

GEPOLIANO DOS SANTOS CHAVES

**INVESTIGAÇÃO DE PfsR25, PUTATIVO RECEPTOR
SERPENTINO DE *PLASMODIUM FALCIPARUM***

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

Área de Concentração: 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

RESUMO

CHAVES, G. S. **Investigação de PfSR25, putativo receptor serpentina de *Plasmodium falciparum***. 2014. 107 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 conseqüências 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. 107 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.

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).

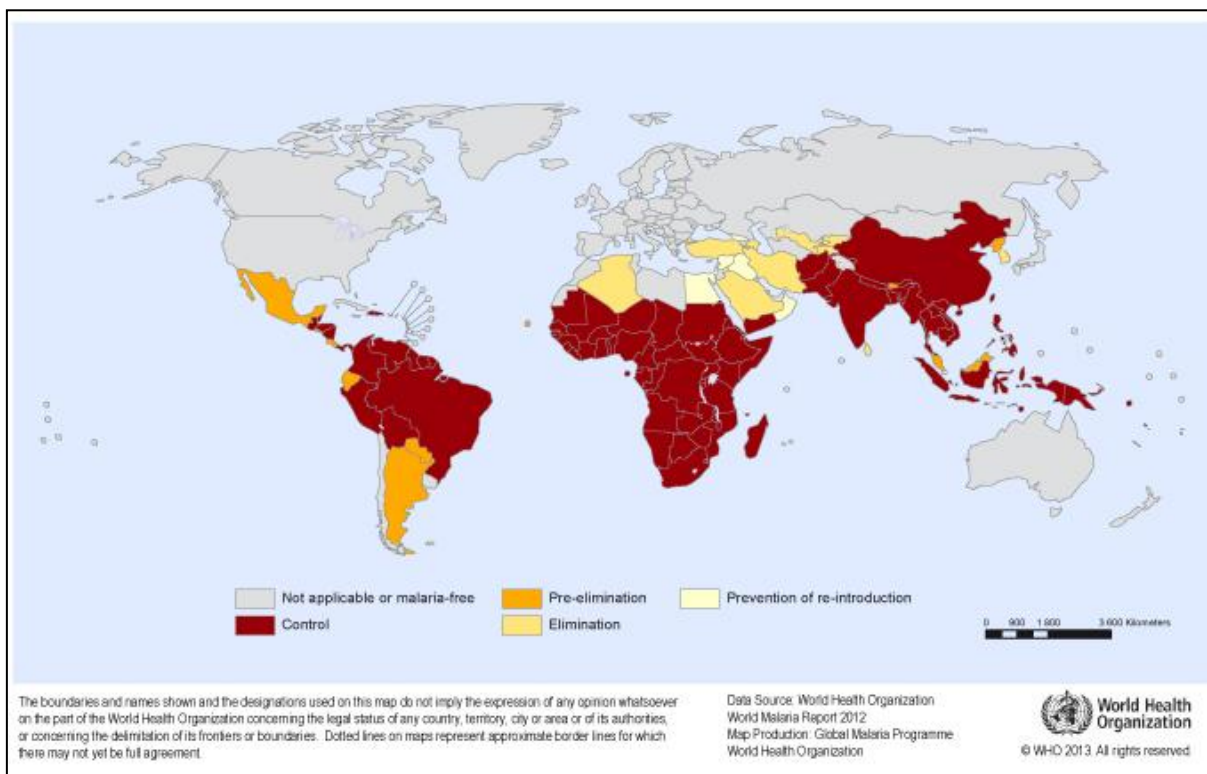


Figura 1. Estágio de eliminação da malária por países. Fonte: WHO, 2013.

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).

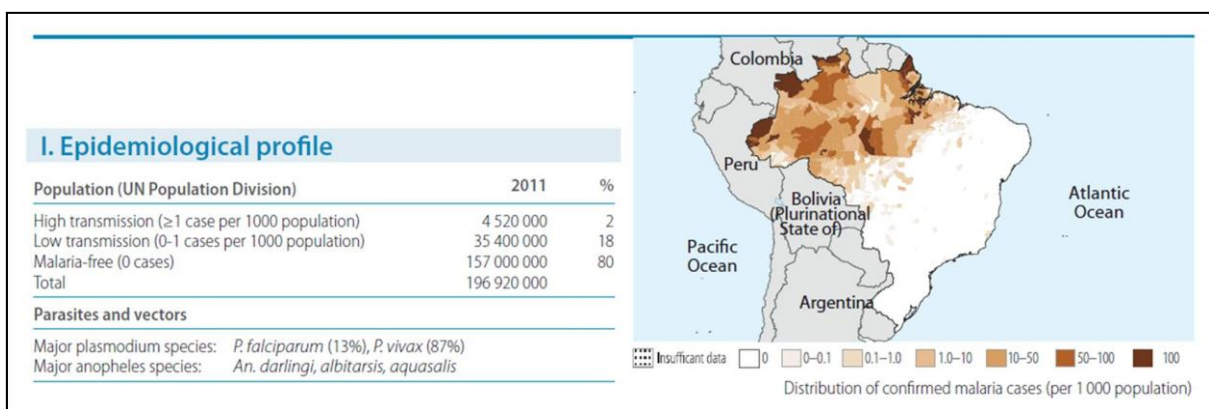


Figura 2. Perfil epidemiológico da malária no Brasil. As áreas mais afetadas estão localizadas principalmente na região Norte do País. Fonte: WHO, 2012.

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. malariae*, *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.

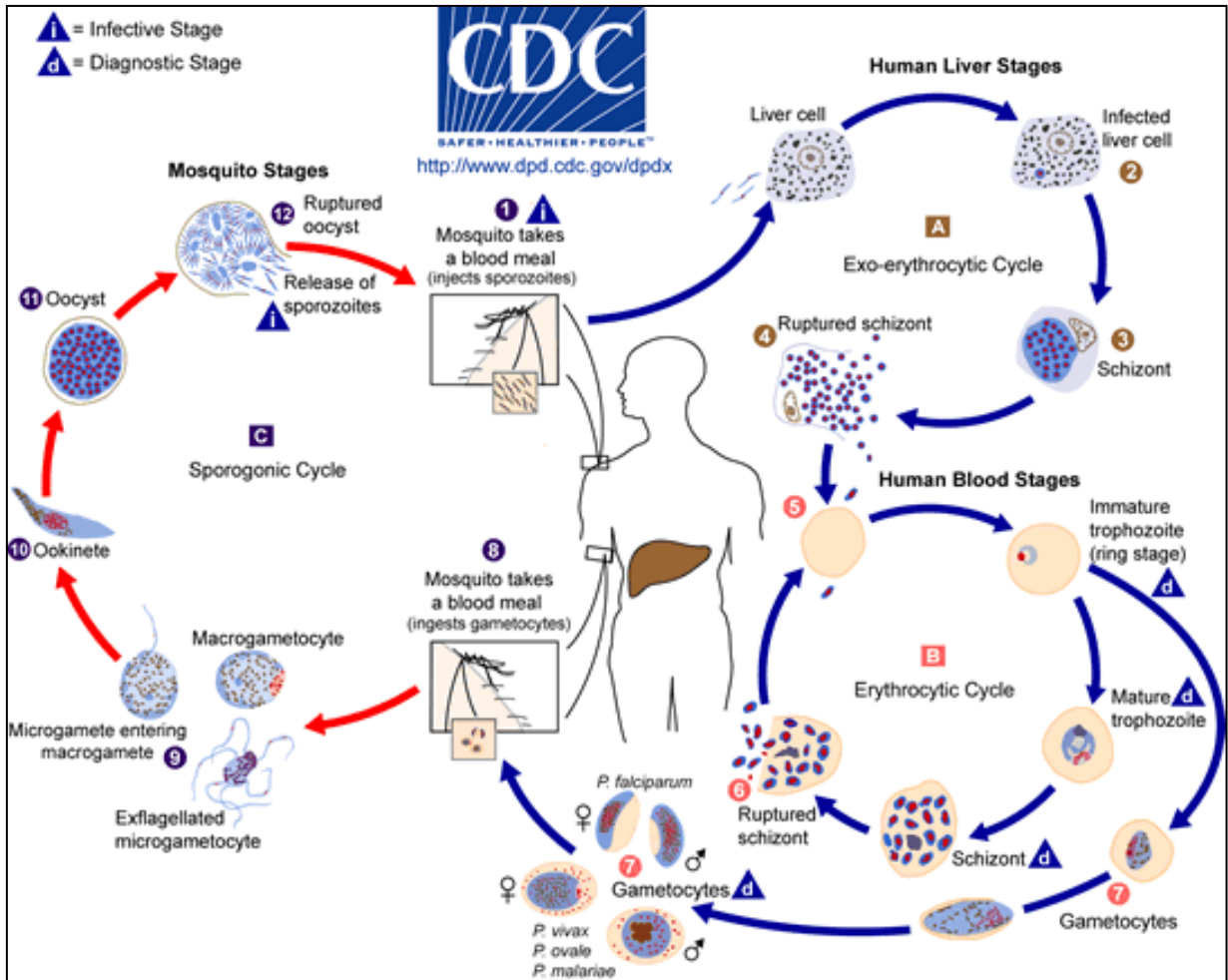


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium*. O parasita apresenta ciclo complexo que ocorre em dois hospedeiros. No hospedeiro intermediário, ocorre a fase assexuada, responsável pelos picos de febre observados em humanos. No hospedeiro definitivo (mosquito *Anopheles*) ocorre a fase sexuada. Fonte: WHO, 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 efator 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 serpentinais (SINGH; JADHAV, 2014). De acordo com a visão clássica de sinalização por receptores serpentinais, 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 serpentinais 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.

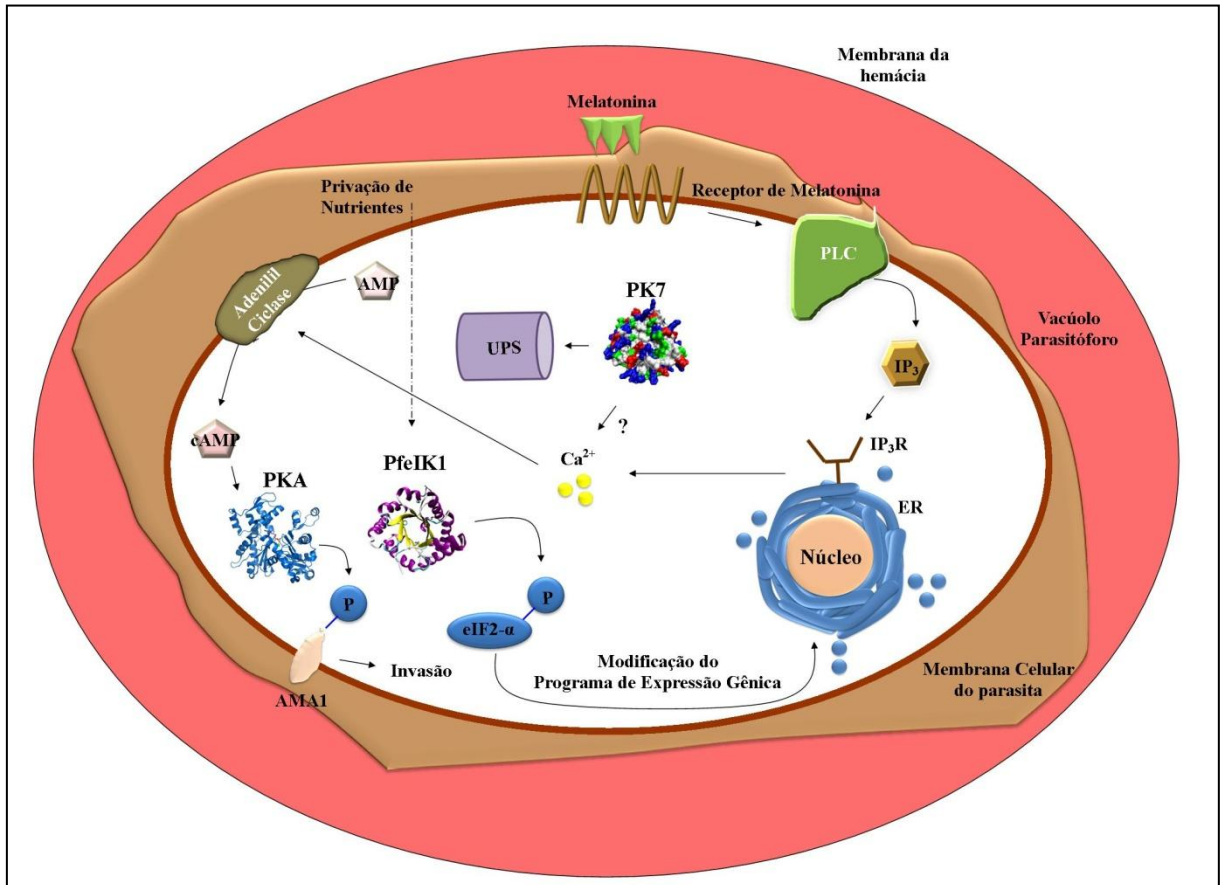


Figura 4. Via de sinalização que ocorre em *P. falciparum* desencadeada pela melatonina. Melatonina interage com seu receptor que ativa a fosfolipase C (PLC) responsável pela produção de IP_3 que irá se ligar a receptores no retículo endoplasmático, ER (IP_3R). Esta ligação promove a liberação de cálcio 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, Trecek 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 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-

¹ RSAS: *The Royal Swedish Academy of Sciences*

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: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12}$ (MOREIRA, 2014). Cada tipo de subunidade G_α ativa diferentes efetores *downstream*. Por exemplo, $G_{\alpha s}$ estimula adenilato ciclase, aumentando a concentração de cAMP, enquanto $G_{\alpha i}$ inibe adenilato ciclase, sinalizando o processo inverso. $G_{\alpha q}$ liga-se a PLC β 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, $G_\beta G_\gamma$, $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha 12}$ podem também controlar outras moléculas transdutoras de sinais, como as proteínas monoméricas ligantes de GTP das famílias Ras e Rho e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). O 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.

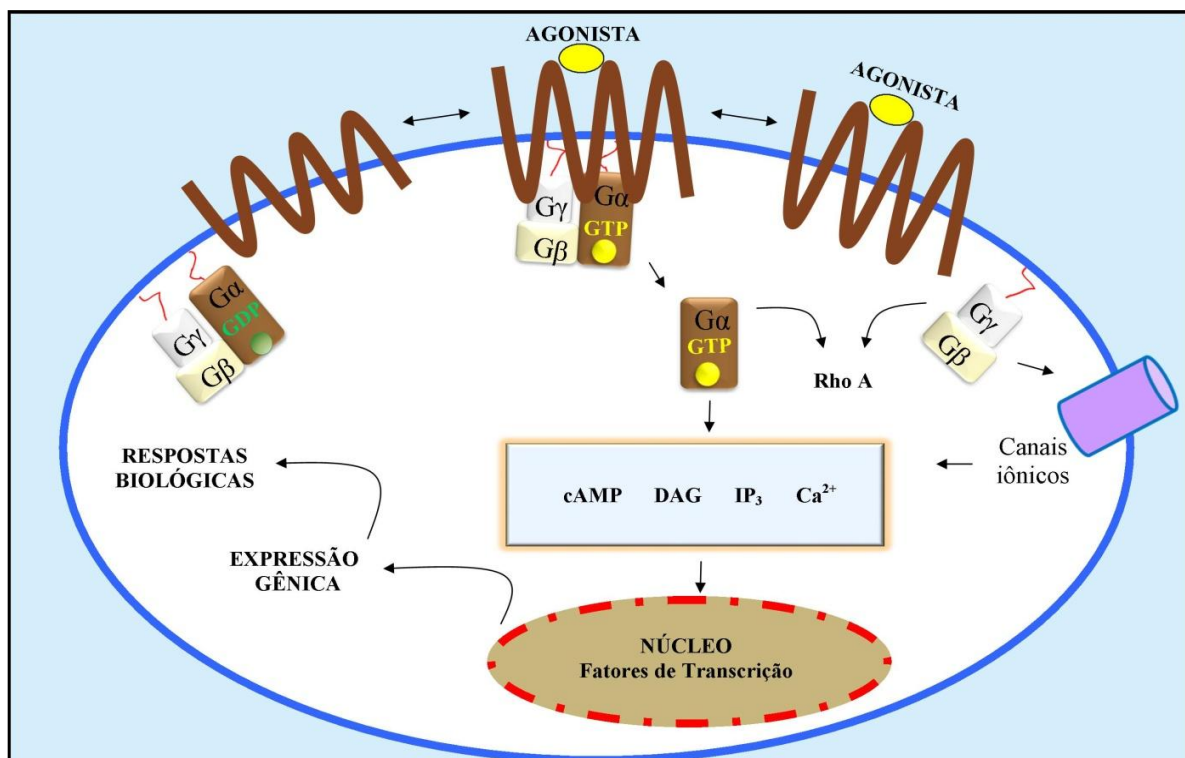


Figura 5. Via clássica da ativação dos receptores serpentina. O estado ativo do receptor é alcançado pela ligação do agonista. A mudança alostérica no receptor leva à ativação de uma proteína com atividade trocadora de guanósina (GEF - *Guanosine Exchange Factor*), que cataliza a troca da molécula de GDP por molécula de GTP, ativando a subunidade G_α . A subunidade G_α desliga-se do receptor, assim como das subunidades $G_\beta G_\gamma$. As proteínas G_α então interagem e ativam suas moléculas efetoras, resultando na produção de segundos mensageiros, os quais são produzidas de acordo com a natureza do estímulo externo recebido. O complexo $G_\beta G_\gamma$ 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, Aibel 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 serpentinos 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 serpentino em *P. falciparum* (WALLIN; HEIJNE, 1995). Nosso grupo realizou uma busca por receptores serpentinos 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 serpentino 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, conseqüentemente, 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 ciclina) 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-GTPases, 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. falciparum*, 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 sexuais (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 plecstrina (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 plecstrina 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 epissomal 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 (eIF2-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*.

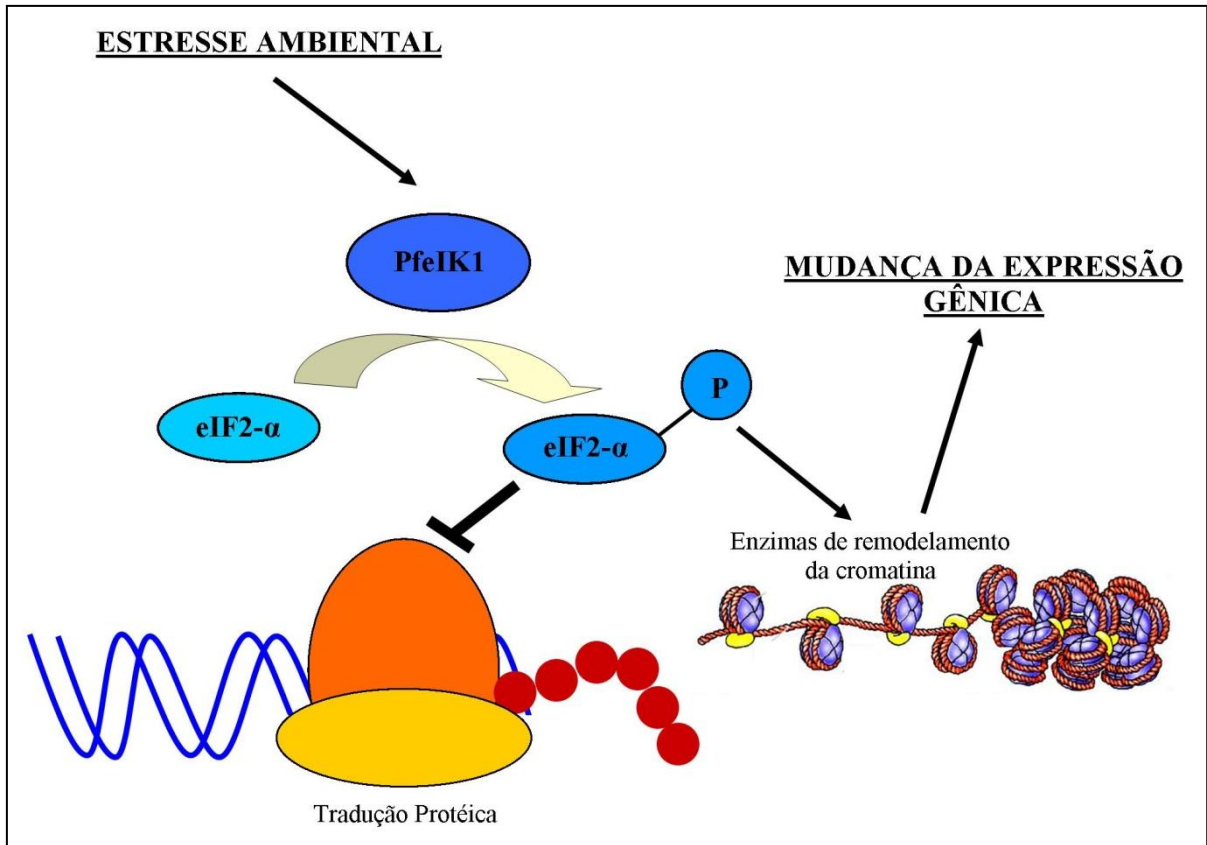


Figura 6. Mecanismo de fosforilação de PfeIF2 α pela quinase PfeIK1. A fosforilação de eIF2 em sua subunidade alfa leva à repressão da tradução de proteínas específicas, em resposta à privação de nutrientes. Enzimas capazes de promover remodelamento de cromatina e por consequência, mudança na expressão 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 Mg²⁺ 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 àquelas 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.

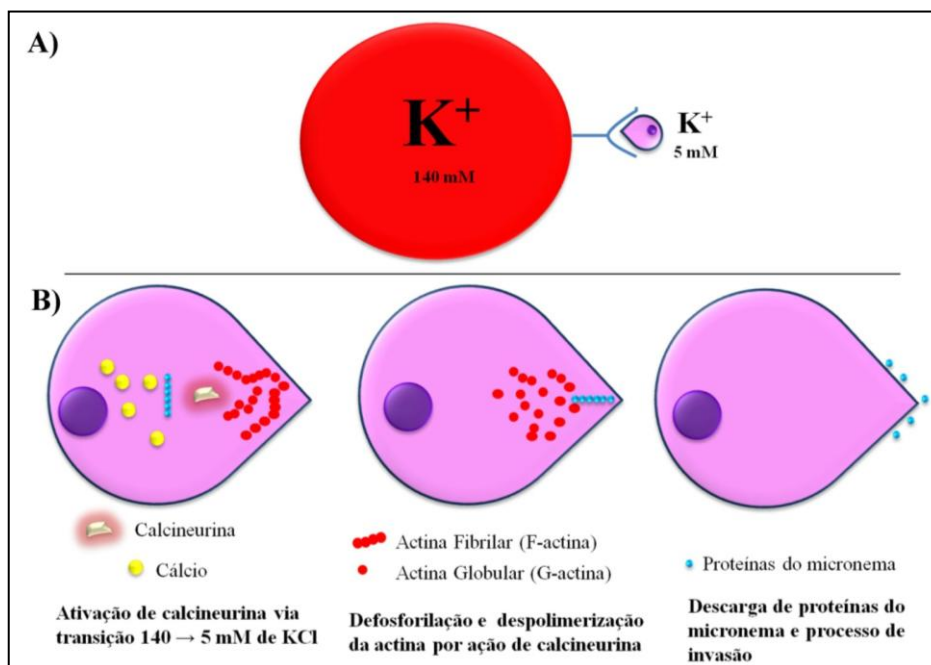


Figura 7. Papel de K^+ na ativação de calcineurina. A ativação da fosfatase leva à defosforilação e despolimerização de actina, para liberação de proteínas dos micronemas de *P. falciparum*. Em A, é mostrada a hemácia no plasma sanguíneo, de concentração de K^+ aproximadamente 5 mM. O interior da hemácia, 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 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 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.

2 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.

BAKIK, 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺-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. Abscisic 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.