna P, Chilengi R, Akoo P, Kerubo C, Gitaka J, Maingi C, Lang T, Olotu A, Tsofa B, Bejon P, Peshu N, Marsh K, Owusu-Agyei S, Asante KP, Osei-Kwakye K, Boahen O, Ayamba S, Kayan K, Owusu-Ofori R, Dosoo D, Asante I, Adjei G, Adjei G, Chandramohan D, Greenwood B, Lusingu J, Gesase S, Malabeja A, Abdul O, Kilavo H, Mahende C, Liheluka E, Lemnge M, Theander T, Drakeley C, Ansong D, Agbenyega T, Adjei S, Boateng HO, Rettig T, Bawa J, Sylverken J, Sambian D, Agyekum A, Owusu L, Martinson F, Hoffman I, Mvalo T, Kamthunzi P, Nkomo R, Msika A, Jumbe A, Chome N, Nyakuipa D, Chintedza J, Ballou WR, Bruls M, Cohen J, Guerra Y, Jongert E, Lapierre D, Leach A, Lievens M, Ofori-Anyinam O, Vekemans J, Carter T, Lebouilleux D, Loucq C, Radford A, Savarese B, Schellenberg D, Sillman M, Vansadia P. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med*. 2011;365(20):1863-75.

Akkaya C, Shumilina E, Bobballa D, Brand VB, Mahmud H, Lang F, Huber SM. The *Plasmodium falciparum*-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. *Pflugers Arch*. 2009;457(5):1035-47.

Alves E, Bartlett PJ, Garcia CR, Thomas AP. Melatonin and IP₃-induced Ca²⁺ release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. *J Biol. Chem.*. 2011;286(7):5905-12.

Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Menard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Med*. 2006;12(2):220-4.

Arnold JD, Berger AE, Martin DC. Role of the endocrine system in controlling growth and division synchrony of *Plasmodium berghei* in mice. *J Parasitol*. 1969;55(5):956-62.

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

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

- Bagnaresi P, Markus RP, Hotta CT, Pozzan T, Garcia CR. Desynchronizing *Plasmodium* Cell Cycle Increases Chloroquine Protection at Suboptimal Doses. *Open Parasitol J.* 2008;2:55-8.
- Bagnaresi P, Rodrigues MT, Garcia CR. Calcium signaling in lizard red blood cells. *Comp Biochem Physiol.* 2007;147(3):779-87.
- Bannister L, Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol.* 2003;19(5):209-13.
- Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol.* 2005;170(4):551-7.
- Beraldo FH, Garcia CR. Products of tryptophan catabolism induce Ca^{2+} release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res.* 2005; 39(3): 224-30.
- Beraldo FH, Mikoshiba K, Garcia CR. Human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the *P. falciparum* cell cycle. *J Pineal Res.* 2007;43(4):360-4.
- Beraldo FH, Sartorello R, Lanari RD, Garcia CR. Signal transduction in red blood cells of the lizards *Ameiva ameiva* and *Tupinambis merianae* (Squamata, Teiidae). *Cell Calcium.* 2001;29(6):439-45.
- Berridge MJ. The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Foundation Symposium* 2001;239:52-64; discussion -7, 150-9.
- Berridge MJ. *Cell Signalling Biology*. London: Portland Press; 2012.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev.* 2003;4(7):517-29.
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B, Brinkmann V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* 2004;117(4):503-14.
- Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med.* 1990;172(1):379-82.
- Boyd GH. Induced variations in the asexual cycle of *Plasmodium cathemerium*. *Am J Trop Med Hyg.* 1929; 9:181-7.
- Brini M. Calcium-sensitive photoproteins. *Methods* 2008;46(3):160-6.

- Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T Rizzuto R. Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). A critical evaluation. *J Biol Chem*. 1995;270(17):9896-903.
- Budu A, Garcia CR. Generation of second messengers in *Plasmodium*. *Microbes Infect*. 2012. In press.
- Budu A, Peres R, Bueno VB, Catalani LH, Garcia CR. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. *J Pineal Res*. 2007;42(3):261-6.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(12):1471-83.
- Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res*. 2008;42(1):3-8.
- Burnstock G, Verkhratsky A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol*. 2009;195(4):415-47.
- By Y, Durand-Gorde JM, Condo J, Lejeune PJ, Mallet B, Carayon P, Guieu R, Ruf J. Production of an agonist-like monoclonal antibody to the human A2A receptor of adenosine for clinical use. *Mol Immun*. 2009;46(3):400-5.
- Callebaut I, Prat K, Meurice E, Mornon JP, Tomavo S. Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes. *BMC Genomics*. 2005;6:100.
- Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(4):564-94.
- Cerione RA, Strulovici B, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Caron MG. Pure beta-adrenergic receptor: the single polypeptide confers catecholamine responsiveness to adenylate cyclase. *Nature*. 1983; 306(5943):562-66.
- Chang Foreman HC, Van Scoy S, Cheng TF, Reich NC. Activation of interferon regulatory factor 5 by site specific phosphorylation. *PloS One*. 2012;7(3):e33098.
- Cheeseman IM, Desai A. Cell division: AAAacking the mitotic spindle. *Curr Biol*. 2004;14(2): R70-2.
- Coulson RM, Hall N, Ouzounis CA. Comparative genomics of transcriptional control in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Res*. 2004;14(8):1548-54.
- Curtidor H, Patino LC, Arevalo-Pinzon G, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Identification of the *Plasmodium falciparum* rhopty neck protein 5 (PfRON5). *Gene* 2011;474(1-2):22-8.

- da Cruz LN, Juliano MA, Budu A, Juliano L, Holder AA, Blackman MJ, Garcia CR. Extracellular ATP triggers proteolysis and cytosolic Ca^{2+} rise in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* malaria parasites. *Malar J*. 2012;11(1):69.
- Daumke O, Lundmark R, Vallis Y, Martens S, Butler PJ, McMahon HT. Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. *Nature*. 2007;449(7164):923-7.
- Desai SA, Krogstad DJ, McCleskey EW. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature*. 1993;362(6421):643-6.
- Dluzewski AR, Ling IT, Hopkins JM, Grainger M, Margos G, Mitchell GH, Holder AA, Bannister LH. Formation of the food vacuole in *Plasmodium falciparum*: a potential role for the 19 kDa fragment of merozoite surface protein 1 (MSP1(19)). *PloS One*. 2008;3(8):e3085.
- Dong C, Filipeanu CM, Duvernay MT, Wu G. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochem Biophys Acta*. 2007;1768(4):853-70.
- 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*. *Eukaryotic Cell*. 2008;7(2):279-85.
- Doyle SM, Wickner S. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(1):40-8.
- Dunham JH, Hall RA. Enhancement of the surface expression of G protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol*. 2009;27(9):541-5.
- Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T, Cowman AF. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(8):4796-801.
- Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*. 1975;187(4178):748-50.
- Dyer M, Day K. Expression of *Plasmodium falciparum* trimeric G proteins and their involvement in switching to sexual development. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110(2):437-48.
- Elies R, Fu LX, Eftekhari P, Wallukat G, Schulze W, Granier C, Hjalmarsen A, Hoebeke J. Immunochemical and functional characterization of an agonist-like monoclonal antibody against the M2 acetylcholine receptor. *FEBS*. 1998;251(3):659-66.
- Farias SL, Gazarini ML, Melo RL, Hirata IY, Juliano MA, Juliano L, Garcia CR. Cysteine-protease activity elicited by Ca^{2+} stimulus in *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;141(1):71-9.

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003;63(3):1256-72.

Filtz TM, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA, Harden TK. Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol Pharmacol*. 1994;46(1):8-14.

Fruth IA, Arrizabalaga, G. *Toxoplasma gondii*: Induction of egress by the potassium ionophore nigericin. *Int J Parasitol*. 2007;37:1559-67.

Garcia CR, Ann SE, Tavares ES, Dluzewski AR, Mason WT, Paiva FB. Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol*. 1998;76(2):133-8.

Garcia CR, Markus RP, Madeira L. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. *J Biol Rhythms*. 2001;16(5):436-43.

Garcia GE, Wirtz RA, Barr JR, Woolfitt A, Rosenberg R. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12003-5.

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

Gazarini ML, Garcia CR. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca^{2+} fluctuations. *BBRC*. 2004;321(1):138-44.

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

Goetzl EJ, Dembrow D, Van Brocklyn JR, Graler MHuang MC. An IgM-kappa rat monoclonal antibody specific for the type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor with antagonist and agonist activities. *Immunol Lett*. 2004;93(1):63-9.

Gonzalez-Maeso J. GPCR oligomers in pharmacology and signaling. *Mol Brain*. 2011;4(1):20.

Grabowsky M. The billion-dollar malaria moment. *Nature*. 2008;451(7182):1051-2.

Green JL, Rees-Channer RR, Howell SA, Martin SR, Knuepfer E, Taylor HM, Grainger M, Holder AA. The motor complex of *Plasmodium falciparum*: phosphorylation by a calcium-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2008;283(45):30980-9.

Guinovart C, Navia MM, Tanner M, Alonso PL. Malaria: burden of disease. *Curr Mol Med*. 2006;6(2):137-40.

Gurevich VV, Gurevich EV. GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *Trends Neurosci*. 2008;31(2):74-81.

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

Hawking F. The clock of the malaria parasite. *Sci Am*. 1970;222(6):123-31.

Heidrich HG, Matzner M, Miettinen-Baumann A, Strych W. Immunoelectron microscopy shows that the 80,000-dalton antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites is localized in the surface coat. *Z Parasitenkd*. 1986;72(5):681-3.

Hislop JN, von Zastrow M. Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors. *Traffic*. 2011;12(2):137-48.

Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, Shai S. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 3:37-42.

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

Kauth CW, Woehlbier U, Kern M, Mekonnen Z, Lutz R, Mucke N, Langowski J, Bujard H. Interactions between merozoite surface proteins 1, 6, and 7 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2006;281(42):31517-27.

Kolakowski Jr LF. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Rec Chann*. 1994;2(1):1-7.

Koyama FC, Ribeiro RY, Garcia JL, Azevedo MF, Chakrabarti D, Garcia CR. Ubiquitin proteasome system and the atypical kinase PfPK7 are involved in melatonin signaling in *Plasmodium falciparum*. *J Pineal Res*. 2012. In press.

Kumar KA, Garcia CR, Chandran VR, Van Rooijen N, Zhou Y, Winzeler E, Nussenzweig V. Exposure of *Plasmodium* sporozoites to the intracellular concentration of potassium enhances infectivity and reduces cell passage activity. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;156(1):32-40.

Kuner T, Li Y, Gee KR, Bonewald LF, Augustine GJ. Photolysis of a caged peptide reveals rapid action of N-ethylmaleimide sensitive factor before neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(1):347-52.

Kutner S, Ginsburg H, Cabantchik ZI. Permselectivity changes in malaria (*Plasmodium falciparum*) infected human red blood cell membranes. *J Cell Physiol*. 1983;114(2):245-51.

- Lagerström MC, Schiöth HB. Structural diversity of G-protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discovery*. 2008;7(4):339-57.
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979;65(3):418-20.
- Lauterbach SB, Coetzer TL. The M18 aspartyl aminopeptidase of *Plasmodium falciparum* binds to human erythrocyte spectrin in vitro. *Malar J*. 2008;7:161.
- Lebesgue D, Wallukat G, Mijares A, Granier C, Argibay J, Hoebeke J. An agonist-like monoclonal antibody against the human beta2-adrenoceptor. *Eur J of Pharm*. 1998;348(1):123-33.
- Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Wahlen EJ. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol Cell*. 2006;24(5):643-52.
- Lefkowitz RJ. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol*. 2007;190(1):9-19.
- Levano-Garcia J, Dluzewski AR, Markus RP, Garcia CR. Purinergic signalling is involved in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* invasion to red blood cells. *Purinergic Signal*. 2010;6(4):365-72.
- Liu QH, Zheng YM, Korde AS, Yadav VR, Rathore R, Wess JWang YX. Membrane depolarization causes a direct activation of G protein-coupled receptors leading to local Ca^{2+} release in smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(27):11418-23.
- Madeira L, Galante PA, Budu A, Azevedo MF, Malnic B, Garcia CR. Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. *PloS One*. 2008;3(3):e1889.
- Magno AL, Ward BK, Ratajczak T. The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr Rev*. 2011;32(1):3-30.
- Marchese A, Paing MM, Temple BRS, Trejo J. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:601-29.
- Mauritz JM, Esposito A, Tiffert T, Skepper JN, Warley A, Yoon YZ, Cicuta P, Lew VL, Guck JR, Kaminski CF. Biophotonic techniques for the study of malaria-infected red blood cells. *Med Biol Eng Comput*. 2010;48(10):1055-63.
- Meissner M, Schluter D, Soldati D. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science*. 2002;298(5594):837-40.
- Millar RP, Nweton CL. The year in G protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol*. 2010;24(1):261-74.

Moore CA, Milano SK, Benovic JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Ann Rev Physiol.* 2007;69:451-82.

Moss DK, Remarque EJ, Faber BW, Cavanagh DR, Arnot DE, Thomas AW, Holder AA. *Plasmodium falciparum* 19-kilodalton merozoite surface protein 1 (MSP1)-specific antibodies that interfere with parasite growth in vitro can inhibit MSP1 processing, merozoite invasion, and intracellular parasite development. *Infect Immun.* 2012;80(3):1280-7.

Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science.* 2001;291(5501):141-4.

Moudy R, Manning TJ, Beckers CJ. The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 2001;276(44):41492-501.

Murphy SC, Fernandez-Pol S, Chung PH, Prasanna Murthy SN, Milne SB, Salomao M, Brown HA, Lomasney JW, Mohandas N, Haldar K. Cytoplasmic remodeling of erythrocyte raft lipids during infection by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood.* 2007;110(6):2132-9.

Neuhaus EM, Mashukova A, Zhang W, Barbour J, Hatt H. A specific heat shock protein enhances expression of mammalian olfactory receptor proteins. *Chem Senses.* 2006;31(5):445-452.

Offermanns S, Simon MI. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem.* 1995;270(25):15175-80.

Olkkonen VM, Stenmark H. Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int Rev Cyt.* 1997;176:1-85.

Ono T, Cabrita-Santos L, Leitao R, Bettiol E, Purcell LA, Diaz-Pulido O, Andrews LB, Tadakuma T, Bhanot P, Mota MM, Rodriguez A. Adenylyl cyclase alpha and cAMP signaling mediate *Plasmodium* sporozoite apical regulated exocytosis and hepatocyte infection. *Plos Path.* 2008;4(2):e1000008.

Ovchinnikov YA. Structure of rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Photochem Photobiol.* 1987;45(6):909-14.

Pang XL, Mitamura THorii T. Antibodies reactive with the N-terminal domain of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen inhibit cell proliferation by agglutinating merozoites and schizonts. *Infect Immun.* 1999;67(4):1821-7.

Pei X, Guo X, Coppel R, Bhattacharjee S, Haldar K, Gratzer W, Mohandas N, An X. The ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* stabilizes spectrin tetramers and suppresses further invasion. *Blood* 2007;110(3):1036-42.

- Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett.* 2011;585(11):1551-62.
- Ramachandran R. Vesicle scission: dynamin. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(1):10-7.
- Rapoport TA. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science.* 1992;258(5084):931-6.
- Rug M, Prescott SW, Fernandez KM, Cooke BM, Cowman AF. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood.* 2006;108(1):370-8.
- Scheuer T. Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(2):160-5.
- Schuck DC, Ribeiro RY, Nery AA, Ulrich H, Garcia CR. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds. *Cyt A.* 79(11):959-64.
- Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *Faseb J.* 1995;9(9):726-35.
- Selbie LA, Hill SJ. G protein-coupled receptor cross talk: the fine tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19(3):87-93.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor *J Biol Chem.* 2006;281(2):1261-73.
- Singh S, Alam MM, Pal-Bhowmick I, Brzostowski JA, Chitnis CE. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Path.* 2010;6(2):e1000746.
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2005;434(7030):214-7.
- Staines HM, Ellory JC, Kirk K. Perturbation of the pump-leak balance for Na⁺ and K⁺ in malaria-infected erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280(6):C1576-87.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science.* 2006;313(5791):1287-90.
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews* 2010;11(7):515-28.
- Tan CM, Brady AE, Nickols HH, Wang Q, Limbird LE. Membrane trafficking of G-protein coupled receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:559-609.

Tan CS. Sequence, structure, and network evolution of protein phosphorylation. *Sci Signal*. 2011; 4(182):mr6.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*. 2007;42(1):28-42.

Tang BL, Zhang T, Low DY, Wong ET, Horstmann H, Hong W. Mammalian homologues of yeast sec31p. An ubiquitously expressed form is localized to endoplasmic reticulum (ER) exit sites and is essential for ER-Golgi transport. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13597-604.

Tonkin CJ, van Dooren GG, Spurck TP, Struck NS, Good RT, Handman E, Cowman AF, McFadden GI. Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;137(1):13-21.

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

Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet* 2002;359(9324):2188-94.

Ullrich O, Stenmark H, Alexandrov K, Huber LA, Kaibuchi K, Sasaki T, Takai Y Zerial M. Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem*. 1993;268(24):18143-50.

Varotti FP, Beraldo FH, Gazarini ML, Garcia CR. *Plasmodium falciparum* malaria parasites display a THG-sensitive Ca²⁺ pool. *Cell Calcium*. 2003;33(2):137-44.

Vauquelin G, Van Liefde I. G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005;19(1):45-56.

Volonte C, Amadio S, D'Ambrosi N, Colpi M, Burnstock G. P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Therapeutics*. 2006;112(1):264-80.

Wan J, Ristenpart WD, Stone HA. Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(43): 16432-7.

Wang Q, Song C, Li CC. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J Struct Biol*. 2004;146(1-2):44-57.

Whiteheart SW, Hart GW. Incorporation of [3H]ethanolamine into a single cytosolic protein in a cell free system: ethanolaminylation of EF-1 alpha in vitro. *Arch Biochem Biophys*. 1994;309(2):387-91.

Wicher D, Schafer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH, Hansson BS. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*. 2008;452(7190):1007-11.

Woehlbier U, Epp C, Hackett F, Blackman MJ, Bujard H. Antibodies against multiple merozoite surface antigens of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* inhibit parasite maturation and red blood cell invasion. *Malar J*. 2010;9:77.

Worrall E, Basu S, Hanson K. Is malaria a disease of poverty? A review of the literature. *Trop Med Int Health*. 2005;10(10):1047-59.

ANEXO A- Artigos publicados no período do doutorado

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

Garcia CRS, Azevedo MF, Wunderlich G, Budu A, Young JA, Bannister L. *Plasmodium* in the Postgenomic Era: New Insights into the Molecular Cell Biology of Malaria Parasites. Int Rev Cell Mol Biol. 2008;266:85-156.

Sartorello R, Budu A, Bagnaresi P, Fernandes CA, Sato PM, Bueno VB, Fontes MRM, Oliveria PL, Paiva-Silva GO, Alves SV, Netto LES, Catalani LH, Garcia CRS. *In vivo* uptake of a haem analogue Zn protoporphyrin IX by the human malaria parasite *P. falciparum*-infected red blood cells. Cell Biol Int. 2010;34:859-65.

Cruz LN, Juliano MA, Budu A, Juliano L, Holder AA, Blackman MJ, Garcia CRS. Extracellular ATP triggers proteolysis and cytosolic Ca^{2+} rise in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* malaria parasites. Malar J. 2012;11(1):69.

Generation of second messengers in *Plasmodium*. Budu A, Garcia CRS. Microb Inf. 2012;14:787-95.