GEPOLIANO DOS SANTOS CHAVES

**INVESTIGAÇÃO DE PfSR25, PUTATIVO RECEPTOR
SERPENTINO DE *PLASMODIUM FALCIPARUM***

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

São Paulo

2014

GEPOLIANO DOS SANTOS CHAVES

**INVESTIGAÇÃO DE PfSR25, PUTATIVO RECEPTOR
SERPENTINO DE *PLASMODIUM FALCIPARUM***

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dr^a. Célia Regina da Silva Garcia

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2014

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

Chaves, Gepoliano dos Santos.

Investigação de PfSR25, putativo receptor serpentino de *Plasmodium falciparum* / Gepoliano dos Santos Chaves. -- São Paulo, 2014.

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

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

Versão do título para o inglês: Investigation of PfSR25, putative serpentine receptor of *Plasmodium falciparum*.

1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. GPCRs 4. Quinases 5. Fosfatases 6. Potássio 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/SBIB089/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Gepoliano dos Santos Chaves.

Título da Dissertação: Investigação de PfSR25, putativo receptor serpentino de *Plasmodium falciparum*.

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

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

( ) **Aprovado(a)**

( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 03 de abril de 2013.

PARECER 1110/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 27.03.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Avaliação PfSR12, putativo receptor serpentina, em Plasmodium falciparum*" da pesquisadora **CÉLIA REGINA DA SILVA GARCIA e aluno GEPOLIANO DOS SANTOS CHAVES**.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c. conforme modelo constante no *site.icb.usp.br*.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **27.02.2014**.

Atenciosamente,

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

A todas as crianças mortas em decorrência da malária.

À minha esposa, Cristiana. Meu diploma é, antes de tudo, seu.

A toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Uma das melhores coisas que existe é a amizade. Nunca fiz nem nunca serei capaz de fazer nada sozinho. E é muito melhor ter os amigos com quem dividir o trabalho e as alegrias. Minha gratidão a todos, antes de tudo, pela amizade. Através dela eu compartilhei com cada um, um pouco de minha humanidade, e vice-versa. Agradeço a todos os meus amigos que estão e que não estão inscritos abaixo:

A Deus, Amigo Fiel e Pai Criador de tudo quanto há. Você me mostrou que as coisas não são tão simples quanto enxergam os meus olhinhos humanos. Mas por causa da Sua Graça e Majestade, me leva a cumprir cabalmente o propósito para o qual me criou.

À Professora Célia Garcia, pela oportunidade em seu grupo de pesquisa. Seu traquejo firme foi um desafio para mim. Você me fez entender que agora eu não sou mais um menino, mas um homem.

À Dr^a Miriam Santos de Moraes, pela ajuda, suporte e ensinamentos que me possibilitaram chegar até o fim. Serei grato pela sua ajuda e sempre buscarei cativar sua amizade. Aos demais amigos e pesquisadores do laboratório, todos, doutores, doutorandos, mestres, mestrandos ou graduandos. Vocês são muito mais do que isto, são pessoas formidáveis. Muito obrigado, Eduardo Alves, Alexandre Budu, Julio Garcia, Wânia Lima, Laura Cruz, Myna Nakabashi, Desiree Schuk, Giulliana Tessarin, Bruno Cunha, Bruna Koresh, Maneesh Singh. À cavalaria de Viçosa, que não me deixou sentir tão “estrangeiro” em terras paulistanas: Lucas Borges, Fahyme Costa, Kênia Viçoso e Pedro Scarpelli. Kênia, obrigado pelas correções!

Às Professoras Maria Júlia Manso Alves e Débora Schechtman do Instituto de Química, e às pessoas do seu laboratório que me ajudaram: Milton, Crislaine, Mayara, André e Mateus. Às secretárias do IB, Gizele, Roseli, Suzy, Marcilene, e do ICB, Silvia, Dalva e Sabrina, pela animação e pelas conversas espirituosas. Ao Eduardo “Mohamed” pela descontração dos corredores do IB. A todos os funcionários da USP, em especial os do IB e do ICB, onde mais convivi, por tornarem meu trabalho possível e por fazer com que ele fosse feito da melhor forma que poderia ter sido.

A toda a minha família, que sempre me deu todo apoio possível para me tornar quem sou. Minha esposa, Cristiana, é especial, pois seu carinho, cuidado e atenção, foram essenciais nos momentos em que redigia esta. São lembrados também, meus pais Neide e Gedeon, e meu

irmão, Tancredo. Agradeço a todos os meus tios. Em especial à tia Ana, que me ajudou muito aqui em São Paulo. Aos meus sogros, seu Afonso e dona Ivana, que me acolheram em sua família, bem como aos meus cunhados e à toda a família que recebi da Cris.

Ao professor Marcelo Picanço, à Kátia, Mayara, Luiza e Marcelo Filho pelo apoio em Viçosa num momento tão difícil quanto a perda de minha mãe. Eu não sei se eu teria começado o Mestrado se Deus não os tivesse colocado em minha vida. Marcelo, eu mudei também por ouvir você. Ao irmão José Carlos, à irmã Lúcia, ao Tomás Campos, ao tio Tonis “*in memorian*”, à Iza Miriam, ao Mateus, à Luiza e ao *Peter August*, meu primeiro afilhado, também de Viçosa, porque a amizade de vocês fez muita diferença na minha vida e foi importante pra eu decidir vir para São Paulo. Ao Branco, porque você foi meu pai longe de casa, e não consegui te visitar quando você esteve em São Paulo.

À Vera Lúcia Felles, ao Carlos de Lucas Felles e à dona Tereza, pela amizade que dispensaram a mim e à minha esposa em São Paulo.

À CAPES pelo financiamento de meu projeto de pesquisa.

E finalmente, mas não menos importantes, aos meus irmãos em Cristo, especialmente os batistas e metodistas de Viçosa, além de todos os demais, e aos da Igreja Metodista no Butantã, porque a labuta fica mais prazerosa, se é possível, quando se tem o bom perfume do Senhor por perto.

*“To me they are an abstract concept conceived to explain observed responses of tissues
produced by chemicals of various structures.”*

Raymond Alquist

“Fiat Lux” (Faça-se a luz)

RESUMO

CHAVES, G. S. **Investigação de PfSR25, putativo receptor serpentino de *Plasmodium falciparum***. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O agente etiológico da malária, *Plasmodium falciparum* é a espécie responsável pela forma mais severa da malária em humanos. As altas taxas de mortalidade associadas à doença se devem a um complexo mecanismo de sinalização que possibilita ao parasita uma regulação extremamente precisa do desenvolvimento intracelular. Dentre uma série de consequências deste controle, está a possibilidade de escape da imunidade do hospedeiro. O parasita deve ser capaz de usar fatores presentes no hospedeiro como sinal para promover a regulada ativação de proteínas que agem de maneira extremamente coordenada com eventos específicos na dimensão espaço-temporal. Os elementos que possibilitam a percepção do ambiente e transmissão do sinal ao organismo unicelular são os receptores, moléculas as quais foram muito pouco estudadas em *P. falciparum*. Os receptores celulares de *P. falciparum* apresentam potencial enorme no desenvolvimento de anti-maláricos devido à ativação de quinases e fosfatases que agem a fim de transmitir o sinal externo. Nosso grupo estudou a classe dos GPCRs como potenciais receptores presentes em *P. falciparum*. Assim, foram reportados previamente como potenciais candidatos, PfSR1, 10, 12 e 25, os quais foram anotados no genoma do parasita e levaram à criação de um clone nocaute para o receptor PfSR25. PfSR25 foi objeto de estudo desta dissertação de mestrado. O objetivo deste trabalho foi dissecar o papel potencial de fosfatases/quinases como proteínas moduladas pela ativação de PfSR25. Como sinalização é um evento celular complexo, não excluimos a possibilidade de que outros mecanismos moleculares ocorram além dos aqui descritos. Nossas conclusões são que potássio modula PfSR25, ativando quinases/fosfatases, levando à ativação de moléculas efetoras. Entre os prováveis efetores, identificamos MSP1, proteína cuja função em *P. falciparum* encontra-se bem caracterizada, PfCEN1, também já estudada, e Pf4-4-13 e o fator básico de transcrição 3B (PfBTF3B), que ainda não foram caracterizados em *P. falciparum*. Estes dados sugerem, que pelo menos em parte, o mecanismo pelo qual PfSR25 exerce seu papel no desenvolvimento de *P. falciparum* é através da ativação de quinases/fosfatases. Isto não é surpreendente, pois a sinalização de PfSR25 ocorre através de K^+ /cálcio e o segundo mensageiro é um modulador destas classes de proteínas. No entanto, deve ser investigado se cálcio tem algum efeito direto sobre o processamento/ativação dos efetores aqui identificados.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum*. GPCRs. Quinases. Fosfatases. Cálcio, Potássio.

ABSTRACT

CHAVES, G. S. **Investigation of PfSR25, putative serpentine receptor of *Plasmodium falciparum***. 2014. 110 p. Masters Thesis (Biology of Host-Pathogen Interactions) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The ethiological malaria agent, *Plasmodium falciparum* is responsible for the most severe form of the disease in humans. The high mortality associated with the disease is due to a complex signaling mechanism that enables the parasite to have an extremely precise regulation of intracellular development. Among a number of consequences of this control by the parasite one is the ability to escape host immunity. The parasite must be able to use factors present in the host as a signal to promote regulated activation of proteins that act in highly coordinated manner with specific events in the space-time dimension. The elements that enable the perception of the environment and transmit the signal to unicellular organism are the receptors, molecules which have been little studied in *P. falciparum*. The cellular receptors of *P. falciparum* have enormous potential in the development of anti-malarial due to the activation of kinases and phosphatases that act to transmit the external signal. Our group studied the class of GPCRs as potential receptors present in *P. falciparum*. Thus it was previously described four potential candidates, PfSR1, 10, 12 and 25 which were annotated in the parasite genome and led to the creation of a knock out clone for PfSR25 receptor. PfSR25 was the object of study of this dissertation. The focus of the present work was to dissect the potential role of phosphorylation/dephosphorylation as a downstream effect of PfSR25 activation. As signaling is a quite complex cellular event, we do not exclude the possibility that other molecular mechanisms, take place additionally to those here described. Our main conclusions are that potassium is able to modulate the receptor PfSR25 by activation of kinases/phosphatases proteins, leading to activation of effector molecules. We identified MSP1 and PfCEN1 already characterized proteins, Pf4.4.13 and the basic transcription factor 3B (PfBTF3B), which have not yet been characterized in *P. falciparum* as likely effectors. These data suggest that, at least in part, the mechanism by which PfSR25 exerts its role in the *P. falciparum* development is through the activation of kinase/phosphatase proteins. This is not surprising, since PfSR25 signaling occurs through K^+ /calcium and the second messenger is a modulator of these classes of proteins. However, remains to be investigated rather calcium has a direct effect on processing/activation of the effectors here identified.

Keywords: *Plasmodium falciparum*. GPCRs. Kinases. Phosphatases. Calcium. Potassium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D- PAGE – eletroforese bidimensional

ADP – adenosina difosfato

AMA-1 – *apical membrane antigen 1*

AMP – adenosina monofosfato

ATP – adenosina trifosfato

CAM – calmodulina

cAMP – adenosina monofosfato cíclico

cDNA – *complementary DNA*

CDPK – *calcium dependent protein kinase*

CITH - *CAR-I/Trailer Hitch Homolog*, protein

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle medium*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

DOZI – *development of zygote inhibited*, proteína

EBA175 – *erythrocyte binding antigen 175*

ECL – *electrochemiluminescence*

eIF2 α – subunidade alfa do fator eucariótico 2 de iniciação da síntese protéica, proteína

GPCRs – receptores acoplados à proteína G

GRK – quinases de GPCRs

GTP – Trifosfato de Guanosina

HBSS – *Hank's buffered salt solution*

HEK293T – *human embryonic kidney 293T*

HepG2 – *liver hepatocellular carcinoma cells*

HRP – *horseradish peroxidase*

Hsp – *heat shock protein*

IgG – Imunoglobulina G

IP – Imunoprecipitação

IP₃ – inositol trifosfato

IP₃R – receptor de inositol trifosfato

MAPK – *mitogen activated protein kinase*

MSP1 – *merozoite surface protein 1*

PBS – *phosphate buffered saline*

Pf14-3-3 – proteína hipotética de *Plasmodium falciparum*

PfBTF3B – *Basic transcription factor 3B*, protein hipotética de *P. falciparum*

PfeIF2 α – subunidade alfa do fator eucariótico 2 de iniciação da síntese proteica de *Plasmodim falciparum*, proteína

PfeIK1– proteína quinase 1 de fator eucariótico 2 de iniciação da síntese protéica

PfeIK2– proteína quinase 2 de fator eucariótico 2 de iniciação da síntese protéica

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

PK7 – proteína quinase 7

PKA – *protein kinase A*

PLC – *phospholipase C*

PLC β - *phospholipase C beta*

PMSF - *phenylmethanesulfonylfluoride*

Proteína G – proteína ligante de nucleotídeos de guanina

PVDF – *polyvinylidene difluoride*

RE – retículo endoplasmático

RNA – *ribonucleic acid*

SDS – *sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TBST – *tris buffered saline + tween*

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

UDP – uridina difosfato

UMP – uridina monofosfato

UPS – Sistema Ubiquitina-Proteassoma

UTP – uridina trifosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágio de eliminação da malária por países.....	19
Figura 2. Perfil epidemiológico da malária no Brasil.....	20
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	22
Figura 4. Via de sinalização que ocorre em <i>P. falciparum</i> desencadeada pela melatonina.. ...	25
Figura 5. Via clássica da ativação dos receptores serpentina	29
Figura 6. Mecanismo de fosforilação de PfeIF2 α pela quinase PfeIK1	39
Figura 7. Papel de K ⁺ na ativação de calcineurina	41
Figura 8. Transfecção de células HEK293T com PfSR25	55
Figura 9. Perfil de fosforilação de serinas-treoninas em proteínas de células HEK293T transfectadas com receptor PfSR25	56
Figura 10. Perfil de fosforilação de tirosinas em proteínas de <i>P. falciparum</i>	62
Figura 11. Perfil de fosforilação de serinas-treoninas em proteínas de <i>P. falciparum</i>	63
Figura 12. Perfil de fosforilação de eIF2 α em células HEK293T transfectadas com PfSR25	68
Figura 13. Perfil de fosforilação de PfeIF2 α em parasitas <i>P. falciparum</i> estimulados com KCl	69
Figura 14. Perfil de fosforilação de PfeIF2 α em parasitas <i>P. falciparum</i> sem estímulo de KCl	70
Figura 15. Perfil de expressão de proteínas de <i>P. falciparum</i> no estágio de esquizonte.....	71
Figura 16. Perfil de expressão de proteínas de <i>P. falciparum</i> no estágio de trofozoítos.....	74
Figura 17. Aspecto de parasitas utilizados e controle da quantidade de proteínas totais aplicados a 2D-PAGE.....	76
Figura 18. Perfil de proteínas de parasitas <i>P. falciparum</i> isolados no estágio de trofozoítos obtido por 2D-PAGE.....	77
Figura 19. Perfil de fosfoproteínas de parasitas <i>P. falciparum</i> isolados no estágio de trofozoítos obtido por 2D-PAGE.....	78
Figura 20. Perfil de fosfoproteínas de parasitas <i>P. falciparum</i> selvagens (WT) isolados no estágio de trofozoítos e tratados com 140 mM de KCl	83
Figura 21. Perfil de fosfoproteínas de parasitas <i>P. falciparum</i> nocaute (KO) isolados no estágio de trofozoítos e tratados com 140 mM de KCl	84

Figura 22. Efeitos do tratamento 140 mM de KCl no perfil de fosforilação de proteínas dos <i>spots</i> 4 e 5 em parasitas selvagens (WT) e nocautes (KO) de PfSR25	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes de tampões para tratamento de células HEK293T transfectadas.....	47
Tabela 2. Componentes de tampão M utilizado para estímulo de parasitas.....	49
Tabela 3 Etapas da isofocalização em sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare).....	51
Tabela 4. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 80 kDa de células HEK293T transfectadas com PfSR25 e vetor vazio	58
Tabela 5. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 60 kDa de células HEK293T transfectadas com PfSR25 e vetor vazio	59
Tabela 6. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 35 kDa de células HEK293T transfectadas com PfSR25 e vetor vazio	60
Tabela 7. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 40 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocaute (KO) de PfSR25	64
Tabela 8. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 55 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocaute (KO) de PfSR25	65
Tabela 9. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 100 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocaute (KO) de PfSR25	66
Tabela 10. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 130 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocaute (KO) de PfSR25	67
Tabela 11 Proteínas identificadas nas bandas de 190 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocautes (KO) de PfSR25 enviadas para sequenciamento.....	72
Tabela 12. Análise estatística dos <i>spots</i> de proteínas fosforiladas obtidas por eletroforese 2D-PAGE.....	79
Tabela 13. Fosfoproteínas candidatas a interagirem na via de PfSR25 identificadas por sequenciamento no <i>spot</i> 4.....	80
Tabela 14. Fosfoproteínas candidatas interagirem na via de PfSR25 identificadas por sequenciamento no <i>spot</i> 5	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Malária e ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	19
1.2 Percepção do ambiente externo por <i>Plasmodium</i> e papel de melatonina	22
1.3 Receptores acoplados às proteínas G	25
1.4 Proteínas quinases no ciclo celular de <i>P. falciparum</i>	31
1.5 Proteínas fosfatases e íon K ⁺ (potássio) envolvido na secreção das organelas micronemas	40
1.6 Receptores acoplados à proteína G e K ⁺ : evidências em <i>P. falciparum</i>	42
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3 METODOLOGIA	46
3.1 Cultivo e transfecção de células HEK293T	46
3.2 Detecção da expressão de PfSR25 em células HEK293T transfectadas através de imunofluorescência	46
3.3 Estímulo de células HEK293T	47
3.4 Extração de proteínas de células HEK293T	48
3.5 Cultivo, sincronização, isolamento e estímulo de <i>P. falciparum</i>	48
3.6 Extração de proteínas de <i>P. falciparum</i>	49
3.7 Controle da quantidade de proteínas	50
3.8 Eletroforese em gel 2D de proteínas de <i>Plasmodium falciparum</i>	50
3.8.1 Primeira dimensão: Isofocalização	50
3.8.2 Segunda dimensão: SDS-PAGE	51
3.8.3 Coloração de fosfoproteínas e proteínas totais com kits comerciais	51
3.8.4 Análise de gel 2D	52
3.8.5 Identificação de proteínas e análise de dados a partir de espectrometria de massas (MS)	52
3.9 Análise estatística	52
3.10 Isolamento de proteínas para espectrometria de massas	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Estudo do perfil de fosforilação de proteínas de células HEK293T transfectadas com gene PfSR25 de <i>Plasmodium falciparum</i> , candidato a receptor serpentina, em resposta ao estímulo de KCl	54
4.2 PfSR25, candidato a receptor serpentina em <i>Plasmodium falciparum</i> , modula fosforilação de uma proteína em parasitas submetidos ao transiente de concentração de KCl 1 mM para 5,4 mM	61
4.2.1 Fosforilação de resíduos de tirosina em <i>P. falciparum</i>	61
4.2.2 Ensaios de fosforilação de resíduos de serina/treonina em parasitas <i>P. falciparum</i> , selvagem e nocaute para o candidato a receptor serpentina PfSR25	62
4.3 Estudo para avaliar o fator de iniciação da tradução protéica (eIF2 α) em células de mamíferos transfectadas e em parasitas <i>P. falciparum</i> selvagem e nocaute para PfSR25	68
4.4 Evidências de proteínas diferencialmente expressas entre parasitas <i>P. falciparum</i> selvagem e nocaute para o gene PfSR25, PfSR25 ⁻	70
4.5 Avaliação de fosforilação de proteínas por eletroforese bidimensional de <i>P. falciparum</i> selvagem e nocaute para o receptor PfSR25	75
4.6 Estudo da sinalização por estímulo de KCl na fosforilação de proteínas de <i>P. falciparum</i> selvagem e nocaute para PfSR25 (PfSR25 ⁻)	82
5 DISCUSSÃO	86

5.1 Proteínas de células HEK293T transfectadas com o gene para o receptor serpentino putativo <i>pfsr25</i> , apresentam fosforilação em resposta a estímulo de KCl.....	86
5.2 PfSR25, modula fosforilação de uma proteína em parasitas em resposta a estímulo de KCl, no estágio de trofozoíto	87
5.3 Parasitas nocaute de PfSR25 apresentam evidência de modificação no programa de expressão de proteínas	88
5.4 Evidências de proteínas diferencialmente expressas entre parasitas selvagem e PfSR25⁻	90
5.5 PfSR25⁻ (KO) mostra evidências de mudança no programa de expressão de proteínas também em eletroforese bidimensional	93
6 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS*	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária e ciclo de vida de *Plasmodium*

Apesar dos esforços contínuos da comunidade mundial para eliminação e controle da malária em diversas regiões do planeta, sobretudo no que diz respeito ao desenvolvimento econômico destas regiões, diversos países apresentam-se em diferentes estágios na erradicação da malária (NÁJERA, 2001). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, *World Health Organization* - WHO), a malária é prevalente nas áreas tropicais do globo terrestre e os países mais desenvolvidos são considerados livres da doença (Figura 1).

Figura 1. Estágio de eliminação da malária por países. Fonte: WHO, 2013.

Ainda segundo a OMS, em 2013 as principais zonas afetadas pela malária são partes da África, acentuadamente a África Sub-Sahariana, América Latina, sul asiático e alguns países da Oceania. Em 2012, de acordo com esta organização, houve 207 milhões de casos de malária, que causaram aproximadamente 627 mil mortes (WHO, 2012). No entanto, um estudo de 2005 apontou dados divergentes em relação a esses números (SNOW et al., 2005).

Segundo o estudo, cerca de 500 milhões de casos ocorrem anualmente, dentre os quais, até 3 milhões de mortes acontecem. Além disso, somente na África, cerca de 1 milhão de crianças de até 5 anos de idade morrem anualmente em decorrência da doença (MILLER et al., 2013).

No Brasil, a OMS aponta que, em 2011, 20% da população estava sob risco de transmissão da doença, 2% em áreas de alto risco e 18% em áreas de baixo risco (WHO, 2012). As áreas de alto risco incluem principalmente os estados da Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão) onde o número de casos pode chegar a 100 por 1000 habitantes (WHO, 2012) (Figura 2).

Figura 2. Perfil epidemiológico da malária no Brasil. As áreas mais afetadas estão localizadas principalmente na região Norte do País. Fonte: WHO, 2012.

A malária é causada por parasitas do filo Apicomplexa do gênero *Plasmodium*. Em humanos, cinco espécies são reportadas como agentes etiológicos. São elas: *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malarie*, *P. knowlesi* e *P. falciparum* (SABBATANI; FIORINO; MANFREDI, 2010). Esta última é a espécie responsável pela forma mais severa da malária em humanos, com altas taxas de mortalidade (KLEIN, 2013). No Brasil, a incidência da doença causada por *P. falciparum* é de 13% e os 87% restantes são casos devidos a *P. vivax* (Figura 2) (WHO, 2012).

Plasmodium apresenta um ciclo de vida complexo, constituído por diversos estágios de desenvolvimento. O ciclo ocorre em duas fases, uma assexuada, no hospedeiro vertebrado e uma fase sexuada que ocorre no mosquito do gênero *Anopheles sp* (MITCHELL; BANNISTER, 1988). No hospedeiro vertebrado o ciclo começa quando este é picado pelo mosquito contaminado pelo *Plasmodium*. Formas infectantes presentes na glândula salivar do mosquito, denominadas esporozoítos, são injetadas na derme do hospedeiro durante o repasto

sanguíneo do inseto. Na circulação sanguínea, os esporozoítos invadem hepatócitos e se multiplicam de forma assexuada e assintomática durante um período de 6 a 15 dias (AMINO et al., 2006). Nos hepatócitos, os parasitas iniciam sua divisão intracelular assexuada. Ao fim desta fase, milhares de merozoítos são liberados de cada hepatócito infectado. Após a ruptura dos hepatócitos, os parasitas retornam à corrente sanguínea, onde ocorrerá a invasão das hemácias, dando início à fase intra-eritrocítica, responsável pelos sintomas da doença. No interior das hemácias, os parasitas passam por três fases distintas de desenvolvimento, denominadas anel, trofozoíto e esquizonte (BANNISTER et al., 2000; GARCIA et al., 2008). Ao final do ciclo, os esquizontes segmentam-se dando origem aos merozoítos, que serão liberados na corrente sanguínea, podendo assim infectar novas hemácias. Alguns merozoítos podem diferenciar-se em gametócitos, por mecanismos moleculares desconhecidos, representando um dos grandes desafios para nosso melhor entendimento de aspectos de sinalização celular envolvidos no processo (GHOSH; EDWARDS; JACOBS-LORENA, 2000).

Os gametócitos masculinos e femininos são ingeridos pelo *Anopheles* durante a picada e se unem no trato digestivo do inseto para formar o zigoto. Ao se desenvolver, este se torna móvel (oocineto) e invade a parede do intestino médio formando o oocisto. O oocisto sofre divisões sucessivas, liberando esporozoítos que migram até a glândula salivar onde poderão ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo de vida de *Plasmodium* (ENSERINK, 2000). Um esquema do ciclo é ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium*. O parasita apresenta ciclo complexo que ocorre em dois hospedeiros. No hospedeiro intermediário, ocorre a fase assexuada, responsável pelos picos de febre observados em humanos. No hospedeiro definitivo (mosquito *Anopheles*) ocorre a fase sexuada. Fonte: WHO, 2012.

1.2 Percepção do ambiente externo por *Plasmodium* e papel de melatonina

A periodicidade no ciclo de vida de diversas espécies de *Plasmodium* tem sido observada desde o início do século XX. No entanto, desde os tempos de Hipócrates, já se sabia que a manifestação clínica da malária era quadros febris que se repetiam a cada 2 dias. Hoje se sabe que a periodicidade deste ciclo está diretamente associada à liberação simultânea de milhares de merozoítos na corrente sanguínea após a ruptura das hemácias. Esta liberação simultânea é possibilitada pela alta sincronia dos estágios intra-eritrocíticos do parasita. Desta forma, espécies que apresentam um ciclo intra-eritrocítico de 48 horas, como *P. falciparum*, ocasionam ataques febris a cada dois dias no hospedeiro vertebrado (GARCIA; MARKUS; MADEIRA, 2001; HAWKING, 1970; HAWKINS, 1975).

A periodicidade que ocorre no hospedeiro vertebrado tem implicações para o ciclo sexuado do parasita. Diversos estudos mostraram essa sincronia na produção de gametócitos de diferentes espécies de *Plasmodium*, a qual se refletia diretamente na infecção de mosquitos que se alimentavam em diferentes horários em hospedeiros vertebrados infectados (GAMBRELL, 1937; GAUTRET E MOTARD, 1999; SHAH, 1934). Dessa forma, propôs-se que a temporização na sincronia do ciclo assexuado do parasita constituiria um meio de coincidir o horário de pico de aumento no número de gametócitos com o horário de alimentação dos mosquitos. Este fenômeno foi estudado por Hawking, sendo conhecido como fenômeno Hawkins. Visto a importância da sincronia e temporização de formas assexuadas de *Plasmodium* para a continuidade de seu ciclo sexuado, é de grande interesse investigar quais os mecanismos responsáveis por estas características do parasita (HAWKING, 1970; HAWKINS, 1975).

Em 1976 foi demonstrado que a sincronia dos estágios de desenvolvimento dos parasitas é perdida em cultura, indicando que fatores oriundos do hospedeiro sejam responsáveis pelo processo de sincronização do parasita (TRAGER; JENSEN, 1976). Desta forma, fica evidente que o parasita percebe o microambiente e utiliza esta sinalização para modular seu ciclo de desenvolvimento no hospedeiro, como a divisão no ciclo assexuado e a liberação dos gametócitos na corrente sanguínea de forma que esta seja concomitante com o horário de alimentação do mosquito (HAWKINS, 1975).

Tanto os vertebrados quanto o mosquito têm no ciclo claro-escuro um importante fator de temporização para seu ciclo circadiano. Como o parasita vive dentro de células do hospedeiro vertebrado, portanto não tendo acesso direto ao ciclo de claro-escuro, fica evidente a necessidade de um efector que permita a comunicação parasita hospedeiro. Este ciclo deve ser controlado por intermédio de algum fator derivado do hospedeiro que oscile circadianamente. Boyd demonstrou em 1929, que ao se inverter o ciclo de claro-escuro do hospedeiro, inverte-se também o horário de liberação de merozoítos na corrente sanguínea. Assim, foi demonstrado que as oscilações circadianas do hospedeiro provocadas pelo fotoperíodo constituem um fator temporizador capaz de controlar os eventos do ciclo biológico de *Plasmodium* (BOYD, 1929).

Melatonina é um hormônio secretado pela glândula pineal de vertebrados e age como modulador de ritmos biológicos, sendo controlada diretamente pela luz (MACCHI; BRUCE, 2004). Esta substância atua como mediador entre ciclos claro/escuro e processos fisiológicos a ela relacionados (REITER TAN; FUENTES-BROTO, 2010). Em 2000, nosso laboratório

realizou experimentos com camundongos pinealectomizados cirúrgica e farmacologicamente (utilizando luzindol, um antagonista do receptor para melatonina) e verificou-se que nos camundongos infectados com *P. chabaldi* a sincronização do parasita foi perdida. Além disso, a presença da melatonina em ensaios *in vitro* favoreceu o desenvolvimento de formas maduras de *P. falciparum* (HOTTA et al., 2000). Dessa forma, evidenciou-se que a melatonina teria um papel na sincronização dos parasitas.

A ação molecular da melatonina ocorre por meio da liberação de cálcio a partir de estoques internos, sendo que variações nas concentrações deste íon no meio intracelular exercem papel fundamental em muitos processos biológicos como organização do citoesqueleto, divisão celular e diferenciação (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003). Em 2005, Beraldo e colaboradores demonstraram que os derivados do catabolismo do triptofano (aminoácido precursor da melatonina na via de síntese do hormônio) triptamina, serotonina, N-acetil serotonina e N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina, são capazes de sincronizar o ciclo de *P. falciparum* pela mobilização de cálcio. Além disso, verificaram que este efeito é bloqueado pelo inibidor de fosfolipase C (PLC), denominado U73122, e pelo antagonista do receptor da melatonina, luzindol. A melatonina também induz um aumento de cAMP e ativação de PKA, sendo este um evento precedido pelo aumento de cálcio intracelular. Uma complexa inter-relação entre as vias destes dois segundos mensageiros ainda foi encontrada, sendo que o cAMP gerado em resposta à melatonina também induz a liberação de cálcio (BERALDO et al., 2005).

Sabe-se que em vertebrados, receptores de melatonina possuem sete domínios transmembranares, sendo nomeados receptores serpentinicos (SINGH; JADHAV, 2014). De acordo com a visão clássica de sinalização por receptores serpentinicos, a proteína G atua ativando efetores como adenilato ciclase, fosfolipase C e canais iônicos, levando à transmissão do sinal externo (HENG; AUBEL; FUSSENEGGER, 2013). Portanto, a ativação das vias de adenilato ciclase e fosfolipase C pela melatonina em *P. falciparum*, com liberação de cálcio, seria um indício do envolvimento de receptores serpentinicos deste parasita nestes eventos.

Devido à importância das vias desencadeadas pela melatonina no ciclo de vida de *Plasmodium*, outros estudos foram conduzidos visando identificar seus possíveis componentes. Assim, foram identificadas uma tiol-protease dependente de cálcio (FARIAS et al., 2005) e duas proteínas quinases, a proteína quinase 7 (PK7) (KOYAMA et al., 2012) e a quinase PfeIK1 (*P. falciparum* *Eukaryotic Initiation factor Kinase*) (RIBEIRO, 2010), a qual

fosforila o fator de iniciação da síntese de proteínas eIF2 em sua subunidade alfa (eIF2 α) (*Eukaryotic Initiation Factor*), em resposta à privação de aminoácidos (FENNELL et al., 2009). As vias de sinalização desencadeadas pela melatonina em *P. falciparum*, bem como a participação de algumas das proteínas envolvidas no processo são ilustradas na Figura 4.

Figura 4. Via de sinalização que ocorre em *P. falciparum* desencadeada pela melatonina. Melatonina interage com seu receptor que ativa a fosfolipase C (PLC) responsável pela produção de IP₃ que irá se ligar a receptores no retículo endoplasmático, ER (IP₃R). Esta ligação promove a liberação de cálcio dos estoques do ER. Este íon modula adenilato ciclase. O cAMP produzido pela atividade desta enzima, ativa a proteína quinase PKA, que tem um papel na invasão de hemácias pelos merozoítos através da fosforilação da proteína AMA1. Ainda estão envolvidas na via de melatonina, PK7 e PfeIK1, pois seus nocautes mostraram perda na capacidade da melatonina em sincronizar formas intra-eritrocíticas. Baseado em Beraldo et al., 2005; Fennell et al., 2009; Koyama et al., 2012; Ribeiro, 2010 e Tyler, Treeck e Boothroyd, 2011.

1.3 Receptores acoplados às proteínas G

Organismos unicelulares apresentam necessidades de sinalização similares às utilizadas por organismos multicelulares, uma vez que precisam perceber um ambiente em

constante mudança, e em alguns casos, coordenar diferentes células (isto é, percepção da densidade celular) (CRESPI, 2001).

Uma das principais vias de sinalização em eucariotos é desencadeada a partir de receptores acoplados à proteína G (HENG; AUBEL; FUSSENEGGER, 2013). Receptores serpentinicos, serpenteantes, heptahélicos, 7TMR (*Seven Trans-Membrane Receptors*) ou GPCRs (*G-Protein Coupled Receptors*) são receptores celulares que contêm sete domínios transmembranares e formam a principal família de receptores das membranas celulares. São conhecidos cerca de 1000 genes que codificam receptores serpentinicos que são extensivamente estudados (REITER; LEFKOWITZ, 2006). Estes receptores são encontrados em organismos filogeneticamente distantes como bactérias, fungos, plantas e metazoários (DE MENDOZA, SEBÉ-PEDRÓS; RUIZ-TRILLO, 2014).

A confirmação da importância desses receptores aconteceu em 2012 quando o prêmio Nobel de química laureou dois importantes pesquisadores que se dedicam à investigação de GPCRs, Robert Lefkowitz e Brian Kobilka. A Academia Real de Ciências da Suécia (RSAS)¹ afirmou que apesar de ter sido postulada a existência dos receptores de adrenalina, durante muito tempo sua existência não pôde ser comprovada devido à quantidade pequena desses receptores presentes nas membranas celulares (RSAS, 2012). Robert Lefkowitz atuou mostrando a existência física de receptores celulares adrenérgicos, bem como sua ligação com adenilato ciclase (LEFKOWITZ; ROTH; PASTAN, 1970a; LEFKOWITZ et al., 1970b). Brian Kobilka fez estudos que levaram ao seqüenciamento dos genes e posteriores estudos estruturais dos receptores adrenérgicos, confirmando a teoria de receptores alfa e beta adrenérgicos de Raymond Ahlquist, e possibilitando assim o desenvolvimento de drogas para o tratamento de complicações cardiovasculares (CHEREZOV et al., 2007; KOBILKA et al., 1987; WENGER; GREENBAUM, 1984).

Em humanos, a importância de GPCRs está ligada ao fato deste grupo de receptores ser alvo de numerosos tipos de medicamentos. Direta ou indiretamente, de 30-60% dos agentes terapêuticos atuais têm receptores serpentinicos como alvo (DORSAM, GUTKIND, 2007; REITER; LEFKOWITZ, 2006; VENKATAKRISHNAN et al., 2013). Em mamíferos, GPCRs são capazes de regular a fisiologia e homeostase de vários sistemas e órgãos, dentre os quais o sistema cardiovascular tem grande destaque. Como exemplo, a contratilidade cardíaca é regulada pela atividade dos receptores β -adrenérgicos (β_1 e β_2 ARs - *Adrenergic Receptors*), os quais localizam-se na membrana dos cardiomiócitos. Receptores tipo I de

---

¹ RSAS: *The Royal Swedish Academy of Sciences*

angiotensina II (AT₁Rs - *Angiotensin Receptors*) regulam a estrutura e morfologia cardíacas e o controle neurormonal da circulação é realizado pela liberação de catecolaminas e corticosteróides das glândulas adrenais. A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), também está sob regulação de vários GPCRs (LYMPEROPOULOS; NEGUSSIE, 2013).

As pesquisas que buscam a identificação e função de GPCRs na biologia de parasitas se encontram em estado menos avançado do que o estudo de GPCR em mamíferos. No entanto, sabe-se que GPCRs representam um importante componente molecular na interface parasita-hospedeiro. O hospedeiro utiliza-se da sinalização de GPCRs para ativar seu sistema imunológico na infecção por microrganismos (BESTEBROER; DE HAAS; VAN STRIJP, 2010). Moléculas derivadas dos parasitas são reconhecidas pelo hospedeiro por meio de sua ligação a GPCRs expressos nas membranas de leucócitos, os quais são então recrutados para o local da infecção. No entanto, os parasitas desenvolveram ferramentas para não serem percebidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. Enquanto vírus produzem moléculas que atraem a movimentação de leucócitos para locais não infectados, bactérias produzem substâncias que bloqueiam os receptores presentes nos leucócitos prejudicando assim a resposta imunológica (BESTEBROER; DE HAAS; VAN STRIJP, 2010).

Estudos investigando o papel de serotonina em parasitas do gênero *Schistosoma* ilustram o possível envolvimento de GPCRs no desenvolvimento destes organismos. A serotonina, estruturalmente semelhante à melatonina, tem importância para o sistema nervoso central de humanos, onde problemas na concentração do neurotransmissor são a causa de doenças como depressão, ansiedade e transtornos obsessivo-compulsivos (MÜLLER; HOMBERG, 2014). Foi observado que em parasitas do gênero *Schistosoma* ocorre a ativação de receptores de serotonina (MANSOUR, 1984). Esta ativação é seguida da produção de cAMP e a atividade de adenilato ciclase é crescente durante o desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* (ESTEY; MANSOUR, 1987). Recentemente, foi publicado um estudo que revelou que o receptor de serotonina de *Schistosoma mansoni* pertence à superfamília dos GPCRs (PATOCKA et al., 2014). O estudo evidenciou ainda a importância da atividade do GPCR para a movimentação do parasita, pois parasitas *knocked down* para o mesmo apresentaram menor capacidade de movimentação, mostrando assim o papel da serotonina no processo (PATOCKA et al., 2014).

A função de sinalização dos GPCRs é desempenhada pelo acoplamento do receptor ativado à proteína G heterotrimérica (MOREIRA, 2014). A proteína G heterotrimérica é

composta pelas subunidades G_α , G_β e G_γ . A ligação do receptor à proteína G promove a troca de GDP, ligado à subunidade G_α , por GTP. Ocorre então, a dissociação da G_α -GTP, ativada, das subunidades $G_\beta G_\gamma$ e destas do receptor (DORSAM; GUTKIND, 2007).

A subunidade G_α é dividida em quatro subfamílias: G_{as} , G_{ai} , G_{aq} , $G_{\alpha 12}$ (MOREIRA, 2014). Cada tipo de subunidade G_α ativa diferentes efetores *downstream*. Por exemplo, G_{as} estimula adenilato ciclase, aumentando a concentração de cAMP, enquanto G_{ai} inibe adenilato ciclase, sinalizando o processo inverso. G_{aq} liga-se a $PLC\beta 1$, ativando-a e induzindo a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato. $G_\beta G_\gamma$ podem ativar alguns tipos de PLCs, canais iônicos e quinases de lipídeos. Além destes segundos mensageiros clássicos, $G_\beta G_\gamma$, G_{aq} e $G_{\alpha 12}$ podem também controlar outras moléculas transdutoras de sinais, como as proteínas monoméricas ligantes de GTP das famílias Ras e Rho e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). O efeito final da integração da sinalização promovida por proteínas G é o controle de muitas funções celulares como proliferação, diferenciação, migração e degradação da matriz extracelular (DORSAM; GUTKIND, 2007). A Figura 5 ilustra o mecanismo clássico de ativação dos GPCRs.

Figura 5. Via clássica da ativação dos receptores serpentina. O estado ativo do receptor é alcançado pela ligação do agonista. A mudança alostérica no receptor leva à ativação de uma proteína com atividade trocadora de guanossina (GEF - *Guanosine Exchange Factor*), que cataliza a troca da molécula de GDP por molécula de GTP, ativando a subunidade G_α . A subunidade G_α desliga-se do receptor, assim como das subunidades $G_\beta\gamma$. As proteínas G_α então interagem e ativam suas moléculas efetoras, resultando na produção de segundos mensageiros, os quais são produzidos de acordo com a natureza do estímulo externo recebido. O complexo $G_\beta\gamma$ interage com canais iônicos e estes possibilitam a ação de diferentes tipos de segundos mensageiros. No interior do núcleo, a resposta será mediada através de fatores de transcrição que modulam a expressão gênica, efeito final da transmissão do estímulo. Baseado em Dorsam e Gutkind, 2007; Heng, Aubel e Fussenegger, 2013; Shukla, Xiao e Lefkowitz, 2011.

Genes que expressam proteínas G não foram identificados no genoma de *P. falciparum*. Entretanto, já foi reportado que receptores serpentina podem atuar independentemente de proteínas G (BRZOSTOWSKI; KIMMEL, 2001; HALL; PREMONT; LEFKOWITZ, 1999). Além disso, outros estudos utilizando experimentos de bioquímica sugeriram a existência destas proteínas em *Plasmodium*. Estes estudos utilizaram a metodologia da ADP-ribosilação de proteínas G, catalisada pelas toxinas de cólera ou pertussis (DYER; DAY, 2000; LOCHT; ANTOINE, 1995; THÉLU et al., 1994).

Utilizando Modelos Ocultos de Markov (HMM), com base em busca por similaridade, não foi encontrado nenhum candidato a receptor serpentina em *P. falciparum* (WALLIN; HEIJNE, 1995). Nosso grupo realizou uma busca por receptores serpentina no genoma do parasita. Utilizando abordagem estrutural e ferramentas de bioinformática, foram encontradas

quatro proteínas que exibem sete domínios transmembranares bem definidos (MADEIRA et al., 2008).

Além das proteínas G, os componentes mais conhecidos das vias de sinalização de GPCRs são as β -arrestinas e as quinases de GPCRs. Estas duas últimas proteínas estão relacionadas à dessensibilização do receptor (REITER; LEFKOWITZ, 2006). Neste sentido, a classe das proteínas quinases de GPCRs, as GRKs (*G-Protein Coupled Receptor Kinases*), regulam a atividade do receptor pelo aumento da sua afinidade por moléculas de arrestinas. As arrestinas por sua vez, estão ligadas à maquinaria de endocitose celular dependente de clatrina e inibem a atividade dos GPCRs por promoverem a internalização destes receptores (VENKATAKRISHNAN et al., 2013).

A família das GRKs pode ser dividida em três grupos, baseados em homologia de sequência, sendo eles: quinases de rodopsina ou subfamília das GRKs visuais (GRK1 e GRK7), subfamília das quinases dos receptores β -adrenérgicos (GRK2 e GRK3) e subfamília da GRK4 (GRK 4, 5 e 6) (SUO; LI, 2010). A fosforilação do receptor serpentina por estas quinases promove um aumento em sua afinidade pelas arrestinas. Em mamíferos, são conhecidas duas isoformas de arrestinas, as β -arrestinas 1 e 2, também conhecidas como arrestinas 2 e 3, respectivamente. Estas arrestinas ligam-se diretamente ao GPCR fosforilado, formando um complexo estequiométrico que é estereoquimicamente incapaz de ativar proteínas G, no processo denominado dessensibilização funcional de GPCRs. A molécula de arrestina então interage com resíduos de aminoácidos do receptor previamente fosforilados pela GRK. A ligação ao receptor promove importantes mudanças conformacionais na molécula de arrestina, ao mesmo tempo em que estabelece uma alta afinidade do receptor pelo agonista. Esse complexo é denominado complexo ternário alternativo, uma alusão ao complexo agonista-receptor-proteína G em ausência de GTP. A seguir, a arrestina provoca uma queda na atividade do receptor pela sua ligação à maquinaria de endocitose dependente de clatrina (LYMPEROPOULOS; NEGUSSIE, 2013).

Buscando um entendimento mais detalhado do papel das quinases de GPCRs em sua dessensibilização, diversos grupos procuraram estabelecer abordagens para a verificação da atividade das GRKs. Algumas evidências mostraram que a quinase de GPCR mais envolvida nos mecanismos de terminação de sinal é a GRK2, em mamíferos (REITER; LEFKOWITZ, 2006). Entretanto, a ausência de inibidores específicos para esta quinase e o fato de que camundongos nocaute para este gene não sobrevivem, tornaram seu estudo uma abordagem experimentalmente inviável. Graças aos pequenos RNAs de interferência (siRNA), tornou-se

possível estudar o efeito da inibição de cada tipo de GRK individualmente. A conclusão dos estudos com pequenos RNAs de interferência é que GRK2 e 3 são as responsáveis primárias pela fosforilação dependente de agonista dos receptores e recrutamento das arrestinas. Em termos práticos, uma vez que o agonista tenha ativado a via, seu receptor será alvo de fosforilação pelas quinases GRK 2 e 3, afim de que o sinal não desencadeie uma resposta exacerbada. Esta fosforilação recruta as arrestinas. GRK5 e 6 mostraram-se menos importantes para estas observações (KIM et al., 2005; REN et al., 2005).

1.4 Proteínas quinases no ciclo celular de *P. falciparum*

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a transferência de um grupo fosfato do ATP para resíduos específicos de aminoácidos em suas proteínas alvos. Assim, quinases regulam a atividade, estabilidade, interação com ligantes ou localização dos seus substratos fosforilados. Muitas quinases são reguladas por outras quinases, ou até mesmo por sua atividade de quinase intrínseca. Como sinalizadores celulares, as quinases agem na interface célula-ambiente, regulando vias metabólicas, sendo o funcionamento inadequado de muitos destes mecanismos, a causa de várias doenças (LIM et al., 2012). A fosforilação promovida por proteínas quinases é uma das principais formas pelas quais os organismos eucariotos controlam sua atividade celular (HANKS, 2003). É interessante notar que cerca de 2% do genoma humano contem genes que codificam expressão de proteínas quinases evidenciando sua importância na sinalização celular (DOERIG et al., 2008).

Devido à importância das proteínas quinases no controle da atividade celular, muitos estudos têm possibilitado o entendimento sobre os mecanismos de inibição de tais proteínas, o que pode ajudar no controle do ciclo celular e tratamento de muitas doenças. Por exemplo, a ligação de inibidores ao domínio de interação com ATP é o princípio da ação de muitos inibidores de quinases desenvolvidos a partir de abordagens de *drug design*. Atualmente, 11 inibidores de quinases foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, para o tratamento do câncer (CHAHROUR; CAIRNS; OMRAN, 2012; ZHANG; YANG; GRAY, 2009). No Brasil, o mesilato de imatinibe, um inibidor da atividade constitutiva de tirosina quinase da proteína BCR/ABL alterada em leucemia mielóide crônica (TRELA; GLOWACKI; BŁASIAK, 2014), passou a ser considerado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tratamento de primeira linha para a doença em 2008,

tendo cobertura financeira do SUS sob a portaria da Secretaria de Atenção à Saúde (SAS) nº 347.

Embora proteínas quinases desempenhem importantes papéis regulatórios, muitas vezes conservados em organismos eucariotos, as proteínas quinases de *P. falciparum* mostram profundas divergências em relação às de outros eucariotos (ANAMIKA; SRINIVASAN; KRUPA, 2005; WARD et al., 2004). Os tipos de quinases, a organização das vias e as propriedades das enzimas ortólogas são as principais divergências apresentadas por *P. falciparum* em relação aos quinomas de outros eucariotos (DOERIG et al., 2009).

Os mais bem estabelecidos grupos de proteínas quinases em mamíferos apresentam componentes em *Plasmodium*. No entanto, é notável a ausência de tirosinas quinases STEs quinases, proteínas envolvidas na sinalização de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). O contrário também ocorre, existindo proteínas quinases do parasita que não se enquadram em nenhum grupo conhecido em mamíferos. Em *Plasmodium*, as quinases FIKKs, que apresentam a sequência de aminoácidos Phe-Ile-Lys-Lys em seu domínio quinase, são bem representativas. O grupo das FIKKs apresenta 20 proteínas conhecidas, 16 das quais podem ser exportadas para as hemácias do organismo hospedeiro (WARD ET AL., 2004; SCHNEIDER; MERCEREAU-PUJALON, 2005; LIM et al., 2012).

Os estudos de proteoma conduzidos até o momento em *P. falciparum* mostram que os resíduos de serina (S), treonina (T) e tirosina (Y) são fosforilados mais frequentemente neste organismo. Treeck e colaboradores detectaram que 0,51% dos eventos de fosforilação ocorrem em resíduos de tirosina. Assim, mais de 99% dos eventos de fosforilação ocorrem em resíduos de S e T (TREECK et al., 2011).

As proteínas quinases são geralmente classificadas em serina-treonina e tirosina quinases, podendo ainda ser divididas em subgrupos e famílias. Embora haja estudos que indicam ausência de tirosinas quinases e no genoma de *P. falciparum* (WARD et al., 2004), outros estudos sugerem a fosforilação destes resíduos e sua participação nas vias das MAP3K (ABDI et al., 2010). Demonstrou-se ainda a presença de resíduos fosforilados de tirosinas em *Toxoplasma gondii*, organismo cuja biologia é similar ao de *P. falciparum* (TREECK et al., 2011). Na presente dissertação, uma das abordagens para investigarmos a atividade de quinases e/ou fosfatases foi a detecção de resíduos fosforilados de serina, treonina e tirosina.

Inibidores de proteínas quinases impedem a invasão e, consequentemente, o desenvolvimento do ciclo intra-eritrocítico de *P. falciparum* (DLUZEWSKI; GARCIA, 1996; DOERIG, 2004; GEYER; PRIGGE; KEENAN et al., 2005; WATERS, 2005). Foram

desenvolvidos trabalhos objetivando a identificação de novos alvos para tratamento da malária com base em quinases que são importantes na modulação da biologia do parasita (FUGEL et al., 2013; GAJI et al., 2014; GRACIOTTI et al., 2014; OJO et al., 2014). Por apresentarem divergência de homologia em relação às proteínas quinases presentes em humanos, acredita-se que as quinases do parasita representem um alvo promissor no desenvolvimento de antimaláricos (DOERIG et al., 2008).

Em *P. falciparum* foram identificadas as seguintes quiasas: proteína quinase ortóloga de caseína quinase 1; cinco membros da família das NIMAs (*Never in Mitosis gene A*); cinco quinases do grupo AGC (que inclui PKG, PKA e PKB, mas não homólogos a PKC) e diversos genes codificando membros de CamK, incluindo membros de quinases cálcio-dependentes (CDPKs), uma família de enzimas caracterizadas por um domínio de quinases acrescido de domínio semelhante ao de calmodulina, restrito a plantas e alveolados (ciliados, apicomplexos e dinoflagelados). Dezoito enzimas se encontram no grupo das CMGC, que inclui as MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos), CDKs (quinases dependentes de ciclinas) GSK3 (glicogênio sintase quinase) e CDK-like, relacionadas às quinases dependentes de ciclina (DOERIG et al., 2005; KAPPES; DOERIG; GRAESER, 1999).

O grupo das CK (caseína quinases) inclui CK1 e CK2. A primeira é capaz de fosforilar diversas proteínas do parasita (BARIK; TAYLOR; CHAKRABARTI, 1997). Foi reportado recentemente que CK1 está envolvida no transporte de vesículas desempenhado por proteínas do grupo das Rab-GTPsases, sendo uma proteína efetora de Rab (RACHED et al., 2012). CK2 é uma proteína quinase essencial, sendo seus substratos envolvidos em diversos processos importantes como diferenciação, proliferação, apoptose, resposta à estresse, dano ao DNA, ritmo circadiano (GRACIOTTI et al., 2014).

No grupo das CMGC, dezoito enzimas foram descritas em *Plasmodium*. Neste grupo encontram-se as famílias das CDKs, MAPK, GSK3 e CDK-like (KAPPES; DOERIG; GRAESER, 1999). As quinases pertencentes à família das CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*), comumente encontradas em eucariotos, estão ligadas à regulação do ciclo celular. A forma ativa é composta por uma subunidade catalítica, CDK, e uma subunidade regulatória, a ciclina. O grupo inclui três proteínas em *P. faciparum*, PfPK5, Pfmrk e Pfcrk1 (GEYER; PRIGGE, WATERS, 2005). No caso da proteína PfPK5, tanto a localização intracelular quanto o momento em que a proteína é expressa, sugerem que sua atividade esteja relacionada à regulação da divisão nuclear (HOLTON et al., 2003). Em Pfmrk, predominante em gametócitos, as evidências são de sua participação na diferenciação de parasitas em estágios

sexuados (LI et al., 1996). A *Pfcrk1* é regulada pós-transcricionalmente, como sugerido pelo acúmulo de mRNA em gametócitos (DOERIG et al., 1995).

Quinases do domínio das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) desempenham funções em diversos processos de transdução de sinal, como indução da proliferação, parada do crescimento celular e apoptose. São ativadas por fosforilação de duas MAPK quinases específicas em resíduos de tirosina e treonina do motivo TXY (KAPPES; DOERIG; GRAESER, 1999).

O grupo das MAPK inclui duas proteínas em *P. falciparum*, PfMAP1 e PfMAP2. PfMAP1 encontra-se presente em isoformas distintas, com peso molecular variando entre 40, 80 ou 150 kDa. A PfMAP1 de 40 kDa está presente em todo o estágio intra-eritrocítico, enquanto que as duas isoformas maiores são detectadas somente em formas maduras do parasita (GRAESER et al., 1997; KAPPES; DOERIG; GRAESER, 1999). O nocaute do gene codificante da quinase PfMAP1 levou a um aumento da atividade de PfMAP2, o que sugere que o aumento de PfMAP2 exerce uma função compensatória para suprir a ausência da PfMAP1 (DORIN-SEMBLAT et al., 2007). Por outro lado, a PfMAP2 foi reportada como uma proteína essencial para a ocorrência do ciclo assexuado dos parasitas, embora estudos em *P. berghei* tenham descrito PbMAP2 não essencial para o desenvolvimento do ciclo assexuado e gametocitogênese, mas essencial para o processo de gametogênese no mosquito vetor e exflagelação dos microgametófitos (DORIN-SEMBLAT et al., 2007).

As CaMK (calmodulina quinases) são conhecidas por serem ativadas por uma ligação de Ca^{2+} -calmodulina em uma região do domínio catalítico (Hanks e Hunter, 1995). Em *P. falciparum* existem 13 proteínas quinases deste grupo (WARD et al., 2004). Essas proteínas são caracterizadas pela presença de dois domínios funcionais, um domínio catalítico de proteína quinase e outro de regulação por meio de ligação a cálcio, sendo ativadas diretamente pelo mesmo, sem necessitar de calmodulina como proteína mediadora KAPPES; DOERIG; GRAESER, 1999).

As quinases dependentes de cálcio (CDPKs) constituem um importante grupo de quinases para o parasita da malária e outros organismos (HARPER; HARMON, 2005). *P. falciparum* tem pelo menos 5 CDPKs as quais desempenham funções chave nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita (WARD et al., 2004). PfCDPK1 é indispensável para a invasão de eritrócitos, mobilidade do parasita e citocinese. Esta proteína é expressa durante a esquizogonia do ciclo intra-eritrocítico e esporogonia no mosquito. Recentemente a proteína PfCDPK1 foi descrita como essencial para que se complete o ciclo assexuado do *P.*

falciparum. Esta afirmação baseia-se no fato de que tratamento com inibidor de PfCDPK1 (purfalcamina) promoveu um bloqueio do ciclo no estágio de esquizontes (KATO, N. et al., 2008). Foi reportado que a PfCDPK3 é uma proteína importante para o ciclo sexuado do parasita, pois o nocaute do gene que codifica esta proteína diminui cerca de duas vezes a habilidade do oocineto em infectar o intestino do mosquito (ISHINO et al., 2006). A CDPK4 está relacionada à exflagelação do gametócito masculino em resposta ao aumento de cálcio induzido pelo ácido xanturênico do mosquito vetor (BILLKER et al., 2004). PfPK2 é expressa de forma estágio-específica, localizando-se principalmente na membrana do parasita (ZHAO et al., 1992). A atividade de quinase da PfPK2 é dependente de cálcio e calmodulina. Tem sido proposto que a PfPK2 apresente um papel determinante na invasão de hemácias pelos merozoítos, visto que é expressa nesta fase, e uma tentativa de nocautear o gene de PK2 em *P. berghei* não obteve êxito, tendo os autores argumentado que a proteína é essencial para a proliferação de *P. berghei* nos estágios intra-eritrocíticos (KATO, K. et al., 2008). Esta quinase apresenta homologia a CaMK, PKA e PKC pertencendo, então, tanto ao grupo das CaMK quanto ao das AGC.

O grupo das AGC inclui a família das proteínas quinases com atividade dependente de nucleotídeos cíclicos, como cAMP e cGMP. Em *P. falciparum* foram reportadas cinco proteínas quinases pertencentes ao grupo AGC, dentre estas, as funções de PfPKA, PfPKG e PfPKB foram investigados (DOERIG et al., 2008; WARD et al., 2004). PfPKA é essencial para a multiplicação de parasitas no ciclo assexuado, visto que o inibidor desta quinase atua inibindo também o desenvolvimento de formas intra-eritrocíticas de *P. falciparum* (SYIN et al., 2001). A PKG (proteína quinase dependente de cGMP) de *Apicomplexa* é notavelmente diferente daquela de mamíferos ou aves, contendo um terceiro sítio de ligação de nucleotídeos. Este sítio contribui com a cinética de ativação do nucleotídeo, característica exclusiva das PKGs de parasitas (DIAZ et al., 2006).

A PKB de mamíferos é regulada por fosfatidil-inositol trifosfato (PIP₃) gerado a partir da atividade da enzima fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K), onde o fosfatidil-inositol interage com o domínio de homologia à plectrina (PH) de PKB. Em *P. falciparum*, PI3K é exportada para a hemácia, tendo sido notada a sua importância no tráfico de hemoglobina (VAID et al., 2010). A PfPKB de *P. falciparum* não possui o domínio de homologia à plectrina e sua ativação ocorre via cálcio-calmodulina (MARTE; DOWNWARD, 1997). A fosfolipase C (PLC) é um regulador desta via por promover a formação de IP₃ que atua na liberação de cálcio de estoques internos ao ligar-se a receptores no retículo endoplasmático (ALVES et al.,

2011). Sabe-se que PfPKB tem um papel no complexo motor de actina/miosina, o *glideosome*, utilizado por organismos como *P. falciparum* e *T. gondii*. Parasitas utilizam-se deste complexo durante a invasão de suas células hospedeiras, por meio de sua movimentação de *gliding* em torno da mesma, que antecede a formação das *tight junctions*. *Tight junctions* são junções entre a célula hospedeira e o parasita, que produzem uma infecção eficiente pelo patógeno (THOMAS et al., 2012). O grupo do Dr. Pushkar Sharma conduziu os estudos que levaram à descoberta de que a proteína 45 associada ao *glideosome* (PfGAP45), um componente essencial deste complexo, é fosforilada pela PfPKB e pela PfCDPK1 (KUMAR et al., 2004; THOMAS et al., 2012; VAID; SHARMA, 2006; VAID; THOMAS; SHARMA, 2008;).

Um grupo de cinco proteínas quinases foi identificado por análise de sequência de aminoácidos como relacionadas à família das NIMA/NEK, envolvidas na regulação do ciclo celular. PfNEK1 se assemelha a NEK2 de mamíferos, enquanto que as outras não possuem homologia clara com NEKs de mamíferos ou leveduras. As NEKs atuam na divisão celular eucariótica, tendo sido demonstrado por Reininger e colaboradores em 2009, sua importância na meiose do parasita de malária. Estas proteínas quinases atuam na regulação da replicação de DNA, bem como no bloqueio no desenvolvimento de oocinetos (REININGER et al., 2009).

Uma quinase com papel no mecanismo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é a proteína dependente de cAMP, PfPKA. Alguns dos efetores da via de PKA em *P. falciparum* já são bem conhecidos. Dentre estes efetores, um exemplo é o antígeno de membrana apical 1 (AMA1, *Apical Membrane Antigen 1*), proteína que desempenha um papel central no mecanismo de invasão de hemácias pelo parasita (AMA1, *Apical Membrane Antigen 1*) (TYLER; TREECK; BOOTHROYD, 2011). Em 2010, Leykauf e colaboradores mostraram que a fosforilação do resíduo de serina 690 de AMA1 é catalisada pela PfPKA. A mutação da serina 690 para alanina impossibilita a fosforilação de AMA1 *in vivo* e diminui dramaticamente a invasão (LEYKAUF et al., 2010).

PfPK7 é uma quinase órfã do genoma de *P. falciparum* que mostrou atuação no ciclo sexuado e assexuado do parasita (DORIN-SEMBLAT et al., 2008). Também foi demonstrado o envolvimento da proteína quinase PfPK7 na sinalização promovida pela melatonina. A melatonina é capaz de modular o ciclo intraeritrocítico do parasita pelo aumento no número de esquizontes bem como diminuição no número de parasitas na fase anel (HOTTA et al., 2000). Koyama e colaboradores investigaram o papel de PK7 e descobriram que *P.*

falciparum nocauteado para o gene de PfPK7 tem a mobilização de Ca^{2+} induzida pela melatonina diminuída comparado a parasitas selvagens, e não tem seu ciclo regulado pela melatonina, sugerindo que PK7 seja uma quinase modulada na via de sinalização de melatonina (KOYAMA et al., 2012). Por outro lado, a expressão episomal do gene PfPK7 nos parasitas PfPK7⁻ restabeleceu a capacidade do hormônio em modular o ciclo de vida. Estes resultados são indícios da importância dos eventos de fosforilação na via de transdução de sinal estimulada pela melatonina.

Outra importante família de quinases que tem implicações para o ciclo de vida de *P. falciparum* é a família das quinases de fatores de iniciação da tradução protéica. Nesta espécie, estas quinases são denominadas PfeIKs (*Plasmodium falciparum* *eucaryotic Initiation factor Kinases*). Em *Plasmodium* foram identificadas três quinases com atividade de fosforilação de PfeIF2 em sua subunidade alfa (PfeIF2 α), PfeIK1, PfeIK2, e PfPK4 (WARD et al., 2004). Verificou-se ainda que esporozoítos, os quais são quiescentes enquanto dentro da glândula salivar do mosquito (BOYD; STRATMAN-THOMAS; KICTHEN, 1936; PORTER; LAIRD; DUSSEAU, 1954; SHERMAN, 1998), apresentarão diferenciação quando dentro dos hepatócitos do hospedeiro vertebrado. Foi demonstrado que quando estes esporozoítos são injetados no hospedeiro mamífero, uma fosfatase remove o grupo fosfato de eIF2 α fosforilado. A repressão da tradução é então atenuada, o que permite o desenvolvimento dos esporozoítos em estágios infectantes do fígado (ZHANG et al., 2010). Foi ainda demonstrado que o nocaute da quinase PfeIK2 transforma-se prematuramente em formas que infectam o fígado, e perdem sua infectividade neste órgão. Isto sugere que esta transformação esteja correlacionada à mudança no programa de expressão protéica controlado pela fosforilação de eIF2 α nesta fase do ciclo de vida de *Plasmodium* (ZHANG et al., 2010). Este exemplo no desenvolvimento dos esporozoítos permite ilustrar o controle da expressão de proteínas no desenvolvimento dos estágios do ciclo de vida de *Plasmodium*.

O controle de expressão de proteínas é importante no ciclo celular de qualquer organismo, haja visto a ampla gama de sinais a que uma célula deve responder para permitir o ajuste fino de sua homeostase, característica tão marcante dos organismos vivos. Assim, foi descrita a importância de componentes-chave neste processo em eucariotos (KEDERSHA; ANDERSON, 2007). São notáveis estruturas que controlam a dinâmica de RNAs após sua síntese, como grânulos de estresse (GE) e corpos de processamento (CP). GE são importantes para a tradução de proteínas, e têm nos fatores de iniciação (eIFs) e PABP (*poli-(A) binding protein*) seus componentes principais. CP estão relacionados à degradação de mRNAs,

controlando a tradução de proteínas. No contexto da infecção por organismos patogênicos, níveis e localização dos RNAs mensageiros (mRNAs) ao longo de todo seu ciclo de vida devem ser regulados por estes parasitas a fim de garantir que suas necessidades bioquímicas e celulares sejam adequadamente supridas (CHERRY; ANANVORANICH, 2014). Estudos recentes têm demonstrado como o parasita controla a expressão de alguns componentes de sua rede de genes de forma precisa na dimensão espaço-temporal. PABP é uma proteína que se liga à cauda poli-A de RNAs mensageiros e controla a estabilidade destes e a tradução de outras proteínas. Em *P. berghei*, foi demonstrado que o nocaute da quinase 2 do fator de iniciação eIF2 (PbeIK2), não apresentou complexos entre eIF2 α fosforilado e PABP. Esta observação ilustra uma regulação a nível de mRNA das proteínas-alvo, por eIF2 e por uma de suas quinases, PbeIK2 (ZHANG et al., 2010).

Mecanismos correlatos do controle da expressão de proteínas nos estágios de vida celular são também estudados em outro parasita Apicomplexa, do gênero *Toxoplasma*. Sabe-se que a transição de estágio de taquizoítas, que apresentam metabolismo acelerado, para bradizoítas, de taxas lentas, ocorre em resposta ao estresse induzido pela resposta imunológica do hospedeiro. Alguns estudos sugerem que o envolvimento de quinases de fatores de iniciação, bem como de proteínas de choque térmico (HSPs) desempenhem papel importante tanto na transição bradizoítas-taquizoítas quanto na transição inversa. Desta forma, há evidências de que as diferenças de expressão protéica nos dois estágios de *T. gondii*, bem como a própria existência dos dois estágios, podem ser entendidas sob controle da regulação desempenhada pelas quinases dos fatores de iniciação (WEISS; KIM, 2000).

O processo pelo qual os fatores de iniciação da tradução protéica (eIFs) desempenham seu papel é complexo. Para que a tradução ocorra, é necessário que GTP seja hidrolisado a GDP, o que causa a inativação do complexo (IF2-GDP). Novos ciclos de tradução requerem eIF2 reativado pela troca de GDP por GTP por intermédio do fator de troca de nucleotídeo de guanina eIF2B. Em mamíferos, o mecanismo de controle da tradução é regulado pela fosforilação do resíduo 51 de serina na subunidade α de eIF2. Uma vez que esta subunidade é fosforilada, eIF2B não pode exercer sua atividade de troca de GDP por GTP, reprimindo assim, a tradução global de proteínas. Desta forma, o papel global das quinases de eIF2 α é regular o início da tradução protéica. Em *P. falciparum*, o nocaute da quinase PfeIK1 não é capaz de fosforilar a subunidade alfa do fator de iniciação da tradução protéica eIF2 em resposta à privação de aminoácidos (FENNELL et al., 2009).

Em 2010, foi demonstrado que o nocaute para *pfeik1* perde a capacidade de modulação devida ao tratamento com melatonina (RIBEIRO, 2010). Esta observação leva à questão de quais proteínas têm sua expressão modulada pela melatonina via proteína quinase PfeIK1. De acordo com Fennell e colaboradores, o gene *pfeik1* não está envolvido no desenvolvimento sexual do parasita, sugerindo que de fato, as mudanças na expressão protéica devido à fosforilação de PfeIF2 α por PfeIK1 sejam importantes em eventos do ciclo intra-eritrocítico (FENNELL et al., 2009).

A Figura 6 ilustra um possível modelo para o papel da fosforilação de PfeIF2 α por PfeIK1 em *Plasmodium falciparum* e a repressão da síntese protéica desencadeada pela modificação no fator. O mecanismo foi sugerido com base em observações em *Toxoplasma gondii* (SULLIVAN et al., 2004). Os mecanismos pelos quais ocorre a repressão, assim como a tradução de outras proteínas em resposta à fosforilação de PfeIF2 α precisam ser investigados em *P. falciparum*.

Figura 6. Mecanismo de fosforilação de PfeIF2 α pela quinase PfeIK1. A fosforilação de eIF2 em sua subunidade alfa leva à repressão da tradução de proteínas específicas, em resposta à privação de nutrientes. Enzimas capazes de promover remodelamento de cromatina e por consequência, mudança na expressão gênica, são ativadas em outros organismos, sugerindo um mecanismo em *Plasmodium*. Adaptado de Wek, Jiang e Anthony, 2006; baseado em Weiss e Kim, 2000; Sullivan et al., 2004 e Fennell et al., 2009.

1.5 Proteínas fosfatases e íon K^+ (potássio) envolvido na secreção das organelas micronemas

Paralelamente aos eventos de fosforilação promovidos pelas proteínas quinases, o mecanismo de defosforilação de resíduos de aminoácidos é desempenhado pelas proteínas fosfatases. A fosforilação reversível de proteínas é um mecanismo de modificação pós-traducional que regula diversas funções biológicas. As fosfatases dividem-se em dois grupos funcionais. O primeiro é o das tirosina-fosfatases, que defosforilam resíduos de tirosina. O segundo grupo, serina/treonina fosfatases, defosforila resíduos de serina e treonina (DOBSON et al., 2001). Os genes que codificam serina/treonina fosfatases dividem-se em dois grupos, família PPP e a família PPM. A família principal, PPP, é integrada pelas enzimas PP1, PP2A e PP2B (calcineurina), que possuem similaridade em sua sequência primária (GRAVES; KREBS, 1999). A outra família, PPM, é composta por fosfatases dependentes de Mg^{2+} que diferem entre si em sua estrutura primária, porém assemelham-se na estrutura terciária às fosfatases PPP (DAS et al., 1996). A proteína serina/treonina PP2C é a única pertencente à família PPM (AOYAMA et al., 2003).

A serina/treonina fosfatase PP2B, também conhecida como calcineurina, é conservada de leveduras a humanos. Esta proteína desempenha uma importante função na ativação de células T e é ativada especificamente em resposta à sinalização de Ca^{2+} -calmodulina. Devido à importância desta fosfatase na resposta desencadeada pela liberação intracelular de cálcio, bem como pelo papel deste cátion como segundo mensageiro no gênero Apicomplexa, é interessante entender os processos em que a calcineurina está envolvida em *Plasmodium* (HEMENWAY; HEITMAN, 1999).

Durante a invasão dos eritrócitos, proteínas presentes na superfície dos merozoítos e proteínas secretadas pelas organelas associadas à membrana apical, roptrias e micronemas, participam ativamente do processo de maneira tempo-dependente. O grupo do Dr. Chitan Chitnis demonstrou o envolvimento do cálcio como segundo mensageiro nesta sinalização (SINGH; CHITNIS, 2012; SINGH et al., 2010; SINGH; MORE; CHITNIS, 2013). Estes pesquisadores verificaram que a exposição de merozoítos a baixas concentrações de potássio (K^+), próximas àsquelas encontradas no plasma sanguíneo (5 mM) promove liberação de cálcio citoplasmático nos parasitas, levando à secreção das proteínas dos micronemas (SINGH et al., 2010). Em trabalho de 2014, o grupo tratou merozoítos de *P. falciparum*, isolados em 140 mM de K^+ , com os inibidores de calcineurina FK506 e ciclosporina A, antes da transferência dos

parasitas para um ambiente com baixa concentração de K^+ (5 mM). O que se pôde concluir então foi que a transição dos merozoítos de 140 para 5 mM de K^+ possibilitou a liberação de proteínas das micronemas, notavelmente a proteína antígeno apical de membrana 1 (AMA1) (Figura 7). O uso de inibidores de calcineurina resultou na inibição da secreção de AMA1 para a membrana dos merozoítos, impedindo o processo de invasão dos eritrócitos pelo parasita (SINGH; MORE; CHITNIS, 2014). Foi sugerido então que a calcineurina tivesse uma função no processo da dinâmica da actina para invasão dos parasitas às hemácias. A inibição da calcineurina resultou em redução na defosforilação e despolimerização da actina apical, aparentemente crítica para a secreção de proteínas dos micronemas. O uso de inibidores de calcineurina resultou em aumento na fosforilação de actina (SINGH; MORE; CHITNIS, 2014). Estes resultados sugerem o envolvimento de uma via dependente de potássio no processo de invasão do parasita, sendo calcineurina uma fosfatase efetora. Os receptores responsáveis pela transmissão do estímulo de potássio para o interior do parasita ainda não foram reportados (SINGH; CHITNIS, 2012). As conclusões do grupo para uma possível função de K^+ na descarga de proteínas das micronemas são resumidas na Figura 7.

Figura 7. Papel de K^+ na ativação de calcineurina. A ativação da fosfatase leva à defosforilação e despolimerização de actina, para liberação de proteínas dos micronemas de *P. falciparum*. Em A, é mostrada a hemácia no plasma sanguíneo, de concentração de K^+ aproximadamente 5 mM. O interior da hemácia, a ser invadido pelo parasita, apresenta concentração de 140 mM de K^+ . Em B, o papel da fosfatase calcineurina é evidenciado na despolimerização da actina fibrilar, a qual impede a liberação de proteínas dos micronemas. A despolimerização da actina fibrilar a actina globular tem como consequência a liberação de proteínas dos micronemas. Figura modificada de Singh, More e Chitnis, 2013.

1.6 Receptores acoplados à proteína G e K^+ : evidências em *P. falciparum*

Diversos estudos e grupos demonstraram a importância do íon K^+ como regulador de eventos durante o desenvolvimento de parasitas Apicomplexas (CHITNIS; STAINES, 2013; KUMAR et al. 2007; MOUDY; MANNING; BECKERS, 2001, ONO et al. 2008; SINGH et al. 2010, SINGH; MORE; CHITNIS, 2014).

Mota e colaboradores (2001) estudaram o processo de *traversing*, pelo qual esporozoítos atravessam células do fígado, em contato com o meio intracelular destas células, que apresenta alta concentração de K^+ , sem formação de vacúolo parasitóforo, até chegar à célula em que sofrerá mudança de formato e desenvolvimento em merozoítos. Os autores sugerem que o processo seja importante para que o parasita ative vias de sinalização para seu posterior desenvolvimento dentro do hepatócito (MOTA et al., 2001). Foi observado que 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 importantes para os merozoítos no processo de entrada nas hemácias são os nucleotídeos. Foi observado que a incubação de esporozoítos com nucleotídeos de uracila (UMP, UDP e UTP) induz o aumento da exposição da proteína TRAP, importante na invasão, na membrana plasmática do parasita (ONO et al., 2008). Foi demonstrado ainda que derivados de uracila ativam a via do cAMP em esporozoítos. Um bloqueador de adenilato ciclase inibe a secreção quando os parasitas são estimulados com derivados de uracila. Os autores fortalecem a hipótese da participação de cAMP no processo de ativação dos merozoítos por nucleotídeos de uracila através de um nocaute da adenilato ciclase α de *P. berghei* (ONO et al., 2008). Os parasitas nocautes expõem uma menor quantidade do antígeno TRAP na membrana quando estimulados com derivados de uracila comparados aos parasitas selvagens (ONO et al., 2008). É importante ressaltar que a adenilato ciclase α (AC) possui um domínio com alta homologia a canal de potássio (WEBER et al., 2004). 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). Estes dados sugerem que K^+ induz a ativação de AC α e a síntese de cAMP.

Em adição, em estudos com parasitas de malária de roedor, *Plasmodium berghei*, Kumar e colaboradores verificaram em 2007 que em esporozoítos incubados em tampão com alta concentração de potássio e colocados em cultura com células de carcinoma hepático

(HepG2), observa-se um aumento de parasitemia em relação a esporozoítos incubados com tampão rico em Na^+ (KUMAR et al., 2007). Utilizando 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).

Moudy e colaboradores, trabalhando com *Toxoplasma* em 2001, mostraram que a diminuição de K^+ na célula hospedeira resulta em um aumento de cálcio dependente de PLC no citoplasma do parasita. Este aumento, segundo o grupo, é suficiente para desencadear o egresso do parasita, um sinal para progredirem no ciclo celular (MOUDY; MANNING; BECKERS, 2001). Trabalhos realizados por outros grupos trouxeram evidências adicionais de que o sinal do K^+ é transmitido ao interior celular por meio do Ca^{2+} , ativando a liberação de proteínas das organelas apicais roptrias e micronemas de onde são direcionadas para a membrana do parasita. Em *Plasmodium*, estas proteínas desempenham função importante na formação do complexo motor de actina-miosina, o qual é responsável pela invasão das hemácias (BAUM et al., 2006; OLSHINA, WONG; BAUM, 2012; SINGH et al., 2010; SINGH; MORE; CHITNIS, 2014).

Por outro lado, foi demonstrado que o remodelamento catiônico, há muito conhecido em hemácias parasitadas por *Plasmodium*, não é essencial para o desenvolvimento do ciclo biológico do parasita (PILLAI et al., 2013). Sabe-se que este parasita induz modificações nas concentrações de diversos íons no citoplasma da célula, incluindo Na^+ e K^+ (GINSBURG et al., 1983). Desta forma, o parasita da malária, ao invadir a hemácia, passa de um ambiente de baixa concentração de potássio, ao redor de 5 mM no plasma sanguíneo, para o interior da célula do sangue, o qual, pelo menos no início, possui alta concentração do íon (CHITNIS; STAINES, 2013). Os resultados observados por Pillai e colaboradores demonstram que estas modificações, notavelmente a de K^+ , não possuem um papel fundamental para a biologia do parasita, sugerindo que o mesmo se utilize de outros mecanismos para evadir da célula hospedeira (PILLAI et al., 2013).

Em 2008, nosso laboratório identificou 4 candidatos a GPCR em *P. falciparum* (MADEIRA et al., 2008). , c e Budu proveram evidências de que um dos quatro possíveis GPCRs encontrados no genoma de *P. falciparum*, PfSR25, é ativado por K^+ (em fase de elaboração)². Ensaios de cálcio utilizando células HEK293T transfectadas com PfSR25 demonstraram que estas células são capazes de responder diferencialmente quando

---

² MORAES, M. S.; BUDU, A. et al.: PfSR25, a malarial GPCR-like receptor, is a sensor for volume change that is coupled to Ca^{2+} signaling.

comparadas à célula transfectada com o vetor vazio em resposta a K^+ . Experimentos realizados com parasitas nocauteados para este receptor demonstraram que o aumento de cálcio intracelular após tratamento com K^+ em parasitas selvagens é abolido, o que coloca PfSR25 como uma peça chave na sinalização por K^+ em *P. falciparum*.

Visto que PfSR25 é um receptor responsivo a K^+ , nesta dissertação investigamos sua sinalização em resposta a diversos estímulos do íon. Avaliamos diferenças no padrão de fosforilação de proteínas utilizando anticorpos que reconhecem aminoácidos fosforilados em resíduos de serina/treonina e tirosina e Pro-Q Diamond, que identifica fosfoproteínas totais. Um grupo controle, tratado com 5,4 mM de KCl foi comparado a um grupo tratado com 1 mM de KCl, por cinco minutos a 37 °C, em células transfectadas com PfSR25 e em parasitas selvagens e nocautes de PfSR25. Além disso, investigamos parasitas isolados sem estímulo e tratados com 140 mM de KCl através de eletroforese bidimensional a fim de verificar diferenças no fosfoproteoma devidas a PfSR25.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar diferenças de fosforilação entre parasitas 3D7 selvagem e nocaute para o putativo GPCR PfSR25 (PfSR25⁻).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferenças em expressão de proteínas entre parasitas 3D7 selvagem e nocaute de PfSR25.
- Avaliar diferenças na fosforilação de proteínas de parasitas 3D7 selvagem e nocaute de PfSR25, com estímulo de KCl.
- Identificar papel de proteínas na via de PfSR25.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo e transfecção de células HEK293T

Células HEK293T foram crescidas em meio DMEM Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) em estufa com 5 % de CO₂ a 37 °C. Aproximadamente 10⁶ células foram transfectadas utilizando o reagente Lipofectamina (Invitrogen), com 8 µg do vetor pcDNA3.1 (-) contendo a sequência codificadora para o receptor PfSR25 codon-otimizada (PlasmoDB MA17P1.64) ou pcDNA3.1 (-). Os experimentos foram realizados 24 – 48 horas após a transfecção.

3.2 Detecção da expressão de PfSR25 em células HEK293T transfectadas através de imunofluorescência

Células HEK293T transfectadas com pcDNA3.1(-)-PfSR25 foram crescidas em placas de microscopia confocal (Mattek, U.S.A.) durante 48 h. 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 NH₄Cl (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 TOPRO-3 1:3000 por 10 min em PBS. As células foram lavadas 2 vezes com PBS durante 5 min. e analisadas em microscópio confocal Carl Zeiss LSM 510 Meta (Alemanha).

3.3 Estímulo de células HEK293T

Células plaqueadas tiveram meio de cultura removido e foram gentilmente lavadas com PBS a temperatura ambiente, evitando-se a remoção das mesmas da placa. Os tratamentos foram feitos com os tampões indicados na Tabela 1, por 5 minutos a 37 °C. Foram comparados os grupos 5,4 mM (Controle) e 1 mM de KCl. O pH dos tampões foi ajustado para 7,4. Após o estímulo, a reação foi parada por 5 minutos no gelo. Centrifugou-se as células por 5 minutos a 10000 rpm, removeu-se o sobrenadante acrescentando-se inibidores de protease (pepistatina 20 µg/mL, leupeptina 20 µg/mL, quimostatina 20 µg/mL, antipaína 20 µg/mL, benzamidina 2 mM, PMSF 1 mM) e de fosfatase (NaF 10mM; Na₃VO₄ 10 mM; Pirofosfato de sódio 10 mM; β-glicerofosfato de sódio 10 mM). As células foram congeladas para posterior lise.

Tabela 1. Componentes de tampões para tratamento de células HEK293T transfectadas.

Substância	Condições experimentais	
	Controle (CT)	1 mM
KCl	5,4 mM	1,0 mM
Na ₂ HPO ₄	0,3 mM	0,3 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,4 mM
NaHCO ₃	4,2 mM	4,2 mM
MgCl ₂	0,5 mM	0,5 mM
MgSO ₄	0,6 mM	0,6 mM
NaCl	137,0 mM	141,0 mM
D-glicose	5,6 mM	5,6 mM
CaCl ₂	2,0 mM	2,0 mM

3.4 Extração de proteínas de células HEK293T

Células foram lisadas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, deoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%), acrescido dos inibidores de protease e fosfatase por 30 minutos a 4 °C. O lisado celular foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de Bradford. 50 µg de proteína de cada amostra foram fervidos durante 5 minutos e submetidos a SDS-PAGE 10%. Realizou-se a transferência para membrana de PVDF GE Healthcare (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra). A membrana foi bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente em TBS-T/3% de BSA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,01%, pH 7,4). A membrana foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo para resíduos fosforilados de serina e treonina (Cell Signaling) diluído 1:5000 em TBS-T/3% de BSA *overnight* a 4° C. A membrana foi lavada 3 vezes de 15 minutos em TBS-T e incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a HRP (GE Healthcare). Após lavagem por três vezes de 15 minutos com TBS- T, a atividade de peroxidase foi detectada pela técnica de ECL (GE Healthcare).

3.5 Cultivo, sincronização, isolamento e estímulo de *P. falciparum*

P. falciparum (cepa 3D7 e clone PfSR25⁻) foram mantidos em cultura contínua (37°C em RPMI 1640 acrescido de 10% Albumax (Invitrogen) de acordo com Trager e Jansen (Trager e Jensen, 1976). Culturas foram mantidas sob atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. A cultura foi sincronizada com 5% sorbitol (Lambros e Vanderberg, 1979) e parasitemias de 5 – 10% de estágio de interesse foram obtidas. Parasitemia e sincronia foram monitoradas através de lâminas coradas com Panótico Rápido Labclin (Pinhais, Paraná, Brasil). Os eritrócitos em cultura infectados com *P. falciparum* foram coletados e lavados duas vezes com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) a 5.000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, os eritrócitos foram tratados com saponina 0,05 %/PBS acrescida de inibidores Sigma (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) antipaina, pepstatina A, leupeptina e quimostatina, 20 µg/ml cada (Sigma, USA), benzamidina 2 mM e PMSF 1 mM (Sigma, USA), até a lise dos eritrócitos. Os parasitas foram separados por

centrifugação a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C e lavados três vezes com PBS. Quando indicado, os parasitas foram estimulados com os tampões descritos na Tabela 2, por 5 minutos a 37 °C.

Tabela 2. Componentes de tampão M utilizado para estímulo de parasitas.

Substância	Condições experimentais	
	Controle (CT) 5mM KCl	1 mM KCl
NaCl	116 mM	120,4 mM
KCl	5,4 mM	1,0 mM
MgSO ₄	0,8 mM	0,8 mM
D-glicose	5,5 mM	5,5 mM
MOPS	50 mM	50 mM

A reação foi parada no gelo, por cinco minutos, e as células peletadas a 10000 rpm por um minuto. Acrescentou-se às células inibidores de protease (pepstatina 20 µg/mL, leupeptina 20 µg/mL, quimostatina 20 µg/mL, antipaina 20 µg/mL, benzamidina 2 mM, PMSF 1 mM) e de fosfatase (NaF 10mM; Na₃VO₄ 10 mM; Pirofosfato de Sódio 10 mM; β-Glicerofosfato de Sódio 10 mM). As células foram congeladas para posterior lise.

3.6 Extração de proteínas de *P. falciparum*

As células foram lisadas em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, deoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%), ou tampão comercial *destreak* (GE Health are), por 30 minutos a 4 °C, acrescidas dos inibidores de protease e fosfatase. O material foi sonificado 3 vezes por 10 segundos a amplitude de 50%, mantendo-se sempre em gelo. O lisado celular foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado

e quantificado pelo método de Bradford. Quando indicado, 50 µg de proteína de cada amostra foram submetidos a 98,5 °C durante 5 minutos e submetidos a SDS-PAGE 10%. Amostras lisadas em tampão *destreak* foram submetidos a 37 °C.

Realizou-se a transferência para membrana de PVDF (GE Healthcare) com etapa de bloquio de membrana por 1 hora a temperatura ambiente em TBS-T/3% de BSA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,01%, pH 7,4). A membrana foi depois incubada por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo para resíduos fosforilados de serina e treonina ou tirosina (Cell Signaling) diluídos 1:5000 em TBS-T/3% de BSA *overnight* a 4° C. A membrana foi lavada 3 vezes de 15 minutos em TBS-T e incubada por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a HRP (GE Healthcare). Após lavagem por três vezes de 15 minutos com TBS- T, a atividade de peroxidase foi detectada pela técnica de ECL (GE Healthcare).

3.7 Controle da quantidade de proteínas

O total de proteína aplicada nos diversos géis foi confirmado, após dosagem por Bradford, por meio de *western-blotting* com anticorpo anti-actina ou tubulina, de coelho ou mouse na diluição 1:5000 e 1:2000, respectivamente. Quando indicado, utilizou-se a coloração com Coomassie. Após a corrida, o gel foi fixado em 50% etanol e 10% ácido acético, durante uma hora. A seguir, a solução de fixação foi substituída por 50% metanol e 10% ácido acético e o gel foi mantido nesta solução *overnight*, sob leve agitação. Ao final deste período, esta solução foi removida e o gel corado por quatro horas com 0,1% Coomassie blue R350, 20% metanol e 10% ácido acético sob leve agitação. O gel foi descorado (50% metanol e 10% ácido acético) até que as bandas fossem visualizadas em um gel sem *background* de corante, e mantido em solução 5% de ácido acético.

3.8 Eletroforese em gel 2D de proteínas de *Plasmodium falciparum*

3.8.1 Primeira dimensão: Isofocalização

A primeira dimensão da eletroforese foi realizada em tiras de 13 cm com pH de 3-10 (GE HealthCare ^{TM}, EUA), ativamente hidratadas com extratos de proteína durante 12 horas. Os extratos de proteínas foram obtidos da seguinte forma. Proteínas de parasitas *P. falciparum*

foram lisadas com tampão comercial *destreak* (GE HealthCare ^{TM}, EUA). Após a lise, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford. 500µg de proteínas totais foram diluídas, em volume final reajustado para 250µl de *destreak*, acrescidos de inibidores de protease e fosfatase e tampão IPGphor GE Healthcare (3 µl). Em seguida as proteínas contidas nas fitas foram focalizadas para acumular 11.300 Vh a 20 ° C em sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare) (Tabela 3). As proteínas focalizadas em tiras foram submetidas a uma etapa de equilíbrio com tampão de amostra 1x (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 1% β-mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol).

Tabela 3 Etapas da focalização em sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). A corrente utilizada foi 50 µA/fita, a 20 °.

Passo	Característica	Voltagem (V)	Tempo ou voltagem-hora
1	Instantâneo	500	500 Vh
2	Gradual	1000	800 Vh
3	Gradual	8000	11300 Vh
4	Instantâneo	8000	4500 Vh
5	Instantâneo	500	18h
6	Instantâneo	8000	1 h

3.8.2 Segunda dimensão: SDS-PAGE

Após a etapa de equilíbrio, a segunda dimensão da eletroforese foi executada em 7-16% SDS-PAGE e tampão de corrida (4M Tris, 1,92 M Glicina, 0,1 % SDS) por 135 min a 100 V.

3.8.3 Coloração de fosfoproteínas e proteínas totais com kits comerciais

Fosfoproteínas e proteínas totais foram identificadas em gel bidimensional pela coloração com corantes comerciais Pro-Q Diamond e Sypro Ruby (Invitrogen™, Eugene, Oregon - EUA), respectivamente, de acordo com manual do fabricante. Os géis foram corados com Pro-Q Diamond (excitação 550 nm; emissão 600 nm), fotografados, corados com Sypro Ruby (excitação 450 nm; emissão 532 nm) e fotografados novamente.

3.8.4 *Análise de gel 2D*

Os géis foram digitalizados utilizando *scanner* ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). O *plugin* do ImageJ (NIH, Bethesda, MD- USA) *watershed* (<http://bigwww.epfl.ch/sage/soft/watershed/>) foi utilizado para medida da intensidade dos *spots* identificados. *Spots* identificados tiveram a intensidade da fosforilação normalizada pelos valores da intensidade da carga total de proteínas. Os valores das normalizações dos *spots* assim obtidos com $p < 0,05$ foram considerados diferencialmente fosforilados.

3.8.5 *Identificação de proteínas e análise de dados a partir de espectrometria de massas (MS)*

Spots de proteínas diferenciais em nível de fosforilação obtidos a partir de 2D-PAGE foram isolados, colocados em água mili-q e enviados para identificação em espectrometria de massas na Taplin Mass Spectrometry Facility, Massachussetts – EUA. Peptídeos identificados a partir dos *spots* foram confirmados em PlasmDB (www.plasmodb.org), UniProt (<http://www.uniprot.org>) e os seus números de acesso obtidos. Números de acesso do banco de dados para cada proteína foram obtidos a partir do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.9 *Análise estatística*

As comparações foram feitas utilizando-se teste de médias t de student. Para as análises de *western-blot*, com base em Gassmann et al., (2009) que observou que a literatura apresenta p-valores variando de $1,29 \times 10^{-5}$ a $7,6 \times 10^{-1}$ para *western-blots*, consideramos

estatisticamente significativos p-valores $< 0,1$. Para as demais análises, p-valores $< 0,05$ foram considerados significativos.

3.10 Isolamento de proteínas para espectrometria de massas

Bandas de proteínas de interesse provenientes de SDS-PAGE dos diferentes experimentos foram recortadas com lâmina limpa em etanol 70% e água mili-Q. *Spots* provenientes de eletroforese bidimensional foram removidos com ponteira de 200 μ l.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo do perfil de fosforilação de proteínas de células HEK293T transfectadas com gene PfSR25 de *Plasmodium falciparum*, candidato a receptor serpentino, em resposta ao estímulo de KCl

Resultados de pesquisas de nosso laboratório, utilizando células HEK293T transfectadas transientemente com PfSR25, mostraram que estas células quando tratadas com KCl, de forma dose-dependente, apresentam aumento de cálcio citosólico quando comparadas às células transfectadas somente com o vetor vazio (em fase de elaboração)³. Uma das mais importantes funções de segundos mensageiros, como cálcio, é regular o grau de fosforilação de proteínas intracelulares, promovendo a fosforilação de proteínas por meio da ativação de quinases, ou revertendo este processo através de fosfatases.

Deste modo, para investigar o papel do receptor serpentino de *Plasmodium* PfSR25, no padrão de fosforilação celular após tratamento com KCl, células HEK293T foram transfectadas, de modo transiente, com vetor vazio ou com o vetor contendo o cDNA do receptor. A Figura 8 mostra células HEK293T transfectadas com o receptor PfSR25.

---

³ MORAES, M. S.; BUDU, A. et al.: PfSR25, a malarial GPCR-like receptor, is a sensor for volume change that is coupled to Ca²⁺ signaling.

Figura 8. Transfecção de células HEK293T com PfSR25. 48h após a transfecção, células HEK293T-PfSR25 foram incubadas com o anticorpo de camundongo anti-flag (1:500), que reconhece um epítipo adicionado à porção C-terminal de PfSR25. O anticorpo secundário para detecção em microscopia foi anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa488 (1:300). O DNA das células foi marcado com TOPRO-3 1:3000. A) PfSR25 detectado em verde, mostrando a transfecção de HEK293T com PfSR25. B) Contraste de fase. C) Marcação de DNA do núcleo de células HEK293 (vermelho). D) Sobreposição de A, B e C.

A Figura 8 A mostra que a expressão de PfSR25 ocorreu em células HEK293T. Após 48 horas da transfecção, as células HEK293T foram tratadas com KCl 5,4 (CT) e 1 mM durante 5 minutos. Em seguida avaliou-se o padrão de fosforilação utilizando-se o anticorpo anti-fosfo- serina/treonina 1:2000. A Figura 9 mostra o perfil de proteínas fosforiladas de células HEK293T após tratamento das mesmas. A Figura 9 A mostra um gel de SDS contendo proteínas isoladas a partir de células não transfectadas (*mock*) e células transfectadas (PfSR25). A Figura 9 B mostra a análise densitométrica das bandas observadas em A, tendo a actina como normalizador.

Figura 9. Perfil de fosforilação de serinas-treoninas em proteínas de células HEK293T transfectadas com receptor PfSR25 A) Gel de SDS-PAGE de proteínas tratadas com KCl 5,4 mM (CT - Controle) e KCl 1,0 mM (1 mM). B) Valores relativos de fosforilação em bandas de 80, 60 e 35 kDa. Dado representativo de 3 experimentos independentes. A quantidade de proteína em cada ponto foi controlada através da expressão de β -actina.

Os experimentos foram submetidos à análise densitométrica utilizando-se o *software* Image J. Os valores de fosforilação foram normalizados pela expressão da actina. As Tabelas 4, 5 e 6 fornecem a análise estatística dos valores de fosforilação normalizados das bandas correspondentes às proteínas de 80, 60 e 35 kDa, respectivamente.

Quando observamos as bandas de 80 e 60 kDa verificamos que sob condições normais (5,4 mM KCl, CT) as células transfectadas com PfSR25 apresentam um nível basal de fosforilação maior quando comparado às células transfectadas com o vetor vazio. Por outro lado, a diminuição de KCl para 1 mM promoveu uma tendência de aumento na fosforilação destas bandas nas células transfectadas com o vetor vazio, o mesmo não sendo observado para as células transfectadas com PfSR25 (Figura 9). As Tabelas 4, 5 e 6 resumem a análise estatística dos dados. A banda de 35 kDa não sofreu alteração de fosforilação, confirmando que as diferenças observadas não são devidas a diferenças na quantidade de proteínas. Estes

resultados sugerem o envolvimento de quinases e/ou fosfatases na via de transdução de sinal por KCl desencadeada a partir da ativação de PfSR25, sendo necessária a confirmação dos mesmos resultados utilizando tratamento semelhante em *P. falciparum*.

Tabela 4. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 80 kDa de células HEK293T transfectadas com PfSR25 e vetor vazio. Os tratamentos foram 5,4 ou 1 mM de KCl. Utilizou-se o *software* Graphpad Prism para análise dos resultados. * Valores significativos. Ns – Valores não significativos.

Abordagem	Grupo	Comparação do teste t	Média ± SEM	P-valor	Resultado
Normalização pela actina	5,4 mM	PfSR25	1.297 ± 0.1530 N=3	0,0346	*
		Mock	0.7440 ± 0.08607 N=3		
	1 mM	PfSR25	1.129 ± 0.3259 N=3	0,6788	Ns
		Mock	0.9670 ± 0.1625 N=3		
	PfSR25	Controle (5,4 mM)	1.297 ± 0.1530 N=3	0,6663	Ns
		1 mM	1.129 ± 0.3259 N=3		
	Mock	Controle (5,4 mM)	0.7440 ± 0.08607 N=3	0,2920	Ns
		1 mM	0.9670 ± 0.1625 N=3		

Tabela 5. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 60 kDa de células HEK293T transfectadas com PfSR25 e vetor vazio. Os tratamentos foram 5,4 ou 1 mM de KCl. Utilizou-se o *software* Graphpad Prism para análise dos resultados. * Valores significativos. Ns – Valores não significativos.

Abordagem	Grupo	Comparação do teste t	Média ± SEM	P-valor	Resultado
Normalização pela actina	5,4 mM	PfSR25	1.017 ± 0.1740 N=3	0,0929	*
		Mock	0.6214 ± 0.04589 N=3		
	1 mM	PfSR25	0.8698 ± 0.1680 N=3	0,5367	Ns
		Mock	0.7374 ± 0.1014 N=3		
	PfSR25	Controle (5,4 mM)	1.017 ± 0.1740 N=3	0,5760	Ns
		1 mM	0.8698 ± 0.1680 N=3		
	Mock	Controle (5,4 mM)	0.6214 ± 0.04589 N=3	0,3562	Ns
		1 mM	0.7374 ± 0.1014 N=3		

Tabela 6. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 35 kDa de células HEK293T transfectadas com PfSR25 e vetor vazio. Os tratamentos foram 5,4 ou 1 mM de KCl. Utilizou-se o *software* Graphpad Prism para análise dos resultados. * Valores significativos. Ns – Valores não significativos.

Abordagem	Grupo	Comparação do teste t	Média ± SEM	P-valor	Resultado
Normalização pela actina	5,4 mM	PfSR25	0.8033 ± 0.01202 N=3	0,8040	Ns
		Mock	0.7833 ± 0.07446 N=3		
	1 mM	PfSR25	0.7700 ± 0.02309 N=3	0,6683	Ns
		Mock	0.8033 ± 0.06839 N=3		
	PfSR25	Controle (5 mM)	0.8033 ± 0.01202 N=3	0,2696	Ns
		1 mM	0.7700 ± 0.02309 N=3		
	Mock	Controle (5 mM)	0.7833 ± 0.07446 N=3	0,8528	Ns
		1 mM	0.8033 ± 0.06839 N=3		

4.2 PfSR25, candidato a receptor serpentino em *Plasmodium falciparum*, modula fosforilação de uma proteína em parasitas submetidos ao transiente de concentração de KCl 1 mM para 5,4 mM

4.2.1 Fosforilação de resíduos de tirosina em *P. falciparum*

Inicialmente e tendo-se em vista os dados de *Western blot* obtidos em células HEK293T transfectadas com PfSR25, nas quais observou-se um padrão diferenciado na fosforilação em resíduos de serina/treonina após tratamento com KCl, realizamos experimentos similares utilizando-se parasitas responsáveis pela infecção da malária humana, *P. falciparum*. Em adição, a fim de obter maiores informações sobre a importância de PfSR25 no processo de fosforilação/defosforilação em resposta a KCl decidimos utilizar parasitas nocauteados para o gene que codifica a expressão do receptor serpentino, PfSR25 (PfSR25⁻) nos experimentos de fosforilação.

Investigamos inicialmente se parasitas *P. falciparum* no estágio de trofozoíto selvagem e nocauteados para PfSR25⁻, isolados e sem tratamento adicional com KCl apresentavam fosforilação diferencial, devido simplesmente à presença ou ausência do gene que codifica a expressão do PfSR25. A este grupo de parasitas isolados e sem estímulo adicional, denominamos T0.

Apesar de não ter sido detectado a presença de tirosinas quinases clássicas no genoma de *P. falciparum*, iniciamos nossos experimentos verificando a fosforilação em resíduos de tirosina, após isolamento dos parasitas de hemácias. No entanto, a partir da Figura 10 podemos observar que embora tenhamos detectado fosforilação em resíduo de tirosina em *P. falciparum*, não observamos diferenças significativas no perfil de fosforilação em resíduos de tirosina nas proteínas constituintes de *P. falciparum* selvagem e nocaute, PfSR25⁻.

Figura 10. Perfil de fosforilação de tirosinas em proteínas de *P. falciparum*. Parasitas foram isolados no estágio de trofozoítos 34 horas pós-invasão, sem estímulo de KCl. *Western Blot* representativo de 3 experimentos independentes com resultados similares. Os valores são relativos à tubulina utilizada como controle da quantidade de amostra aplicada. A densitometria foi feita em relação à banda de 70 kDa.

4.2.2 Ensaios de fosforilação de resíduos de serina/treonina em parasitas *P. falciparum*, selvagem e nocaute para o candidato a receptor serpentina PfSR25.

A seguir nós verificamos como KCl afeta o padrão de fosforilação em resíduos de serina/treonina em parasitas *P. falciparum*, selvagem e nocaute para o candidato a receptor serpentina PfSR25. Utilizando anticorpo contra resíduos fosforilados de serina e treonina, parasitas isolados no estágio de trofozoíto 34h, mantidos em 5,4 mM (CT) ou 1 mM de KCl por 5 minutos, foram analisados utilizando-se a metodologia de *western blot*. As bandas originadas de fosforilação foram submetidas à análise densitométrica utilizando-se o *software* Image J. Os valores de fosforilação foram normalizados pela expressão de tubulina, que foi detectada utilizando-se o anticorpo contra a proteína, que só está presente no parasita e não na hemácia. A Figura 11 traz o perfil de fosforilação de proteínas em parasitas selvagens e nocautes para PfSR25 comparando-se os tratamentos 5,4 mM e 1 mM de KCl. A partir desta figura observamos que a diminuição da concentração de KCl para 1 mM promove um aumento da fosforilação da banda de 130 kDa em parasitas selvagens para PfSR25 quando comparado ao seu controle (0,88 CT e 1,28 1mM). Além disso, Quando comparamos

parasitas selvagens tratados com 1 mM de KCl com parasitas nocautes com o mesmo tratamento, observamos uma diminuição na fosforilação da banda de 130 kDa, sugerindo o envolvimento de PfSR25 na fosforilação de proteína da banda de 130 kDa. As demais bandas não apresentaram diferença estatística entre as diferentes condições e também quando comparado ao parasita selvagem (Tabelas 7, 8, 9 e 10).

Figura 11. Perfil de fosforilação de serinas-treoninas em proteínas de *P. falciparum* no estagio de trofozoítos de aproximadamente 34 h pós-invasão. Parasitas foram isolados e estimulados para avaliação de fosforilação de proteínas. A) Gel de SDS-PAGE de proteínas de parasitas selvagem (WT) e nocaute (KO) de receptor PfSR25, submetidos a 5,4 mM (Controle) e a 1 mM de KCl. B) Valores relativos da fosforilação de proteínas nas bandas de 130, 100, 55 e 40 kDa. A quantidade de proteína em cada ponto foi controlada através da expressão de β -tubulina. C) Aspecto dos parasitas utilizados. WT (parasita selvagem), KO (parasitas PfSR25⁻)

As Tabelas 7, 8, 9 e 10 fornecem a análise estatística dos valores de fosforilação normalizados das bandas correspondentes às proteínas de 40, 55, 100 e 130 kDa, respectivamente.

Tabela 7. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 40 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocaute (KO) de PfSR25. Os tratamentos foram 5,4 ou 1 mM de KCl. Utilizou-se o *software* Graphpad Prism para análise dos resultados. * Valores significativos. Ns – Valores não significativos.

Abordagem	Grupo	Comparação do teste t	Média± SEM	P-valor	Resultado
Normalização pela Tubulina	WT	CT	1.213 ± 0.2610 N=3	0,4787	Ns
		1 mM	0.9500 ± 0.2138 N=3		
	KO	CT	0.8933 ± 0.1278 N=3	0,7368	Ns
		1 mM	0.8233 ± 0.1462 N=3		
	CT	WT	1.213 ± 0.2610 N=3	0,3327	Ns
		KO	0.8933 ± 0.1278 N=3		
	1 mM	WT	0.9500 ± 0.2138 N=3	0,6504	Ns
		KO	0.8233 ± 0.1462 N=3		

Tabela 8. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 55 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocaute (KO) de PfSR25. Os tratamentos foram 5,4 ou 1 mM de KCl. Utilizou-se o *software* Graphpad Prism para análise dos resultados. * Valores significativos. Ns – Valores não significativos.

Abordagem	Grupo	Comparação do teste t	Média± SEM	P-valor	Resultado
Normalização pela Tubulina	WT	CT	1.163 ± 0.2226 N=3	0,2829	Ns
		1 mM	0.8033 ± 0.1866 N=3		
	KO	CT	1.003 ± 0.1723 N=3	0,6858	Ns
		1 mM	0.9100 ± 0.1277 N=3		
	CT	WT	1.163 ± 0.2226 N=3	0,6001	Ns
		KO	1.003 ± 0.1723 N=3		
	1 mM	WT	0.8033 ± 0.1866 N=3	0,6616	Ns
		KO	0.9100 ± 0.1277 N=3		

Tabela 9. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 100 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocaute (KO) de PfSR25. Os tratamentos foram 5,4 ou 1 mM de KCl. Utilizou-se o *software* Graphpad Prism para análise dos resultados. * Valores significativos. Ns – Valores não significativos.

Abordagem	Grupo	Comparação do teste t	Média± SEM	P-valor do teste t	Resultado
Normalização pela Tubulina	WT	CT	0.8367 ± 0.1568 N=3	0,1906	Ns
		1 mM	1.137 ± 0.1084 N=3		
	KO	CT	0.7400 ± 0.1552 N=3	0,1704	Ns
		1 mM	1.110 ± 0.1582 N=3		
	CT	WT	0.8367 ± 0.1568 N=3	0,6839	Ns
		KO	0.7400 ± 0.1552 N=3		
	1 mM	WT	1.137 ± 0.1084 N=3	0,8961	Ns
		KO	1.110 ± 0.1582 N=3		

Tabela 10. Análise estatística do padrão de fosforilação da banda proteica correspondente a ~ 130 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocaute (KO) de PfSR25. Os tratamentos foram 5,4 ou 1 mM de KCl. Utilizou-se o *software* Graphpad Prism para análise dos resultados. * Valores significativos. Ns – Valores não significativos.

Abordagem	Grupo	Comparação do teste t	Média± SEM	P-valor do teste t	Resultado
Normalização pela Tubulina	WT	CT	0.8833 ± 0.1167 N=3	0,0515	*
		1 mM	1.280 ± 0.08505 N=3		
	KO	CT	0.7233 ± 0.1065 N=3	0,4735	Ns
		1 mM	0.8367 ± 0.09597 N=3		
	CT	WT	0.8833 ± 0.1167 N=3	0,3684	Ns
		KO	0.7233 ± 0.1065 N=3		
	1 mM	WT	1.280 ± 0.08505 N=3	0,0259	*
		KO	0.8367 ± 0.09597 N=3		

4.3 Estudo para avaliar o fator de iniciação da tradução protéica (eIF2 α) em células de mamíferos transfectadas e em parasitas *P. falciparum* selvagem e nocaute para PfSR25

Uma das respostas mais rápidas ao estresse celular é o bloqueio reversível da expressão global de proteínas, com o aumento de um conjunto específico de mRNAs, através do controle da fosforilação de eIF2 α . Em adição, em *Plasmodium* e *Toxoplasma* eIF2 α é fosforilada durante períodos de latência (SULLIVAN et al., 2004; ZHANG et al., 2010). Uma vez que o isolamento e tratamento dos parasitas com diferentes concentrações de KCl pode gerar um estresse celular em parasitas, nós decidimos analisar o *status* de fosforilação de eIF2 α , e investigar se o receptor PfSR25 modula de alguma forma a fosforilação de eIF2 α , uma vez que esta controla a tradução e sobrevivência celular.

Em células HEK293T transfectadas com PfSR25 e estimuladas com KCl, observamos que não houve fosforilação diferencial em eIF2 α em resposta aos tratamentos com KCl, (5,4 mM ou 1 mM) (Figura 12).

Figura 12. Perfil de fosforilação de eIF2 α em células HEK293T transfectadas com PfSR25 ou com o vetor vazio (*Mock*) e tratadas com 1 mM de KCl. CT, controle. *Western blot* representativo de 3 experimentos independentes. eIF2 α total foi utilizada como controle da quantidade de proteína em cada ponto.

A investigação do perfil de fosforilação da proteína PfeIF2 α em parasitas mostrou haver diferença na fosforilação desta proteína entre parasitas nocaute e selvagem de PfSR25. A Figura 13 mostra um gel de SDS-PAGE de PfeIF2 α .

Figura 13. Perfil de fosforilação do fator de iniciação da tradução de proteínas PfeIF2 α em parasitas 3D7 selvagem (WT) e nocaute (KO) tratados com 1 mM de KCl. CT, controle. A) Gel de SDS-PAGE de PfeIF2 α fosforilada nos parasitas selvagem (WT) e nocaute (KO). B) Valores relativos da fosforilação de PfeIF2 α em comparação a parasitas selvagens tratados com 5,4 mM de KCl (CT). Western blot representativo de 3 experimentos independentes. PfeIF2 α total foi utilizada como controle da quantidade de proteína em cada ponto.

A partir da Figura 13 A podemos observar que parasitas nocaute de PfSR25 apresentam tendência a ter maior fosforilação de PfeIF2 α em comparação ao selvagem. A parte B da Figura 13 mostra a análise estatística do experimento.

Afim de investigar o estado de fosforilação basal de PfeIF2 α , isto é, o estado de fosforilação da proteína sem estímulo de KCl, fizemos *western blot* da proteína em parasitas isolados sem o tratamento de KCl. Esta abordagem é diferente da apresentada na Figura 13, pois possibilita investigar a atividade PfeIF2 α sem efeitos do estímulo de KCl. A partir da Figura 14 notamos que parasitas PfSR25⁻ (KO) apresentaram de fato, níveis de fosforilação basal de PfeIF2 α aumentados em comparação aos parasitas selvagens, o que sugere uma mudança no programa de expressão de proteínas em parasitas PfSR25⁻, a qual pode ser devida à percepção de potássio no micro ambiente do parasita.

Figura 14. Perfil de fosforilação do fator de iniciação da tradução de proteínas PfeIF2 α em trofozoítos de *P. falciparum* isolados sem estímulo de KCl. *Western blot* representativo de 4 experimentos independentes. PfeIF2 α total foi utilizada como controle da quantidade de proteína em cada ponto.

4.4 Evidências de proteínas diferencialmente expressas entre parasitas *P. falciparum* selvagem e nocaute para o gene PfSR25, PfSR25⁻

Ao longo dos experimentos para avaliação do padrão de fosforilação, observando géis corados com *Coomassie* encontramos uma diferença na expressão de proteínas entre o tipo selvagem e o clone nocaute PfSR25 no estágio de esquizonte. A Figura 15 mostra o padrão de expressão de proteínas em experimento com parasitas *P. falciparum* isolados no estágio de esquizonte. A partir da observação desta figura, notamos a existência de uma banda adicional no parasita selvagem localizada entre os pesos moleculares de 170 e 210 kDa. Todas as demais bandas encontram-se igualmente presentes tanto em PfSR25⁻ como no parasita

selvagem, sugerindo que esta banda adicional não se deve a uma quantidade maior de proteína submetida a eletroforese nestes parasitas.

Figura 15. Perfil de expressão de proteínas de *P. falciparum* 3D7 selvagem (WT) e PfSR25⁻ (KO) isolados no estágio de esquizonte. A) Gel de SDS-PAGE corado com *Coomassie*. B) Detalhe da região calculada como correspondente à altura de proteínas de cerca de 210 kDa. Proteína de cerca de 190 kDa (peso molecular aproximado) aparece diferentemente expressa em *P. falciparum* nocaute para PfSR25 em comparação ao parasita selvagem. O experimento é representativo de n = 3 experimentos.

A banda diferencial de 190 kDa encontrada no gel de SDS contendo parasitas no estágio de esquizontes (Figura 15) foi recortada e enviada para sequenciamento na Taplin Mass Spectrometry Facility, Massachusetts – EUA. A Tabela 12 fornece a identificação das proteínas resultantes do sequenciamento da banda 190 kDa.

Tabela 11 Proteínas identificadas nas bandas de 190 kDa de parasitas selvagens (WT) e nocautes (KO) de PfSR25 enviadas para sequenciamento.

Tipo de parasita	Número de acesso PlasmodB	Nome de proteína de <i>P. falciparum</i> identificada	Número de peptídeos exclusivos encontrados	Número total de peptídeos
WT	PfI1475w	MSP1	119	558
KO	PfI1475w	MSP1	63	116
WT	PfL0930w	Cadeia pesada de clatrina	27	32
KO	PfL0930w	Cadeia pesada de clatrina	25	31
WT	PfI1445w	Proteína de alto peso molecular da roptria 2	47	71
KO	PfI1445w	Proteína de alto peso molecular da roptria 2	58	127
WT	PfL2505c	Proteína <i>neck</i> da roptria 3	41	56
KO	PfL2505c	Proteína <i>neck</i> da roptria	50	79

Dentre as diversas proteínas que retornaram do sequenciamento (Tabela 12), MSP1 parece ser uma forte candidata ao enriquecimento, uma vez que é a única dentre as candidatas que apresenta um número maior de peptídeos nos parasitas selvagem em relação a PfSR25⁻, como podemos verificar observando o maior número de peptídeos totais (558 versus 116) e exclusivos (119 versus 63) encontrados no parasita selvagem em relação ao nocaute na Tabela 12. Proteínas da roptria e clatrina também retornaram como possíveis candidatas, porém o número de peptídeos entre os parasitas WT e KO é similar. MSP1, proteína 1 da superfície do merozoíto, é uma das proteínas mais estudadas durante o estágio assexual. Sua expressão se

inicia no estágio de trofozoíto maduro, segundo a plataforma digital plasmodb. MSP1 é sintetizada como uma molécula precursora de aproximadamente 200 kDa. No momento do egresso do parasita do eritrócito, a proteína MSP1 sofre processamento proteolítico gerando fragmentos de 83, 30, 38 e 42 kDa (KADEKOPPALA; HOLDER, 2010). Assim, estes dados apontam que a MSP1 é um provável alvo da via de sinalização desencadeada por PfSR25.

A fim de aprofundar as investigações sobre o padrão de expressão de proteínas no clone nocaute de PfSR25 e selvagem, foram feitos experimentos adicionais em parasitas no estágio de trofozoíto. Observamos que no estágio de trofozoíto, em parasitas *P. falciparum* selvagens, também ocorre a presença de banda mais intensa na altura entre 170 e 210 kDa (Figura 16). Em seguida, descrevemos a análise de intensidade de bandas do gel na Figura 16.

Figura 16. Perfil de expressão de proteínas nos parasitas selvagem e nocaute de PfSR25 no estágio de trofozoítos aproximadamente 34 horas pós-invasão. A) Gel de SDS-PAGE corado com Coomassie. B) densitometria de bandas protéicas, incluindo a banda correspondente à altura de 210 kDa, indicada pela seta, a qual é expressa diferencialmente entre *P. falciparum* selvagem e nocaute de PfSR25.

A Figura 16 mostra a análise de um gel de SDS obtido com *P. falciparum* no estágio de trofozoito em que bandas protéicas de 70 e 100 kDa não apresentaram diferenças quantitativas quando comparamos os parasitas selvagens e o nocaute para o receptor PfSR25. No entanto, o *p*-valor calculado pelo teste t para avaliar a diferença qualitativa na banda de 210 kDa foi de 0,0029 na comparação selvagem e nocaute. Este resultado sugere uma diferença significativa na intensidade da proteína de 210 kDa entre o parasita nocaute e o selvagem. No entanto, ainda temos que investigar a identidade da proteína presente nesta banda no estagio de trofozoíto.

4.5 Avaliação de fosforilação de proteínas por eletroforese bidimensional de *P. falciparum* selvagem e nocaute para o receptor PfSR25

Sendo o objetivo deste projeto de mestrado a identificação de pelo menos uma proteína diferencialmente fosforilada na via de sinalização de PfSR25, buscamos uma metodologia de identificação com isolamento da proteína em gel para posterior sequenciamento. Em adição aos experimentos em gel unidimensional utilizando anticorpos anti-fosfo serina/treonina e anti-fosfo tirosina, realizamos experimentos em gel bidimensional onde as proteínas fosforiladas foram visualizadas diretamente no gel, utilizando o corante Pro-Q Diamond. A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é um método que permite a separação de proteínas segundo sua carga elétrica e peso molecular. A primeira dimensão isola proteínas de acordo os pontos isoelétricos de seus grupos aminoacídicos. As proteínas assim focalizadas são então submetidas a uma nova fase de fracionamento, em que a separação ocorre por peso molecular.

Utilizamos como controle da quantidade de proteínas totais o corante *Coomassie blue*, em experimentos iniciais, bem como o corante comercial Sypro Ruby Invitrogen, em experimentos posteriores. A Figura 17 mostra o gel utilizado para controle da quantidade de proteínas totais de cada amostra antes da etapa de isofocalização correspondente à primeira dimensão da eletroforese bidimensional, bem como o aspecto típico dos parasitas isolados neste experimento. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford antes do controle com o gel de SDS-PAGE.

Figura 17. Aspecto de parasitas utilizados e controle da quantidade de proteínas totais aplicados a 2D-PAGE. A) Parasitas *P. falciparum* corados com Giemsa. B) Controle de quantidade de proteínas totais para aplicação em fitas de 2D-PAGE, submetidas à etapa de isofocalização. Amostras de proteínas de parasitas selvagem e PfSR25⁻ foram quantificadas pelo método de Bradford. 50 µg de proteínas totais foram fracionadas em SDS-PAGE para avaliação da quantidade de proteínas de cada amostra. A figura é representativa de n = 3 experimentos. Em cada experimento, o volume correspondente a 500 µg de proteínas foi utilizado para reidratar fitas de gel de 13 cm pH 3-10 (GE Healthcare).

As proteínas isoladas mostradas na Figura 17 são da fração solúvel em tampão comercial (*Destreak rehydrate solution*, GE Healthcare). Foi utilizado para carregamento das proteínas isoladas, gel gradiente de 7 a 16% de acrilamida. O gel gradiente foi feito utilizando sistema de vasos comunicantes e agitador magnético. Este tipo de gel permite uma melhor resolução das proteínas por peso molecular comparada a géis sem gradiente. Fitas de reidratação com gradiente de pH 3-10 de 13 cm (GE Healthcare) foram usadas para focalização isoeletrica.

Figura 18. Perfil de proteínas de parasitas *P. falciparum* isolados no estágio de trofozoítos obtido por 2D-PAGE. Proteínas foram isoladas a partir de células lisadas de parasitas *P. falciparum* no estágio de trofozoito. WT - parasita selvagem e KO - parasita nocaute para receptor PfSR25. Imagem representativa de 3 experimentos independentes.

Podemos observar a partir da Figura 18 que as proteínas encontram-se distribuídas de forma semelhante entre os parasitas selvagem e nocaute do receptor PfSR25.

A Figura 19 mostra o perfil de fosforilação geral de proteínas dos parasitas *P. falciparum* selvagem e nocaute PfSR25⁻, coradas com Pro-Q Diamond Invitrogen. As proteínas fosforiladas são visualizadas através de *spots*, os quais formam um conjunto de pontos de coloração escura na figura. Identificamos os *spots* principais com numeração indicada em vermelho na Figura 19 A. A Figura 19 B mostra a normalização da fosforilação de proteínas dos *spots* 1-5 pelo controle corado com *Coomassie* da Figura 18. Os *spots* foram analisados utilizando o *software* ImageJ.

Figura 19. Perfil de fosfoproteínas de parasitas *P. falciparum* isolados no estágio de trofozoítos obtido por 2D-PAGE. A) Perfil da fosforilação de proteínas de parasitas selvagem (WT) e PfSR25⁻ (KO). Escolhemos os *spots* marcados em vermelho como característicos nos três experimentos que realizamos, para análise densitométrica. B) Análise densitométrica dos *spots* de proteínas de parasitas selvagem e PfSR25⁻. Os valores são relativos à quantidade de proteínas totais obtidas pela coloração com *Coomassie brilliant blue*, mostrado na figura do gel anterior

A Tabela 12 mostra a análise estatística dos dados da Figura 19 B.

Tabela 12. Análise estatística dos *spots* de proteínas fosforiladas em eletroforese 2D-PAGE, normalizados por proteínas totais de gel corado com *Coomassie-blue*, referentes à Figura 19. * Valores significativos. Ns – Valores não significativos.

Abordagem	Spot	Comparação	Média± SEM	P-valor do teste t	Resultado
Normalização com Coomassie	1	WT	2.326 ± 0.5778 N=3	0,4263	Ns
		KO	1.713 ± 0.3819 N=3		
	2	WT	0.9053 ± 0.04910 =3	0,1729	Ns
		KO	1.096 ± 0.1040 N=3		
	3	WT	0.7655 ± 0.0708	0,5589	Ns
		KO	0.8448 ± 0.1023		
	4	WT	1.394 ± 0.0368 N=3	0,0229	*
		KO	1.057 ± 0.08613		
	5	WT	0.9586 ± 0.0979	0,0235	*
		KO	2.604 ± 0.4512 N=3		

Os *spots* 4 e 5 (pontos isoeletricos aproximados de 4,7 e 3,8 respectivamente) foram considerados significativamente diferentes entre parasitas selvagens e nocautes (p-valores 0,0229 e 0,0235, respectivamente), tendo sido enviados para sequenciamento na Taplin Mass Spectrometry Facility Massachusetts – EUA. As Tabelas 14 e 15 trazem as principais proteínas candidatas à fosforilação na via de PfSR25 identificadas a partir do sequenciamento dos *spots* 4 e 5, respectivamente. A partir da análise das Tabelas 14 e 15 observamos que a maioria das proteínas identificadas tanto no *spot* 4 como no *spot* 5 estão envolvidas no processo de replicação do DNA, transcrição e tradução de proteínas. Além destas, observamos também a presença da proteína 14-3-3, a qual pertence a uma família de proteínas altamente conservada em todos os eucariotos. Estas proteínas encontram-se como homo ou heterodímeros e são capazes de ligarem a diferentes proteínas alvos fosforiladas em resíduos de serina/treonina, estando portanto, envolvidas em diferentes processos celulares.

Tabela 13. Fosfoproteínas candidatas a interagirem na via de PfSR25 identificadas por sequenciamento no *spot* 4 (referentes à Figura 19).

Parasita	Número de acesso PlasmodB	Nome da proteína de <i>P. falciparum</i> identificada	Número de peptídeos exclusivos encontrados	Número total de peptídeos	pI de acordo com PlasmoDB
WT	MAL8P1.69	Proteína 14-3-3, putativa	45	372	4,56
KO	MAL8P1.69	Proteína 14-3-3, putativa	45	550	4,56
WT	PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular	19	69	4,44
KO	PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular	16	61	4,44
WT	Pf14_0448	S2, proteína da subunidade ribossomal 40S,	17	35	10,64
KO	Pf14_0448	S2, proteína da subunidade ribossomal 40S,	15	38	10,64
WT	Pf14_0083	S8, Proteína da subunidade ribossimal 40S,	11	35	10,65
KO	Pf14_0083	S8, Proteína da subunidade ribossimal 40S,	11	38	10,65
WT	MAL3P7.35	S3a, proteína da subunidade ribossomal	10	14	10,47
KO	MAL3P7.35	S3a, proteína da subunidade ribossomal	17	32	10,47
WT	MAL13P1.2	Fosfoetanolamina N-metil-transferase	14	47	5,28
KO	MAL13P1.2	Fosfoetanolamina N-metil-transferase	17	135	5,28

Tabela 14. Fosfoproteínas candidatas interagirem na via de PfSR25 identificadas por sequenciamento no *spot 5* (referentes à Figura 19).

Parasita	Número de acesso PlasmodB	Nome da proteína de <i>P. falciparum</i> identificada	Número de peptídeos exclusivos encontrados	Número total de peptídeos	pI de acordo com PlasmoDB
WT	Pf14_0241	Fator básico de transcrição 3B, putativo	19	77	9,6
KO	Pf14_0241	Fator básico de transcrição 3B, putativo	18	67	9,6
WT	PfD1055w	S19, Proteína ribossomal subunidade 40S	15	95	10,79
KO	PfD1055w	S19, Proteína ribossomal subunidade 40S	12	26	10,79
WT	PfE0850c	L12, proteína da subunidade ribossomal 60S, putativa	9	17	10,21
KO	PfE0850c	L12, proteína da subunidade ribossomal 60S, putativa	13	36	10,21
WT	Pf11_0282	Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase, putativa	9	17	7,06
KO	Pf11_0282	Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase, putativa	10	25	7,06
WT	PfCEN1	Centrina 1	0	0	4,5
KO	PfCEN1	Centrina 1	2	2	4,5

A partir das informações geradas no sequenciamento de proteínas dos *spots* 4 e 5, pudemos observar que algumas não apresentaram caracterização bioquímica determinada. A fim de obter maiores informações sobre tais proteínas, utilizamos então a plataforma digital NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) para determinação do número de resíduos fosforiláveis nas mesmas. Foram considerados fosforiláveis os resíduos de serina, treonina e tirosina. A seguir, executamos busca de proteínas ortólogas na plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finalmente, foi feito alinhamento das proteínas mais promissoras a partir dos dados gerados em BLAST com proteínas do PlasmodB (www.plasmodb.org).

Observamos que os valores de pontos isoelétricos gerados a partir de análises de similaridade com outros eucariotos fornecidos pelas plataformas digitais colocam valores muito discrepantes dos que obtivemos na etapa de isofocalização para as proteínas de *P. falciparum* (Tabelas 14 e 15). Para o *spot* 4, o pI aproximado foi 4,7 e para o *spot* 5, 3,8.

Interessante ressaltar que dentre as proteínas não caracterizadas em *P. falciparum*, o fator básico de transcrição 3B foi estudado em humanos, estando envolvido no processo patogênico do adenocarcinoma do ducto pancreático, sendo que seu silenciamento levou à regulação negativa de outros genes associados ao câncer, como NFκ-B (KUSUMAWIDJAJA et al., 2007). Desta forma, sugerimos um mecanismo pelo qual este fator possa estar modulando o programa de expressão de proteínas em *P. falciparum*. É possível que PfSR25 seja sensibilizado, levando à transcrição de proteínas de outros genes, dentre os quais, uma notável possibilidade sugerida pelos nossos resultados, é a proteína MSP1.

4.6 Estudo da sinalização por estímulo de KCl na fosforilação de proteínas de *P. falciparum* selvagem e nocaute para PfSR25 (PfSR25-)

Buscando investigar a participação de PfSR25 na modulação de sinalização via fosforilação- defosforilação em *P. falciparum* disparadas com tratamentos de KCl (140 mM) em parasitas selvagem e nocaute, realizamos o experimento descrito em seguida. Singh e colaboradores reportaram que uma mudança na concentração de KCl de cerca de 140 mM para 5 mM, pode ser o sinal para o parasita *P. falciparum* evadir da hemácia, corroborando o mecanismo sugerido para evasão do parasita *Toxoplasma gondii* (SINGH; MORE; CHITNIS, 2014; MOUDY; MANNING; BECKERS, 2001). Por outro lado, PILLAI et al. (2013), proveram evidências de que esta transição na concentração de potássio não é essencial para o

desenvolvimento do parasita. A fim de investigar o papel de potássio sobre a fosforilação de proteínas identificadas como os *spots* 4 ou 5 na Figura 19, realizamos experimento em que a concentração de KCl foi alterada de 140 mM para 5 mM. Para tanto, parasitas isolados no estágio de trofozoito foram lavados uma vez com tampão M. A seguir, os parasitas foram transferidos para tampão M contendo 140 mM de KCl (NaCl foi removido para que a força iônica do tampão fosse mantida). O grupo controle foi mantido em tampão M contendo 5,4 mM de KCl. Após este passo, ambos os grupos retornaram ao tampão M contendo 5,4 mM de KCl. O resultado pode ser observado nas Figuras 20 e 21, para o selvagem e o nocaute do gene PfSR25, respectivamente.

Figura 20. Perfil de fosfoproteínas de parasitas *P. falciparum* selvagens (WT) isolados no estágio de trofozoítos e tratados com 140 mM de KCl. CT. Controle – 5,4 mM de KCl. Fosfoproteínas foram coradas com ProQ diamond (Invitrogen). Proteínas totais foram coradas com Sypro Ruby (Invitrogen). Os *spots* 4 e 5, enviados para sequenciamento, são indicados.

Figura 21. Perfil de fosfoproteínas de parasitas *P. falciparum* nocaute (KO) isolados no estágio de trofozoítos e tratados com 140 mM de KCl. CT. Controle – 5,4 mM de KCl. Fosfoproteínas foram coradas com ProQ diamond (Invitrogen). Proteínas totais foram coradas com Sypro Ruby (Invitrogen). Os *spots* 4 e 5, enviados para sequenciamento, são indicados.

Na Figura 22, mostramos em aproximação o perfil de fosforilação do *spot* 5 e a análise densitométrica da fosforilação do *spot* 4. No *spot* 5, é notável que a fosforilação em parasitas PfSR25⁻ tenha sido maior comparada ao parasita selvagem neste experimento (Figura 22 A). O *spot* 4 não apresentou variação significativa devido aos tratamentos de KCl (Figura 22 B). O acréscimo na fosforilação do *spot* 5 em parasitas nocautes é observado na análise densitométrica normalizando-se o valor de fosforilação no *spot* pela quantidade total de proteínas obtida pela coloração com Sypro Ruby (Figura C). Estes dados corroboram com o perfil de fosforilação observado para o *spot* 5 em parasitas sem estímulo de KCl (Figura 19).

Figura 22. Efeitos do tratamento 140 mM de KCl no perfil de fosforilação de proteínas dos *spots* 4 e 5 em parasitas selvagens (WT) e nocautes (KO) de PfSR25. CT, controle – 5,4 mM de KCl. A) Detalhe destacando o *spot* 5 no círculo. Parasitas PfSR25⁻ apresentam fosforilação aumentada em relação ao selvagem, corroborando nossos resultados com parasitas isolados sem estímulo de KCl. B) Densitometria do *spot* 4. C) Densitometria do *spot* 5. Os valores são relativos a proteínas totais coradas com Sypro Ruby.

5 DISCUSSÃO

5.1 Proteínas de células HEK293T transfectadas com o gene para o receptor serpentino putativo *pfsr25*, apresentam fosforilação em resposta a estímulo de KCl

Madeira e colaboradores identificaram quatro receptores hipotéticos acoplados à proteína G em *Plasmodium falciparum*, PfSR1, PfSR10, PfSR12 e PfSR25 (MADEIRA et al., 2008). Neste trabalho, nós descrevemos a caracterização de um destes receptores hipotéticos, PfSR25. A fim de dar maior sustentabilidade aos nossos resultados, nosso grupo nocauteou o gene que expressa o receptor PfSR25 na linhagem 3D7 de *P. falciparum* gerando o clone PfSR25⁻ (KO). Desta forma, o objetivo deste projeto foi continuar a investigação da via de sinalização mediada pelo receptor PfSR25 iniciada em nosso laboratório.

Resultados de nosso laboratório mostraram que o receptor hipotético do tipo serpentina de *P. falciparum* PfSR25, comporta-se com um sensor de K⁺ que modula a sinalização por cálcio em células HEK293T (em fase de elaboração)⁴. Com base nessas informações, focamos nossos estudos na determinação dos sinais desencadeados pela ativação de PfSR25. Primeiramente, foi investigada a fosforilação de proteínas de células HEK293T transfectadas com PfSR25. A Figura 9 A evidenciou que células transfectadas com PfSR25 submetidas ao tratamento controle, 5,4 mM de KCl por 5 minutos a 37 °C, tiveram proteínas fosforiladas com peso molecular em torno de 80 kDa e 60 kDa. Ao reduzirmos a concentração de KCl para 1 mM, observamos uma tendência à diminuição da fosforilação na banda proteica de 80 kDa, indicando o envolvimento de proteínas quinases/fosfatases na via de PfSR25.

Podemos inferir a partir dos nossos resultados, que o candidato a receptor serpentino de *Plasmodium*, PfSR25, esteja relacionado à regulação de processos que permitem a percepção de potássio no ambiente celular das células HEK293T transfectadas, através de fosforilação de proteínas, uma vez que a eficiência das células transfectadas com vetor vazio em perceber a variação de potássio através de fosforilação, é menor comparada a células transfectadas com o gene do receptor. A natureza da transmissão do sinal, isto é, se é mediada por abertura de canais iônicos de potássio ou cálcio, bem como quais proteínas são ativadas na interação com cálcio, devem ser investigados. Os resultados sugerem que o potássio ativa proteínas quinases através de PfSR25. Interessante notar que o aumento de cálcio citosólico

---

⁴ MORAES, M. S.; BUDU, A. et al.: PfSR25, a malarial GPCR-like receptor, is a sensor for volume change that is coupled to Ca²⁺ signaling.

promovido pelo potássio apresenta evidências de ser um importante mecanismo atuando na saída de parasitas, entre os quais, *P. falciparum* da célula hospedeira (MOUDY; MANNING; BECKERS, 2001; SINGH; MORE; CHITNIS, 2014).

5.2 PfSR25, modula fosforilação de uma proteína em parasitas em resposta a estímulo de KCl, no estágio de trofozoíto

Ao investigar o efeito de diferentes concentrações de KCl em *P. falciparum*, percebemos que 5,4 e 1 mM de KCl também provocam alterações no padrão de fosforilação de proteínas do parasita. Na Figura 11 A podemos observar que uma banda na altura de 130 kDa apresenta um maior grau de fosforilação em resposta aos tratamentos com KCl. Singh et al. (2014), ao investigarem o papel da fosfatase calcineurina, a qual é ativada por potássio, na dinâmica de actina na secreção de proteínas das organelas micronemas, observaram que uma proteína de 130 kDa apresentou aumento de fosforilação quando os parasitas eram tratados com inibidores de calcineurina. Porém o grupo não informou a identidade da mesma (SINGH, MORE; CHITNIS; 2014). Com o objetivo de identificar a proteína diferencialmente fosforilada presente na banda de 130 kDa, realizamos uma eletroforese em gel bidimensional a fim de isolar o *spot* correspondente para posterior sequenciamento. Porém, não foi possível visualizar esta proteína por este método em nossos experimentos.

Visto que a ativação de PfSR25, via KCl, resulta na liberação de cálcio, pode-se levantar a questão de se os eventos de fosforilação desencadeados por PfSR25 sejam dependentes deste íon. Dados obtidos em nosso laboratório e por outros grupos observaram a sinalização de cálcio em *Plasmodium*. Já foi reportado que melatonina é capaz de regular o ciclo celular através deste íon, bem como da via de adenilato ciclase e cAMP (BERALDO et al., 2005). A elevação de cálcio intracelular muitas vezes promove ativação de quinases. Este íon se liga a proteínas com domínios *EF-hand* presentes em proteínas efetoras, como calmodulina e CDPKs (YÁÑEZ; GIL-LONGO; CAMPOS-TOIMIL, 2012). No caso da calmodulina, em *Plasmodium* esta ligação de cálcio promove a ativação de PfPKB e fosforilação de PfGAP45, uma proteína envolvida na invasão, que se associa ao *glideosome* (VAID; THOMAS; SHARMA, 2008). PfCDPK1 também é capaz de fosforilar PfGAP45, evidenciando seu papel no processo de invasão (THOMAS et al., 2012). A via de cAMP, com ativação de PKA, tem como consequência a fosforilação da proteína antígeno de membrana apical 1 (AMA1), a qual tem efeito essencial para a formação das *tight junctions*, necessárias

para a invasão (LEYKAUF et al., 2010). Pesquisas foram conduzidas a fim de mostrar a importância de eventos essenciais de fosforilação durante o desenvolvimento de *Plasmodium*. Por exemplo, o uso de inibidores de quinases permitiu o bloqueio do processo de invasão, bem como o desenvolvimento de parasitas no interior das hemácias (DLUZEWSKI; GARCIA, 1996). Atualmente, há trabalhos que se utilizam desta abordagem na pesquisa de malária, embora a urgente necessidade no desenvolvimento de anti-maláricos torne a quantidade de investigações nesta parte, ainda escassa (GRACIOTTI et al., 2014). Tendo sido assim caracterizadas como possíveis alvos nos tratamentos para combate à malária pelos processos de fosforilação, as quinases podem ser uma interessante ferramenta para se entender o ciclo de vida do parasita. Devido ao relativamente pequeno quinoma de *P. falciparum*, com menos de 100 quinases, e à baixa homologia que estas proteínas apresentam em relação às quinases de mamíferos, a descoberta dos receptores que medeiam a ativação de proteínas quinases pode ser muito útil na abordagem destas proteínas como alvos anti-maláricos (LUCET et al., 2012).

Nossos dados mostram que em *P. falciparum* a atividade de PfSR25 é modulada por diferentes concentrações de potássio e que além do aumento na concentração intracelular de cálcio, a ativação de quinases e/ou fosfatases é importante na via de sinalização desencadeada neste processo. Desta forma, estes dados ajudam a colocar em perspectiva as evidências deste receptor como um sensor na transmissão do sinal de potássio. Esta transmissão já é conhecida (MOUDY; MANNING; BECKERS, 2001; SINGH; MORE; CHITNIS, 2014). Porém terem sido dissecados o mecanismo e os elementos moleculares envolvidos nesta sinalização, representam um importante avanço do nosso conhecimento nesta área. Cabe ressaltar que o parasita nocaute de PfSR25 deve apresentar mecanismos compensatórios para a ausência do receptor sensível a potássio, pois no nocaute do receptor PfSR25, o parasita continua viável em seu ciclo de vida no interior das hemácias.

5.3 Parasitas nocaute de PfSR25 apresentam evidência de modificação no programa de expressão de proteínas

Com o objetivo de identificar possíveis proteínas que estariam envolvidas na sinalização de PfSR25, selecionamos possíveis candidatas para os experimentos. A classe mais promissora parecia ser a de proteínas quinases. Assim, dispúnhamos de anticorpo para o

substrato de uma das quinases de *Plasmodium*, PfeIK1, bem como de um nocaute em *P. falciparum* para esta quinase.

O substrato de PfeIK1, o fator de iniciação da tradução PfeIF2 α , em mamíferos, regula o início da síntese de proteínas e sua fosforilação é capaz de promover a tradução de proteínas que participam do remodelamento da cromatina (ZHANG et al., 2013; WEK; JIANG; ANTHONY, 2006). Nossos experimentos investigando o fator de iniciação da tradução são mostrados nas Figuras 12, 13 e 14. Inicialmente notamos que as concentrações de KCl investigadas neste estudo não determinavam fosforilação diferencial entre as linhagens de células de mamíferos transfectadas com o receptor e com vetor vazio (Figura 12). Na Figura 13, observamos uma tendência de parasitas nocaute apresentarem fosforilação de PfeIF α aumentada em comparação a parasitas selvagens. Na Figura 14, observamos que parasitas nocaute de PfSR25 apresentam nível basal de fosforilação aumentado em relação ao selvagem. Estes dados sugerem que a percepção de potássio pelo parasita, através de PfSR25 esteja associada a uma mudança no programa de expressão de proteínas. Esta mudança na expressão deve estar relacionada à fosforilação de PfeIF2 α . Esta fosforilação do fator é uma evidência de que a mudança no programa de expressão de proteínas possivelmente apresenta papel biológico na atividade de PfSR25, ligada à homeostasia de potássio. Um mecanismo ao qual pode estar associada a fosforilação de PfeIF2 α , apresentada pelo parasita nocaute, é a mudança na expressão protéica através da repressão da tradução.

A repressão da tradução é um processo no qual um conjunto de mRNAs é movido seletivamente para complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) onde são armazenados, sendo apenas traduzidos mais tarde no ciclo de vida. Em *Plasmodium*, este processo é essencial para o desenvolvimento dos estágios no ciclo de vida e permite tanto uma regulação temporal como uma regulação espacial da expressão das proteínas (DUARTE; SILVA; SILVA, 2013). A repressão ocorre, por exemplo, no ciclo sexuado, impedindo o desenvolvimento dos gametócitos antes da fertilização e formação do zigoto. A RNA-helicase DOZI (*development of zygote inhibited*) é uma das proteínas que participam neste complexo (MAIR et al., 2006), além de outras proteínas como CITH (CAR-I/Trailer Hitch Homolog), as quais são repressores da tradução que apresentam atuação essencial para manutenção da quiescência (não-tradução de proteínas) (MAIR et al., 2006; DUARTE; SILVA; SILVA, 2013).

DOZI e CITH definem um complexo ribonucleoproteico composto por 16 fatores principais, que incluem eIF4E, um outro fator de iniciação da tradução do grupo de eIF2 α e uma proteína de ligação à cauda poli-(A) (PABP). Os complexos repressores definidos por DOZI e CITH reprimem a tradução de certos mRNAs em gametócitos, que só irão ser

utilizados mais tarde, após a fertilização (DUARTE; SILVA; SILVA, 2013). A família PUF consiste em proteínas de ligação a RNA cujo papel principal é a regulação pós-transcricional dos RNAs aos quais se ligam (MÜLLER; MATUSCHEWSKI; SILVIE, 2011). A investigação desta família de proteínas teve uma importância central no desenvolvimento do conhecimento sobre os mecanismos pós-transcrição. Em *P. falciparum*, PfPUF2 desempenha um papel importante na regulação do desenvolvimento e diferenciação sexual. Em gametócitos, a proteína PUF2 reprime a tradução de determinados transcritos, reprimindo assim a diferenciação sexual. Por outro lado, em *P. berghei*, esporozoítos nocauteados de *puf2* desenvolvem-se precocemente dentro das glândulas salivares do mosquito, exibindo uma morfologia característica de estágios posteriores, nomeadamente de estágios do fígado. Foi demonstrado que PUF2 participa na regulação de PbeIK2, quinase ortóloga de PfeIK2, a qual fosforila PfeIF2 α . PUF2 parece ser então de extrema importância para a latência dos esporozoítos de *P. berghei*, a qual tem na fosforilação de eIF2 α um mecanismo efetor (MÜLLER; MATUSCHEWSKI; SILVIE, 2011). Além disto, estes resultados demonstram que a repressão da tradução é um mecanismo essencial para o controle do desenvolvimento dos esporozoítos e da sua transmissão ao hospedeiro. Nossos resultados levantam a possibilidade de o receptor PfSR25 estar ligado a mecanismos de repressão da tradução, uma vez que observamos maior fosforilação de PfeIF2 α em PfSR25⁻ (KO). Qual quinase atua na fosforilação deste fator e quais proteínas são reguladas em resposta a este sinal, são pontos que devem ser investigados. Nossos dados não permitem a conclusão para a menor expressão de MSP1 no nocaute em resposta à fosforilação de PfeIF2 α , pois há possibilidade que ocorra uma modulação pós-transcricional neste caso, devendo-se investigar os mecanismos que medeiam a menor tradução de MSP1.

5.4 Evidências de proteínas diferencialmente expressas entre parasitas selvagem e PfSR25⁻

Nossos resultados sugerem a tradução de proteínas diferenciais entre parasitas selvagens e nocaute de PfSR25 (Figuras 15 e 16). O fato de parasitas nocautes de PfSR25 serem viáveis indica mecanismos capazes de compensar a ausência do candidato a receptor. A repressão da expressão da proteína de 190 kDa, ou sua modificação pós-traducional diferente em parasitas nocaute, pode representar um mecanismo de compensação do nocaute do gene de PfSR25.

A candidata mais forte identificada no sequenciamento da banda de 190 kDa foi a proteína MSP1. Sua expressão está anotada no plasmodb.org como iniciando-se no estágio de trofozoítos maduros. Sabe-se que o grupo das proteínas MSPs inclui pelo menos 8 membros que são ligados à membrana celular através de glicosilação. A MSP1 é expressa no processo de esquizogonia, sendo reportado seu processamento e participação na interação fraca e reversível entre a membrana do parasita e a membrana das hemácias. A MSP1 interage com a superfície das hemácias tanto diretamente quanto em associação com uma proteína do vacúolo parasitóforo (KADEKOPPALA; HOLDER, 2010), indicando-a como uma possibilidade de proteína efetora na modulação desempenhada pelo PfSR25. Porém, experimentos adicionais são necessários para validar a participação dessas proteínas na via de sinalização desencadeada por PfSR25/KCl.

Rovira-Graells et al. (2012), estudaram variações transcricionais entre linhagens isogênicas de *P. falciparum* que cresciam em condições homogêneas. O grupo observou que a expressão de variações clonais controladas a níveis epigenéticos é propriedade exclusiva de genes e famílias gênicas os quais, em sua maioria, participam na interação parasita-hospedeiro. É interessante notar que o grupo aborda que genes envolvidos na evasão do parasita do sistema imune do hospedeiro estão curiosamente envolvidos nos mecanismos epigenéticos, como remodelação de cromatina, que medeiam o processo adaptativo. Este grupo de genes não é o único, estando ainda envolvidos genes ligados ao metabolismo de lipídeos, dobramento de proteínas, regulação da transcrição, entre outros, indicando que as alterações epigenéticas resultam não apenas em variações antigênicas, mas também em variações funcionais (ROVIRA-GRAELLS et al., 2012).

A variação alélica de proteínas como MSP1 e MSP2 é um dos mecanismos que *P. falciparum* utiliza para evadir o sistema imune do hospedeiro (WRIGHT; RAYNER, 2014). A observação de que PfSR25⁻ pode ter a expressão de MSP1 diminuída em relação ao parasita selvagem nos leva a propor a hipótese de que o receptor esteja envolvido na percepção de potássio como um mecanismo relacionado ao escape do sistema imune. As pesquisas que colocam MSP1 como um promissor candidato ao desenvolvimento de vacina contra a malária mostram que o potencial desta proteína deve-se ao fato de estar exposta na membrana dos merozoítos pelo curto período em que o parasita tem contato com o sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, outras proteínas, pelo mesmo motivo, têm potencial imunogênico, como as PfEBAs e as PfAMAs (WRIGHT; RAYNER, 2014).

Desta forma, a utilização de pistas químicas para o reconhecimento do ambiente pelo parasita tem a função de promover a resposta adaptativa à condição ambiental. PfSR25, como

receptor, tem a função de promover o reconhecimento primário destas pistas. A tradução de MSP1 pode ser um fenótipo para o reconhecimento do potássio, de alguma forma relacionando-se à evasão do parasita do sistema imunológico do hospedeiro. Para além disto, MSP1 interage com proteínas do hospedeiro, um mecanismo utilizado pelo parasita a fim de promover bloqueio da resposta inflamatória (WAISBERG et al., 2012).

Outras proteínas que também retornaram do sequenciamento incluem clatrina, identificada como provável proteína diferencialmente expressa entre parasitas selvagens e nocautes de PfSR25, na banda de 190 kDa. Esta proteína está ligada à formação de vesículas membranares, as quais relacionam-se ao processo de endocitose e pinocitose, que modificam o volume celular. Além disso, Tewari et al. (2010), estudando proteínas quinases que regulam a transmissão de *Plasmodium* para o mosquito vetor, apontaram as quinases PK7 e GAK (*Cyclin G-associated kinase*) como reguladoras do desenvolvimento do zigoto no mosquito vetor (TEWARI et al., 2010). GAK é sugerida como a principal quinase associada a eventos mediados por clatrina (SHIMIZU et al., 2009). Estes estudos fornecem uma hipótese de como receptores podem levar à ativação de GAK e à via dependente de clatrina envolvidos no ciclo sexuado do parasita.

Embora o mecanismo de clatrina seja bem conhecido em células de mamíferos, o envolvimento desta proteína no processo de endocitose/exportação do PfSR25 deve ser investigado antes de afirmarmos a participação desta via na biologia celular de receptores em *P. falciparum*. Outras candidatas são as proteínas das roptrias, as quais são secretadas quando ocorre a saída dos parasitas das hemácias (CHITNIS; STAINES, 2013). A liberação de cálcio de estoques internos ocorre neste processo (SINGH et al., 2010). As evidências de que KCl promove liberação de cálcio citosólico via PfSR25 em *P. falciparum* (em fase de preparação)⁵, tornam instigante a investigação do receptor e seu envolvimento na liberação de cálcio. Deve ser investigado em outros estudos se este segundo mensageiro liberado através de PfSR25 tem envolvimento direto com a invasão de parasitas a hemácias.

---

⁵ MORAES, M. S.; BUDU, A. et al.: PfSR25, a malarial GPCR-like receptor, is a sensor for volume change that is coupled to Ca²⁺ signaling.

5.5 PfSR25- (KO) mostra evidências de mudança no programa de expressão de proteínas também em eletroforese bidimensional

Foram realizados experimentos de imunoprecipitação de candidatos a parceiros moleculares de PfSR25 que trouxeram muitas informações sobre as classes de moléculas que interagem com este receptor (BUDU, 2012). Esta interação entre PfSR25 e parceiros moleculares é importante em nossos estudos, pelo fato de procurarmos proteínas que tenham fosforilação relacionada ao sinal transmitido na via de PfSR25. Nossos resultados sugerem que a classe mais proeminente de moléculas que interagem com o candidato a receptor por meio de fosforilação são proteínas ribossomais e fatores de transcrição.

O *spot* 4 da Tabela 14 trouxe como principal candidata a interagir na via de PfSR25, a proteína não caracterizada, Pf14-3-3. Pf14-3-3 apresenta 31 sítios de fosforilação preditos por similaridade com a proteína ortóloga de *A. thaliana*. Van den Wijngaard et al. (2005) demonstraram que a família de proteínas 14-3-3, em resposta ao ácido abscísico, inibe a germinação de células dos embriões da raiz de cevada (*Hordeum vulgare*), através da atividade de canais de potássio dependente de proteínas 14-3-3. Este trabalho colocou as proteínas 14-3-3 como candidatos primários para a regulação da osmolaridade celular em embriões da raiz de cevada (VAN DEN WIJNGAARD et al., 2005). Em *A. thaliana*, o canal de potássio TPK1, que interage com proteínas 14-3-3, apresenta um domínio EF-hand, capaz de responder a estímulos de cálcio, e um domínio de interação com proteínas 14-3-3, o qual necessita estar fosforilado para que a interação ocorra (LATZ et al., 2007). Em *A. thaliana*, o efeito desta via de sinalização é a regulação da homeostase de potássio no vacúolo celular, tendo em vista as variantes que influenciam esta homeostase: Ca^{2+} citosólico, proteína 14-3-3 e fosforilação do canal TPK1. O paralelo em *P. falciparum* pode ser a regulação da concentração de potássio no vacúolo parasitóforo ou no interior do próprio parasita, além da própria célula hospedeira.

O mesmo *spot* apresentou PCNA como outra candidata a ser fosforilada, sendo preditos 16 sítios de fosforilação para esta proteína que tem como função regular a processividade da DNA polimerase, no processo de replicação (LANZER et al., 1993).

Ainda mostraram-se como candidatas a serem fosforiladas no *spot* 4, proteínas ribossomais ainda não caracterizadas em *P. falciparum*, S2, S3a e S8. Por similaridade em outros eucariotos, estas proteínas apresentam sítios passíveis de fosforilação e podem estar

ligadas ao controle de qualidade das subunidades ribossomais do complexo de tradução subunidade menor, 40S e maior, 60S (Tabela 14).

A fosfoetanolamina N-metiltransferase apresenta 14 sítios preditos de fosforilação e estudos bioquímicos investigando seu envolvimento na biologia de *P. falciparum* já foram conduzidos. Esta proteína aparece como provável proteína a estar fosforilada no *spot* 4. O estudo de Bobenchik e colaboradores mostrou que a fosfoetanolamina é essencial para a maturação de gametócitos e formação de oocistos (BOBENCHIK et al., 2013). A incapacidade de transmissão para o mosquito em parasitas que tiveram a atividade da proteína inibida coloca esta enzima em posição proeminente no desenvolvimento de antimaláricos, uma vez que a abordagem poderia levar a estratégias para impedir a transmissão de gametócitos para o mosquito vetor. Além disso, a investigação desta enzima e sua provável fosforilação na via de PfSR25 pode lançar mais luz sobre o entendimento do receptor na biologia do parasita.

O *spot* 5, que representou nossa evidência mais clara de fosforilação ligada ao candidato a receptor serpentina PfSR25, também retornou proteínas não caracterizadas em *P. falciparum*. O fator básico de transcrição 3B, não foi caracterizado em *Plasmodium*. Dados de similaridade utilizando NetPhos 2.0 *server* informam que a possível proteína de *P. falciparum* apresenta 7 sítios possíveis de fosforilação. Sua ortóloga em humanos forma um complexo com a RNA polimerase B II, promovendo o início da transcrição (ZHENG et al., 1987). Além disso, a proteína humana é constituída de duas isoformas, 3A e 3B, e é capaz de controlar a expressão de outras proteínas, como NF κ -B (KUSUMAWIDJAJA et al., 2007).

Interessante ressaltar que outra proteína candidata a estar fosforilada no *spot* 5, L12, apresenta similaridade com a proteína L11, de cloroplastos de *A. thaliana*. Em *P. falciparum* esta proteína tem como função predita a facilitação na interação entre o ribossomo e fatores de tradução ligados a GTP, sugerindo um possível mecanismo para o entendimento da interação entre PfSR25 e PfeIF2 α , em que a fosforilação de L11 poderia interferir na interação entre esta e PfeIF2 α , levando a um efeito global que seria a inibição da tradução de proteínas nos parasitas nocauteados.

A proteína desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase, envolvida na replicação de DNA, apresenta 13 sítios preditos de fosforilação, sugerindo seu mecanismo de resposta à ativação de PfSR25, através da ativação gênica.

Os valores preditos de pontos isoelétricos de algumas proteínas identificadas nas Tabelas 14 e 15 restringem a identidade das proteínas dos *spots* 4 e 5. No entanto, devido à ausência de estudos que caracterizam estas proteínas, não excluimos a possibilidade de os

valores preditos não serem reais. Para o *spot* 4, o valor calculado de pI foi 4,7, deixando apenas as proteínas Pf14-3-3, PCNA e fosfoetanolamina como candidatas.

Para o *spot* 5, de pI 3,8, sobraria apenas a centrina-1, uma proteína relacionada ao controle do ciclo celular como candidata, porém seu pI também difere consideravelmente do calculado para o *spot* 5. Além disso, esta proteína não retornou peptídeos no parasita selvagem, reduzindo assim sua probabilidade de ser uma candidata promissora.

Assim, os dados de 2D-PAGE sugerem um papel no controle da expressão de proteínas para PfSR25, por meio da modulação de fatores de transcrição e de proteínas ribossomais do complexo da tradução.

6 CONCLUSÕES

Apesar dos dados acumulados durante o desenvolvimento deste projeto não terem possibilitado a identificação direta de quinases e/ou fosfatases envolvidas na via de sinalização desencadeada por PfSR25, os dados obtidos, e corroborados com o uso do nocaute para esse receptor, sugerem fortemente a participação dessas enzimas nesta via de sinalização. Além disso, conseguimos identificar possíveis proteínas efetoras desta via. Estas proteínas correspondem a diversas classes: fatores de transcrição e processamento do RNA, proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina; proteínas associadas ao processo de invasão, egresso e sobrevivência. Deste modo, estes estudos indicam que PfSR25 desempenha um papel em inúmeros processos importantes em *P. falciparum*.

Além disso, a observação de que PfeIF2 α , a qual encontra-se mais fosforilada, e portanto mais ativa em parasitas nocautes de PfSR25, novamente reforça o receptor como uma proteína chave no controle da sobrevivência/diferenciação de *P. falciparum*. Neste sentido, nossos dados corroboram principalmente com a hipótese de que ocorra modificação no programa de expressão de proteínas, com sinalização através de fatores de iniciação da síntese protéica e de fatores relacionados à transcrição do RNA mensageiro. Embora não possamos dizer que PfeIF2 α fosforilada tenha envolvimento com a diminuição da expressão de MSP1, a identificação de quinases/fosfatases envolvidas na via, assim como seu envolvimento com a expressão de MSP1 pode abrir caminho para o desenvolvimento de inibidores, os quais têm a possibilidade de impedir o desenvolvimento do parasita. Desta forma, pesquisas envolvendo este receptor devem ser estimuladas, uma vez que têm potencial de permitir o desenvolvimento de anti-maláricos por meio do bloqueio da atividade de quinases/fosfatases essenciais para o ciclo de vida de *Plasmodium*. Neste sentido, o uso de inibidores contra quinases presentes na rede de sinalização de PfSR25 levaria à queda na atividade de moléculas efetoras, como as identificadas nos *spots* 4 e 5, respectivamente, proteína Pf14-3-3, ortóloga à reguladora de canais de potássio em *A. thaliana*, e fator básico de transcrição 3B, PfBTF3B, cuja ortóloga em humanos, regula a transcrição gênica.

REFERÊNCIAS*

- ABDI, A. et al. SAM domain-dependent activity of PfTKL3, an essential tyrosine kinase-like kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 67, n. 19, p. 3355-3369, Oct 2010.
- ALVES, E. et al. Melatonin and IP3-induced Ca²⁺ release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 7, p. 5905-5912, Feb 2011.
- AMINO, R. et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat. Med.**, v. 12, n. 2, p. 220-224, Feb 2006.
- ANAMIKA; SRINIVASAN, N.; KRUPA, A. A genomic perspective of protein kinases in *Plasmodium falciparum*. **Proteins**, v. 58, n. 1, p. 180-189, Jan 2005.
- AOYAMA, H. et al. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas: **Química Nova**, 26: 896-900 p. 2003.
- BANNISTER, L. H. et al. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 10, p. 427-433, Oct 2000.
- BARIK, S.; TAYLOR, R. E.; CHAKRABARTI, D. Identification, cloning, and mutational analysis of the casein kinase 1 cDNA of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Stage-specific expression of the gene. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 42, p. 26132-26138, Oct 1997.
- BAUM, J. et al. Regulation of apicomplexan actin-based motility. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, n. 8, p. 621-628, Aug 2006.
- BERALDO, F. H. et al. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. **J. Cell Biol.**, v. 170, n. 4, p. 551-557, Aug 2005.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat. Rev Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 7, p. 517-529, Jul 2003.
- BESTEBROER, J.; DE HAAS, C. J.; VAN STRIJP, J. A. How microorganisms avoid phagocyte attraction. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, n. 3, p. 395-414, May 2010.

*De acordo com:

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

BILLKER, O. et al. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. **Cell**, v. 117, n. 4, p. 503-514, May 2004.

BOYD, G. H. Experimental modification of the reproductive activity of *Plasmodium cathemerium* **Am. J. Epidemiol**, v. 9, p. 181–187, 1929.

BOYD, M. F.; STRATMAN-THOMAS, W. K.; KICTHEN, S. F. On the Duration of Infectiousness in Anophelines Harboring *Plasmodium falciparum*: **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 16: 157–158 p. 1936.

BOBENCHIK, A. M. et al. *Plasmodium falciparum* phosphoethanolamine methyltransferase is essential for malaria transmission. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. 110(45):18262-18267, 2013.

BRZOSTOWSKI, J. A.; KIMMEL, A. R. Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, n. 5, p. 291-297, May 2001.

BUDU, A. Screening de ligantes para candidatos a receptores de sete domínios transmembrânicos no parasita *Plasmodium falciparum*. 2012. (PhD). Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo

CHAHROUR, O.; CAIRNS, D.; OMRAN, Z. Small molecule kinase inhibitors as anti-cancer therapeutics. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 12, n. 5, p. 399-411, May 2012.

CHEREZOV, V. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. **Science**, v. 318, n. 5854, p. 1258-1265, Nov. 2007.

CHERRY, A. A.; ANANVORANICH, S. Characterization of a homolog of DEAD-box RNA helicases in *Toxoplasma gondii* as a marker of cytoplasmic mRNP stress granules. **Gene**, Apr. 2014.

CHITNIS, C. E.; STAINES, H. M. Dealing with change: the different microenvironments faced by the malarial parasite. **Mol. Microbiol.**, v. 88, n. 1, p. 1-4, Apr 2013.

CRESPI, B. J. The evolution of social behavior in microorganisms. **Trends Ecol. Evol.**, v. 16, n. 4, p. 178-183, Apr 2001.

DAS, A. K. et al. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. **EMBO J.**, v. 15, n. 24, p. 6798-6809, Dec 1996.

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

DIAZ, C. A. et al. Characterization of Plasmodium falciparum cGMP-dependent protein kinase (PfPKG): antiparasitic activity of a PKG inhibitor. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 146, n. 1, p. 78-88, Mar 2006.

DLUZEWSKI, A. R.; GARCIA, C. R. Inhibition of invasion and intraerythrocytic development of Plasmodium falciparum by kinase inhibitors. **Experientia**, v. 52, n. 6, p. 621-623, Jun 1996.

DOBSON, S. et al. A novel tetratricopeptide repeat (TPR) containing PP5 serine/threonine protein phosphatase in the malaria parasite, Plasmodium falciparum. **BMC Microbiol.**, v. 1, p. 31, 2001.

DOERIG, C. Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1697, n. 1-2, p. 155-168, Mar 2004.

DOERIG, C. et al. Signalling in malaria parasites. The MALSIG consortium. **Parasite**, v. 16, n. 3, p. 169-182, Sep 2009.

_____. Protein kinases of malaria parasites: an update. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 12, p. 570-577, Dec 2008.

_____. Protein kinases as targets for antimalarial intervention: Kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 132-150, Dec 2005.

_____. Pfcrk-1, a developmentally regulated cdc2-related protein kinase of Plasmodium falciparum. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 70, n. 1-2, p. 167-174, Mar 1995.

DORIN-SEMBLAT, D. et al. Functional characterization of both MAP kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum by reverse genetics. **Mol. Microbiol.**, v. 65, n. 5, p. 1170-1180, Sep 2007.

_____. Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Eukaryot. Cell**, v. 7, n. 2, p. 279-285, Feb 2008.

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

DUARTE, N. A., 1987-; SILVA, J. M. L. M. D.; SILVA, P. A. G. C. D. Gene expression during *Plasmodium transmission*, 2013 (Mestrado). Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

DYER, M.; DAY, K. Expression of *Plasmodium falciparum* trimeric G proteins and their involvement in switching to sexual development. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 110, n. 2, p. 437-448, Oct 2000.

ENSERINK, M. Mosquito engineering. Building a disease-fighting mosquito. **Science**, v. 290, n. 5491, p. 440-441, Oct 2000.

ESTEY, S. J.; MANSOUR, T. E. Nature of serotonin-activated adenylate cyclase during development of *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, n. 1-2, p. 47-59, Nov 1987.

FARIAS, S. L. et al. Cysteine-protease activity elicited by Ca^{2+} stimulus in *Plasmodium*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 141, n. 1, p. 71-79, May 2005.

FENNELL, C. et al. PfeIK1, a eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, regulates stress-response to amino-acid starvation. **Malar. J.**, v. 8, p. 99, 2009.

FUGEL, W. et al. 3,6-Diamino-4-(2-halophenyl)-2-benzoylthieno[2,3-b]pyridine-5-carbonitriles are selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3. **J.Med. Chem.**, v. 56, n. 1, p. 264-275, Jan 2013.

GAJI, R. Y. et al. Expression of the Essential Kinase PfCDPK1 from *Plasmodium falciparum* in *Toxoplasma gondii* Facilitates the Discovery of Novel Antimalarial Drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 5, p. 2598-2607, May 2014.

GAMBRELL, W. E. Variations in Gametocyte Production in Avian Malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. s1-17, n. 5, p. 689-727, 1937.

GARCIA, C. R. et al. *Plasmodium* in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.**, v. 266, p. 85-156, 2008.

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

GASSMANN, M. et al. Quantifying western blots: Pitfalls of densitometry. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1845-1855, Jan 2009.

GAUTRET, P.; MOTARD, A. Periodic infectivity of Plasmodium gametocytes to the vector. A review. **Parasite**, v. 6, n. 2, p. 103-111, Jun 1999.

GEYER, J. A.; PRIGGE, S. T.; WATERS, N. C. Targeting malaria with specific CDK inhibitors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 160-170, Dec 2005.

GHOSH, A.; EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 5, p. 196-201, May 2000.

GINSBURG, H. et al. New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 8, n. 2, p. 177-190, Jun 1983.

GRACIOTTI, M. et al. Malaria protein kinase CK2 (PfCK2) shows novel mechanisms of regulation. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e85391, 2014.

GRAESER, R. et al. Characterization of a mitogen-activated protein (MAP) kinase from Plasmodium falciparum. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 1, p. 151-159, Jan 1997.

GRAVES, J. D.; KREBS, E. G. Protein phosphorylation and signal transduction. **Pharmacol Ther**, v. 82, n. 2-3, p. 111-21, 1999 May-Jun 1999.

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

HANKS, S. K. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. **Genome Biol.**, v. 4, n. 5, p. 111, 2003.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB J.**, v. 9, n. 8, p. 576-596, May 1995.

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

HAWKING, F. The clock of the malaria parasite. **Sci. Am.**, v. 222, n. 6, p. 123-131, Jun 1970.

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

HEMENWAY, C. S.; HEITMAN, J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 30, n. 1, p. 115-151, 1999.

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

HOLTON, S. et al. Structures of *P. falciparum* PfPK5 test the CDK regulation paradigm and suggest mechanisms of small molecule inhibition. **Structure**, v. 11, n. 11, p. 1329-1337, Nov 2003.

HOTTA, C. T. et al. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 7, p. 466-468, Jul 2000.

ISHINO, T. et al. A calcium-dependent protein kinase regulates *Plasmodium* ookinete access to the midgut epithelial cell. **Mol. Microbiol.**, v. 59, n. 4, p. 1175-1184, Feb 2006.

KADEKOPPALA, M.; HOLDER, A. A. Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the MSP1 complex and the MSP7 family. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, n. 10, p. 1155-1161, Aug 2010.

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

KATO, K. et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* protein kinase 2. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 162, n. 1, p. 87-95, Nov 2008.

KATO, N. et al. Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. **Nat. Chem Biol.**, v. 4, n. 6, p. 347-356, Jun 2008.

KEDERSHA, N.; ANDERSON, P. Mammalian stress granules and processing bodies. **Methods Enzymol.**, v. 431, p. 61-81, 2007.

KEENAN, S. M. et al. Rational inhibitor design and iterative screening in the identification of selective plasmodial cyclin dependent kinase inhibitors. **Comb. Chem. High Throughput Screen**, v. 8, n. 1, p. 27-38, Feb 2005.

KIM, J. et al. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. **Proc. Natl. Acad Sci. U S A**, v. 102, n. 5, p. 1442-1447, Feb 2005.

KLEIN, E. Y. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 41, n. 4, p. 311-317, Apr 2013.

KOBILKA, B. K. et al. Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta 2-adrenergic receptor and their putative promoter regions. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 15, p. 7321-7327, May 1987.

KOYAMA, F. C. et al. Ubiquitin proteasome system and the atypical kinase PfPK7 are involved in melatonin signaling in Plasmodium falciparum. **J. Pineal. Res.**, v. 53, n. 2, p. 147-153, Sep 2012.

KUMAR, A. et al. PfPKB, a novel protein kinase B-like enzyme from Plasmodium falciparum: I. Identification, characterization, and possible role in parasite development. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 23, p. 24255-24264, Jun 2004.

KUMAR, K. A. et al. Exposure of Plasmodium sporozoites to the intracellular concentration of potassium enhances infectivity and reduces cell passage activity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 156, n. 1, p. 32-40, Nov 2007.

KUSUMAWIDJAJA, G. et al. Basic transcription factor 3 (BTF3) regulates transcription of tumor-associated genes in pancreatic cancer cells. **Cancer Biol. Ther.**, 2007 Mar; 6(3):367-376.

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

LANZER, M et al., Plasmodium: control of gene expression in malaria parasites. **Exp. Parasitol.**, 1993 Aug;77(1):121-128.

LATZ, A. et al. TPK1, a Ca(2+)-regulated Arabidopsis vacuole two-pore K(+) channel is activated by 14-3-3 proteins. **Plant. J.**, v. 52, n. 3, p. 449-459, Nov 2007.

LEFKOWITZ, R. J.; ROTH, J.; PASTAN, I. Effects of calcium on ACTH stimulation of the adrenal: separation of hormone binding from adenylyl cyclase activation. **Nature**, v. 228, n. 5274, p. 864-866, Nov 1970a.

_____. Radioreceptor assay of adrenocorticotrophic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma. **Science**, v. 170, n. 3958, p. 633-635, Nov 1970b.

LEFKOWITZ, R. J. et al. ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenyl cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 65, n. 3, p. 745-752, Mar 1970.

LEYKAUF, K. et al. Protein kinase a dependent phosphorylation of apical membrane antigen 1 plays an important role in erythrocyte invasion by the malaria parasite. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 6, p. e1000941, 2010.

LI, J. L. et al. Pfmrk, a MO15-related protein kinase from Plasmodium falciparum. Gene cloning, sequence, stage-specific expression and chromosome localization. **Eur. J. Biochem.**, v. 241, n. 3, p. 805-813, Nov 1996.

LIM, D. C. et al. Toxoplasma and Plasmodium protein kinases: roles in invasion and host cell remodelling. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, n. 1, p. 21-32, Jan 2012.

LOCHT, C.; ANTOINE, R. A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. **Biochimie**, v. 77, n. 5, p. 333-340, 1995.

LUCET, I. S. et al. Plasmodium kinases as targets for new-generation antimalarials. **Future Med. Chem.**, v. 4, n. 18, p. 2295-2310, Dec 2012.

LYMPEROPOULOS, A.; NEGUSSIE, S. β Arrestins in Cardiac G Protein-Coupled Receptor Signaling and Function: Partners in Crime or "Good Cop, Bad Cop"? **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 12, p. 24726-24741, 2013.

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

MADEIRA, L. et al. Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. **PLoS One**, v. 3, n. 3, p. e1889, 2008.

MAIR, G. R. et al. Regulation of sexual development of Plasmodium by translational repression. **Science**, v. 313, n. 5787, p. 667-669, Aug 2006.

MANSOUR, T. E. Serotonin receptors in parasitic worms. **Adv. Parasitol.**, v. 23, p. 1-36, 1984.

MARTE, B. M.; DOWNWARD, J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, n. 9, p. 355-358, Sep 1997.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nat. Med.**, v. 19, n. 2, p. 156-167, Feb 2013.

MITCHELL, G. H.; BANNISTER, L. H. Malaria parasite invasion: interactions with the red cell membrane. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 8, n. 4, p. 225-310, 1988.

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

MOTA, M. M. et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141-144, Jan 2001.

MOUDY, R.; MANNING, T. J.; BECKERS, C. J. The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of Toxoplasma gondii. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 44, p. 41492-41501, Nov 2001.

MÜLLER, C. P.; HOMBERG, J. The role of serotonin in drug use and addiction. **Behav. Brain Res.**, Apr 2014.

MÜLLER, K.; MATUSCHEWSKI, K.; SILVIE, O. The Puf-family RNA-binding protein Puf2 controls sporozoite conversion to liver stages in the malaria parasite. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19860, 2011.

NÁJERA, J. A. Malaria control: achievements, problems and strategies. **Parassitologia**, v. 43, n. 1-2, p. 1-89, Jun 2001.

OJO, K. K. et al. A specific inhibitor of PfCDPK4 blocks malaria transmission: chemical-genetic validation. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 2, p. 275-284, Jan 2014.

OLSHINA, M. A.; WONG, W.; BAUM, J. Holding back the microfilament--structural insights into actin and the actin-monomer-binding proteins of apicomplexan parasites. **IUBMB Life**, v. 64, n. 5, p. 370-377, May 2012.

ONO, T. et al. Adenylyl cyclase alpha and cAMP signaling mediate Plasmodium sporozoite apical regulated exocytosis and hepatocyte infection. **PLoS Pathog.**, v. 4, n. 2, p. e1000008, Feb 2008.

PATOCKA, N. et al. Serotonin signaling in *Schistosoma mansoni*: a serotonin-activated G protein-coupled receptor controls parasite movement. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 1, p. e1003878, Jan 2014.

PILLAI, A. D. et al. Malaria parasites tolerate a broad range of ionic environments and do not require host cation remodelling. **Mol. Microbiol.**, v. 88, n. 1, p. 20-34, Apr 2013.

PORTER, R. J.; LAIRD, R. L.; DUSSEAU, E. M. Studies on malarial sporozoites. II. Effect of age and dosage of sporozoites on their infectiousness. **Exp. Parasitol.**, v. 3, n. 3, p. 267-274, May 1954.

RACHED, F. B. et al. Construction of a *Plasmodium falciparum* Rab-interactome identifies CK1 and PKA as Rab-effector kinases in malaria parasites. **Biol. Cell.**, v. 104, n. 1, p. 34-47, Jan 2012.

REININGER, L. et al. An essential role for the *Plasmodium* Nek-2 Nima-related protein kinase in the sexual development of malaria parasites. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 31, p. 20858-20868, Jul 2009.

REITER, E.; LEFKOWITZ, R. J. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 17, n. 4, p. 159-165, 2006 May-Jun 2006.

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

REN, X. R. et al. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, n. 5, p. 1448-1453, Feb 2005.

RIBEIRO, R. Y. Papel das quinases PfPK7, PfNEK2, PfNEK3, PfMAP1 e PfeIK1 na transdução de sinal de melatonina no desenvolvimento do ciclo celular intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*. 2010. Dissertação de Mestrado (MS). Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo

ROVIRA-GRAELLS, N. et al. Transcriptional variation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Genome Res.**, v. 22, n. 5, p. 925-938, May 2012.

RSAS. The Nobel Prize in Chemistry 2012. p. 1-6, 2012. Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/popular-chemistryprize2012.pdf >. Acesso em: 10/05/2014.

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

SCHNEIDER, A. G.; MERCEREAU-PUIJALON, O. A new Apicomplexa-specific protein kinase family: multiple members in *Plasmodium falciparum*, all with an export signature. **BMC Genomics**, v. 6, p. 30, 2005.

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

SHERMAN, I. W. Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection.: **Am. Soc. Microb.** 56 pp p. 1998.

SHIMIZU, H. et al. GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane traffic, also controls centrosome integrity and chromosome congression. **J. Cell Sci.**, v. 122, n. Pt 17, p. 3145-3152, Sep 2009.

SINGH, M.; JADHAV, H. R. Melatonin: functions and ligands. **Drug Discov. Today**, Apr 2014.

SINGH, S. et al. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 2, p. e1000746, Feb 2010.

SINGH, S.; CHITNIS, C. E. Signalling mechanisms involved in apical organelle discharge during host cell invasion by apicomplexan parasites. **Microbes Infect.**, v. 14, n. 10, p. 820-824, Aug 2012.

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

SNOW, R. W. et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 214-217, Mar 2005.

SULLIVAN, W. J. et al. Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. **Biochem. J.**, v. 380, n. Pt 2, p. 523-531, Jun 2004.

SUO, W. Z.; LI, L. Dysfunction of G protein-coupled receptor kinases in Alzheimer's disease. **Scientific World Journal**, v. 10, p. 1667-1678, 2010.

SYIN, C. et al. The H89 cAMP-dependent protein kinase inhibitor blocks *Plasmodium falciparum* development in infected erythrocytes. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 18, p. 4842-4849, Sep 2001.

TEWARI, R. et al. The systematic functional analysis of *Plasmodium* protein kinases identifies essential regulators of mosquito transmission. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 4, p. 377-387, Oct 2010.

THOMAS, D. C. et al. Regulation of *Plasmodium falciparum* glideosome associated protein 45 (PfGAP45) phosphorylation. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35855, 2012.

THÉLU, J. et al. Evidence for expression of a Ras-like and a stage specific GTP binding homologous protein by *Plasmodium falciparum*. **Cell Signal.**, v. 6, n. 7, p. 777-782, Sep 1994.

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

TREECK, M. et al. The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 4, p. 410-419, Oct 2011.

TRELA, E.; GLOWACKI, S.; BŁASIAK, J. Therapy of Chronic Myeloid Leukemia: Twilight of the Imatinib Era? **ISRN Oncol.**, v. 2014, p. 596483, 2014.

TYLER, J. S.; TREECK, M.; BOOTHROYD, J. C. Focus on the ringleader: the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. **Trends Parasitol.**, v. 27, n. 9, p. 410-420, Sep 2011.

VAID, A. et al. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from *Plasmodium falciparum*, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. **Blood**, v. 115, n. 12, p. 2500-2507, Mar 2010.

VAID, A.; SHARMA, P. PfPKB, a protein kinase B-like enzyme from *Plasmodium falciparum*: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 37, p. 27126-27133, Sep 2006.

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

VAN DEN WIJNGAARD, P. W. et al. Absciscic acid and 14-3-3 proteins control K channel activity in barley embryonic root. **Plant. J.**, v. 41, n. 1, p. 43-55, Jan 2005.

VENKATAKRISHNAN, A. J. et al. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 185-194, Feb 2013.

WAISBERG, M. et al. Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 blocks the proinflammatory protein S100P. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 109, n. 14, p. 5429-5434, Apr 2012.

WALLIN, E.; HEIJNE, G. Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors – A statistical study: **Protein Eng.**, 8: 693-698. p. 1995.

WARD, P. et al. Protein kinases of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote. **BMC Genomics**, v. 5, p. 79, Oct 2004.

WEBER, J. H. et al. Adenylyl cyclases from Plasmodium, Paramecium and Tetrahymena are novel ion channel/enzyme fusion proteins. **Cell Signal.**, v. 16, n. 1, p. 115-125, Jan 2004.

WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of Toxoplasma gondii. **Front. Biosci.**, v. 5, p. D391-D405, Apr 2000.

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

WENGER, N. K.; GREENBAUM, L. M. From adrenoceptor mechanisms to clinical therapeutics: Raymond Ahlquist, Ph.D., 1914-1983. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 3, n. 2 Pt 1, p. 419-421, Feb 1984.

WHO. **World Malaria Report** 2012.

WHO. **World Malaria Report** 2013.

WRIGHT, G. J.; RAYNER, J. C. Plasmodium falciparum erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 3, p. e1003943, Mar 2014.

YÁÑEZ, M.; GIL-LONGO, J.; CAMPOS-TOIMIL, M. Calcium binding proteins. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 740, p. 461-482, 2012.

ZHANG, J.; YANG, P. L.; GRAY, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 1, p. 28-39, Jan 2009.

ZHANG, M. et al. *The Plasmodium* eukaryotic initiation factor-2alpha kinase IK2 controls the latency of sporozoites in the mosquito salivary glands. **J. Exp. Med.**, v. 207, n. 7, p. 1465-1474, Jul 2010.

_____. Translational control in *Plasmodium* and *Toxoplasma* parasites. **Eukaryot. Cell**, v. 12, n. 2, p. 161-167, Feb 2013.

ZHAO, Y. et al. Molecular cloning, stage-specific expression and cellular distribution of a putative protein kinase from *Plasmodium falciparum*. **Eur. J. Biochem.**, v. 207, n. 1, p. 305-313, Jul 1992.

ZHENG, X.M. et al. A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). **Cell**, 1987 Jul. 31;50(3):361-368.