

Eduardo Alves dos Santos

Papel do IP<sub>3</sub> na transdução de sinal e função da heme  
oxigenase em *Plasmodium falciparum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências

São Paulo  
2013

Eduardo Alves dos Santos

Papel do IP<sub>3</sub> na transdução de sinal e função da heme  
oxigenase em *Plasmodium falciparum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor  
em Ciências

Área de Concentração: Biologia da Relação  
Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profª. Dra. Célia Regina da Silva  
Garcia

Versão 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  
2013

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

© reprodução total

Santos, Eduardo Alves dos.

Papel do  $IP_3$  na transdução de sinal e função da heme oxigenase em *Plasmodium falciparum* / Eduardo Alves dos Santos. -- São Paulo, 2013.

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

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

Versão do título para o inglês:  $IP_3$  role in signal transduction and function of heme oxygenase in *Plasmodium falciparum*.

1. *Plasmodium* 2.  $IP_3$  3. Cálcio 4. Melatonina 5. Receptor de  $IP_3$   
6. Heme oxigenase I. Garcia, Profa. Dra. Célia Regina da Silva II.  
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-  
Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB039/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Eduardo Alves dos Santos.

Título da Tese: Papel do IP<sub>3</sub> na transdução de sinal e função da heme oxigenase em *Plasmodium falciparum*.

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

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

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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

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

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

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

---

Of. CEPSH. 031.11

PMAZ/mcgn

São Paulo, 29 de março de 2011.

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 113ª reunião realizada em 23.03.11, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Papel do InsP3 na transdução de sinal em Plasmodium*".

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

Atenciosamente,

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

Ilmo Sr.  
EDUARDO ALVES DOS SANTOS  
Departamento de Parasitologia  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

“Science investigates; religion interprets. Science gives man knowledge, which is power; religion gives man wisdom, which is control. Science deals mainly with facts; religion deals mainly with values. The two are not rivals.”

Martin Luther King, Jr.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Curie

“Life is like an onion; you peel it off one layer at a time, and sometimes you weep.”

Carl Sandburg

“Nothing is so dangerous to the progress of the human mind than to assume that our views of science are ultimate, that there are no mysteries in nature, that our triumphs are complete and that there are no new worlds to conquer.”

Humphry Davy

Aos meus pais e a cada professor que deparei em meu percurso.



## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Professora Dra. Célia Regina da Silva Garcia por ter aberto as portas de seu laboratório nos meus passos iniciais na ciência, pelas oportunidades dadas e ajuda nas horas difíceis, pela orientação e discussões tanto no período de iniciação científica quanto no doutorado.

À Dra. Paula Barttlet e Professor Dr. Andrew P. Thomas pela colaboração no início do meu doutorado, pela paciência e ajuda na microscopia, pelas dicas e apoio. A todos os membros do laboratório na UMDNJ que me fizeram sentir em casa durante meu estágio no exterior.

Aos colegas de laboratório com os quais tive o privilégio de conviver durante meu percurso. Todos sempre solícitos e abertos a discussões: Dr. Alexandre Budu, Dra. Mirian Moraes, Ms. Desiree Schuck, Dra. Fernanda Koyama, Lucas Borges, Dra. Laura Cruz, Dr. Julio Garcia, Dr. Dario Passos, Dra. Wania Lima, Henrique Borges, Gepoliano Santos, Ms. Ramira Yuri, Ms. Rafael Peres, Dr. Abhinay Sharma, Dra. Pratibha Gaur, Dra. Chiara Currá, Bruna Koresch, Ms. Paloma Sato, Dr. Mauro Azevedo. Aos queridos técnicos Dra. Myna Nakabashi e Bruno Cunha.

Aos ex-colegas de laboratório que me auxiliaram em meus primeiros passos na bancada e ensinaram o prazer da ciência: Dr. Flavio Beraldo, Prof. Dr. Marcos Gazarini, Dr. Piero Bagnaresi, Dra. Luciana Madeira e Dr. Robson Sartorello.

Aos professores Dr. David Fidock e Dr. Narla Mohandas por abrirem as portas de seu laboratório e ceder material para cultura de *Plasmodium* em New Jersey.

Aos Professores do Instituto de Química da USP que sempre me atenderam nos momentos de dúvida e permitiram usar seus laboratórios em muitos experimentos. Em especial ao Prof. Dr. Luis Henrique Catalani, Prof. Dr. Koite Araki, Professora Dra. Bettina Malnic e Professora Dra. Maria Júlia Manso Alves.

Ao Prof. Dr. Katsuhito Mikoshiba por ceder à construção IP<sub>3</sub> esponja. Ao Prof. Dr. Akio Kishigami pela ajuda teórica na montagem da coluna de afinidade ao IP<sub>3</sub>.

Aos colaboradores de São Carlos que ajudaram na evolução do projeto envolvendo heme oxigenase. Em especial ao Prof. Dra. Rafael Guido, Prof. Dra. Ana Paula Araujo e Prof. Dr. Glaucius Oliva. Ao Ms. Fernando V. Maluf pela ajuda e explicação na expressão e purificação da enzima.

À Ms. Eliciane Mattos pela enorme paciência e colaboração na técnica do gel bidimensional. Ao Deyvid Amgarten e Dr. Pedro Galante pela preciosa ajuda sobre bioinformática.

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

À FAPESP, pela bolsa de doutorado direto concedida e pelo profissionalismo e eficiência demonstrados. A FAPESP e ao CNPq por apoiarem a pesquisa no laboratório.

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

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

Aos meus pais, Evaldo e Marina pelo investimento e apoio em minha educação, pela compreensão e ajuda nas horas difíceis. Aos meus irmãos, Evaldo Jr e Evandro, pelo companheirismo. A todos os meus familiares e amigos pelo apoio.

## RESUMO

Santos EA. Papel do IP<sub>3</sub> na transdução de sinal e função da heme oxigenase em *Plasmodium falciparum*. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

*Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, possui um ciclo de vida que envolve dois hospedeiros (fêmea do mosquito *Anopheles* e humanos) onde apresenta refinadas estratégias que envolvem mudanças morfológicas e bioquímicas em diferentes ambientes para garantir a sua sobrevivência. O estudo da maquinaria de sinalização deste parasita tem revelado a geração de segundos mensageiros e proteínas efetoras da sinalização celular importantes na percepção de estímulos extracelulares no parasita. Esta tese tem como finalidade demonstrar que o *P. falciparum* dentro do eritrócito é capaz de usar a via de sinalização celular dependente do segundo mensageiro inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Para isto usamos um IP<sub>3</sub> permeável a membrana celular denominado (caged-IP<sub>3</sub>) que é liberado para atuar como segundo mensageiro na presença de luz ultravioleta. Investigamos os estoques de Ca<sup>2+</sup> intracelular sensíveis ao IP<sub>3</sub> neste parasita e exploramos a sensibilidade ao IP<sub>3</sub> em diferentes estágios no ciclo intraeritrocítico. Demonstramos que o hormônio melatonina, importante na manutenção da sincronicidade da fase intraeritrocítica de *P. falciparum*, é capaz de aumentar a concentração de IP<sub>3</sub> neste parasita. Com o uso de uma coluna de afinidade ao IP<sub>3</sub> tentamos encontrar proteínas candidatas ao receptor de IP<sub>3</sub> em *P. falciparum*. Este trabalho também estuda a enzima heme oxigenase de *P. falciparum* (PfHO). Testamos a capacidade desta enzima em converter biliverdina (BV) em bilirubina (BR), uma importante reação do catabolismo da hemina. Estudamos a modulação desta atividade na presença de diversas metaloprotoporfirinas e o potencial destes compostos como antimaláricos. Reportamos que a biliverdina é capaz de modular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* e apresentamos a proteína enolase de *P. falciparum* como candidato ao sensor de BV neste parasita.

**Palavras-chave:** *Plasmodium*. IP<sub>3</sub>. Ca<sup>2+</sup>. Melatonina. Receptor de IP<sub>3</sub>. Heme oxigenase. Metaloprotoporfirinas. Biliverdina. Enolase.

## ABSTRACT

Santos EA. IP<sub>3</sub> role in signal transduction and function of heme oxygenase in *Plasmodium falciparum*. [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

*Plasmodium falciparum*, the etiological agent of malaria, possesses a life cycle that involves two hosts (the female of *Anopheles* mosquito and human) on which has refined strategies involving morphological and biochemical changes in different environments to ensure its survival. The study of the signaling machinery of the parasite has revealed the generation of second messengers and effector of cell signaling proteins important in the perception of extracellular stimuli in the parasite. This thesis aims to demonstrate that *P. falciparum* within the erythrocyte is able to use the cellular signaling pathway dependent on second messenger inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). For this purpose, we use a cell membrane-permeable IP<sub>3</sub> called (caged-IP<sub>3</sub>) which is released to act as a second messenger in the presence of ultraviolet light. We investigated the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores sensitive to IP<sub>3</sub> and explore the parasite sensitivity to IP<sub>3</sub> at different stages in the intraerythrocytic cycle. We demonstrate that melatonin hormone, important in maintenance synchronicity at intraerythrocytic phase of *P. falciparum*, is capable of increasing the IP<sub>3</sub> concentration on this parasite. Using an IP<sub>3</sub> affinity column, we tried to find candidate proteins for IP<sub>3</sub> receptor in *P. falciparum*. This work also studies the enzyme *P. falciparum* heme oxygenase (*PfHO*). We tested the ability of this enzyme to convert biliverdin (BV) in bilirubin (BR), an important reaction of heme catabolism. We studied the modulation of this activity in the presence of various metalloprotoporphyrins and the potential of these compounds as antimalarials. We reported that biliverdin is capable of modulating the intraerythrocytic cycle of *P. falciparum* and present *P. falciparum* enolase as candidate for BV sensor on this parasite.

**Keywords:** *Plasmodium*. IP<sub>3</sub>. Ca<sup>2+</sup>. Melatonin. IP<sub>3</sub> receptor. Heme oxygenase. Metalloprotoporphyrins. Biliverdin. Enolase

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2-APB** – 2-Aminoethoxydiphenyl borat
- 8-Bz-cAMP** – 8-benzil-adenosina monofosfato cíclica
- A** - anel
- AC** – adenilato ciclase
- AFMK** – N-acetil-n-formil-metoxiquinuramina
- AMPc** – adenosina monofosfato ciclico
- ANOVA**- *analysis of variance*
- ATP** – adenosina trifosfato
- BLAST** -*Basic Local Aligment Search Tool*
- CAM**– calmodulina
- Co-PPIX** – cobalto protoporfirina IX
- Cu-PPIX** – cobre protoporfirina IX
- cAMP** – adenosina monofosfato cíclica
- DAG** - diacilglicerol
- ECC** - entrada capacitativa de cálcio
- DMSO** - dimetilsufóxido
- DNA** – *deoxyribonucleic acid*
- EDTA** - *ethylenediamine tetraacetic acid*
- EGTA** - *ethylene glycol tetraacetic acid*
- ELISA** - *enzyme-linked immunosorbent assay*
- Fe-PPIX** – ferro protoporfirina IX (hemina)
- ME** – membrana do eritrócito
- RE** – retículo endoplasmático
- RBC**–red blood cell (eritrócito)
- E** - esquizonte
- FACS** – *fluorescence-activated cell sorting*
- FRET** – *fluorescence resonance energy transfer*
- GFP** – *green fluorescent protein*
- GPI** - *glycophosphatidylinositol*
- HEPES** - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
- HepG2** – *liver hepatocellular carcinoma cells*

**iRBC** – Eritrócito infectado  
**IP<sub>1</sub>** – inositol monofosfato bifosfato  
**IP<sub>2</sub>** – inositol 1,4 bifosfato  
**IP<sub>3</sub>** – inositol 1,4,5 trifosfato  
**IP<sub>3</sub> 3- KI** – inositol 1,4,5 trifosfato 3-quinase  
**IP<sub>4</sub>** – inositol 1,3,4,5 tetrafosfato  
**IP<sub>5</sub>-fosfatase** – inositol polifosfato 5-fosfatase  
**IP<sub>3</sub>R** – receptor de inositol trifosfato  
**IPTG** – *β-D thiogalactopyranoside*  
**HO** – heme oxigenase  
**MAPK** – *mitogen activated protein kinase*  
**Mel** - melatonina  
**Mer** - merozoíto  
**Mit** - mitocôndria  
**mSP** – *merozoite surface protein*  
**MT1** – receptor de melatonina 1  
**MT2** – receptor de melatonina 2  
**m/v** – massa/volume  
**MVP** – membrana do vacúolo parasitóforo  
**Ni-PPIX** – níquel protoporfirina IX  
**Par** – parasite  
**PBS** – *phosphate buffered saline*  
**PCR** – *polymerase chain reaction*  
**PfEMP-P. falciparum** erythrocyte membrane protein  
**PfHO** - *P. falciparum haem oxygenase*  
**PI** – fosfatidilinositol  
**PIP** - fosfatidilinositol 4- fosfato  
**PIP<sub>2</sub>** - fosfatidilinositol 4,5-bifosfato  
**PIPKI** - fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase  
**PKA** – *protein kinase A*  
**PKB** – *protein kinase B*  
**PKI** – *protein kinase A inhibitor*  
**PLC** – *phospholipase C*

**PLC $\beta$**  - phospholipase C beta

**PLC $\delta$**  - phospholipase C delta

**PM** – metil propioniloxi

**PPIX** –protoporfirina IX

**MP** – membrana plasmática

**PMCA** – plasma membrane calcium ATPase

**Proteína G** – proteína ligante de nucleótidos de guanina

**RPMI** - *Roswell Park Memorial Institute*

**RyR** –receptor de rianodina

**SDS** – *sodium dodecyl sulfate*

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

**SERCA** – *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase*

**Thaps** - tapsigargina

**T**- trofozoíto

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

**UV** – ultravioleta

**VA** – vacuolo ácido

**Zn-PPIX** – zinco protoporfirina IX

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Filogenia baseada no gene Citocromo B evidenciando as relações de parentescos entre as espécies de <i>Plasmodium</i> que acometem humanos.....	24
<b>Figura 2-</b> Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> evidenciando os eventos que ocorrem no hospedeiro invertebrado e vertebrado.....	27
<b>Figura 3-</b> A sinalização por $Ca^{2+}$ e sua homeostase.....	30
<b>Figura 4-</b> Via de sinalização de melatonina em <i>Plasmodium</i> .....	34
<b>Figura 5-</b> Esquema clássico da formação e degradação do inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e sua função como segundo mensageiro.....	37
<b>Figura 6-</b> Esquema do processo de fotoliberação do caged- $IP_3$ .....	38
<b>Figura 7-</b> Esquema das vias de remoção da hemina em <i>P. falciparum</i> .....	48
<b>Figura 8-</b> Uso do probenecide inibe a compartimentalização do Fluo-4-Am.....	64
<b>Figura 9-</b> Fotólise do caged- $IP_3$ mobilizando $Ca^{2+}$ em eritrócito infectado por <i>P. falciparum</i> em estágio trofozoíto marcado com Fluo 4-AM (5 $\mu$ M) e cged- $IP_3$ (2 $\mu$ M).....	65
<b>Figura 10-</b> Estímulo do pulso ultravioleta não mobiliza $Ca^{2+}$ em eritrócitos não infectados e infectados com <i>P. falciparum</i> no estágio trofozoíto marcados com Fluo 4-AM.....	66
<b>Figura 11-</b> A fotoliberação do $IP_3$ não mobiliza $Ca^{2+}$ em eritrócitos humanos marcados com caged- $IP_3$ e Fluo 4-AM.....	67
<b>Figura 12-</b> A liberação de $IP_3$ induz a mobilização de $Ca^{2+}$ em compartimentos sensíveis a tapsigargina em eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> no estágio trofozoíto.....	68
<b>Figura 13-</b> Eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> no estágio esquizonte são insensíveis ao $IP_3$ .....	70
<b>Figura 14-</b> Melatonina causa mobilização transiente de $Ca^{2+}$ em eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> no estágio trofozoíto.....	71
<b>Figura 15-</b> Aumento na formação de fosfoinosítois induzido por melatonina em eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> .....	73
<b>Figura 16-</b> Aumento de $Ca^{2+}$ induzido por $IP_3$ é abolido após o estímulo com melatonina.....	74
<b>Figura 17-</b> A liberação de $IP_3$ não potencializa a mobilização de $Ca^{2+}$ induzida por melatonina.....	75
<b>Figura 18-</b> Estratégia e construção do plasmídeo $IP_3$ -esponja-pARL.....	76
<b>Figura 19-</b> Estratégia e construção do plasmídeo IRIS-pARL.....	78



<b>Figura 20-</b> Eritrócito infectado com <i>Plasmodium falciparum</i> transfetado com vetor pARL-GFP.....	79
<b>Figura 21-</b> Proteínas eluídas da coluna de cromatografia de afinidade ao IP <sub>3</sub> .....	81
<b>Figura 22-</b> Purificação da <i>P. falciparum</i> heme oxigenase recombinante.....	93
<b>Figura 23-</b> Atividade biliverdina redutase catalisada pela PfHO.....	94
<b>Figura 24-</b> Bilirrubina é produto final da reação biliverdina redutase catalisa da pela PfHO.....	95
<b>Figura 25-</b> Atividade biliverdina redutase catalisada pela <i>P. falciparum</i> heme oxigenase na presença de hemina.....	96
<b>Figura 26-</b> Atividade biliverdina redutase catalisada pela <i>P. falciparum</i> heme oxigenase na presença de protoporfirina IX.....	97
<b>Figura 27-</b> Atividade biliverdina redutase catalisada pela <i>P. falciparum</i> heme oxigenase na presença de cobalto protoporfirina IX.....	97
<b>Figura 28-</b> Atividade biliverdina redutase catalisada pela <i>P. falciparum</i> heme oxigenase na presença de cobre protoporfirina IX.....	98
<b>Figura 29-</b> Atividade biliverdina redutase catalisada pela <i>P. falciparum</i> heme oxigenase na presença de manganês protoporfirina IX.....	99
<b>Figura 30-</b> Atividade biliverdina redutase catalisada pela <i>P. falciparum</i> heme oxigenase na presença de níquel protoporfirina IX.....	99
<b>Figura 31-</b> Atividade biliverdina redutase catalisada pela <i>P. falciparum</i> heme oxigenase na presença de zinco protoporfirina IX.....	100
<b>Figura 32-</b> Medição da hemozína em <i>P. falciparum</i> .....	101
<b>Figura 33-</b> Gráfico de pontos (dispersão versus fluorescência) obtida em um citômetro de fluxo FACS Calibur.....	103
<b>Figura 34-</b> Viabilidade dos eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> após 48 horas de incubação, na presença de hemina.....	104
<b>Figura 35-</b> Viabilidade dos eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> após 48 horas de incubação, na presença de protoporfirina IX.....	104
<b>Figura 36-</b> Viabilidade dos eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> após 48 horas de incubação, na presença do cobalto protoporfirina IX.....	105
<b>Figura 37-</b> Viabilidade dos eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> após 48 horas de incubação, na presença de cobre protoporfirina IX.....	106

<b>Figura 38-</b> Viabilidade dos eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> após 48 horas de incubação, na presença de manganês protoporfirina IX.....	107
<b>Figura 39-</b> Viabilidade dos eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> após 48 horas de incubação, na presença de níquel protoporfirina IX.....	108
<b>Figura 40-</b> Viabilidade dos eritrócitos infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> após 48 horas de incubação, na presença de zinco protoporfirina IX.....	109
<b>Figura 41-</b> Efeito da incubação das cápsulas de atelocolágeno marinho e DMSO após 48 horas em cultura com <i>P. falciparum</i> .....	110
<b>Figura 42-</b> Determinação dos estágios intraeritrocíticos em <i>P. falciparum</i> em FACS.....	113
<b>Figura 43-</b> Efeito da hemina no ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> .....	114
<b>Figura 44-</b> Efeito da biliverdina no ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> .....	115
<b>Figura 45-</b> Efeito da bilirrubina no ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> .....	116
<b>Figura 46-</b> Ensaio para identificação de proteína-biliverdina em gel bidimensional.....	117
<b>Figura 47-</b> Esquema da via de sinalização estimulada pela melatonina em eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> no estágio trofozoíto.....	128

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Proteínas importantes para via de sinalização PLC/ IP <sub>3</sub> identificadas no controle positivo contendo extrato de proteína de fígado de <i>Mus musculus</i> .....	82
<b>Tabela 2-</b> Lista de proteínas de <i>P. falciparum</i> exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP <sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico.....	83
<b>Tabela 3-</b> Efeito da incubação de metaloprotoporfirinas encapsuladas após 48 horas em cultura com <i>P. falciparum</i> .....	111
<b>Tabela 4-</b> Lista de proteínas identificadas no ensaio com biliverdina/acetato de zinco no gel bidimensional.....	119

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1 Malária.....	23
1.2 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .....	25
<b>1.2.1 Desenvolvimento sincrônico da fase intraeritrocítica em <i>Plasmodium</i></b> .....	27
1.3 Sinalização celular em <i>Plasmodium</i> .....	29
<b>1.3.1 Maquinaria de sinalização via <math>Ca^{2+}</math></b> .....	29
<b>1.3.2 Via de sinalização pela melatonina em <i>Plasmodium</i></b> .....	32
1.4 Inositol 1,4,5-trifosfato (IP <sub>3</sub> ).....	35
<b>1.4.1 IP<sub>3</sub> e metabolismo</b> .....	35
<b>1.4.2 Caged-IP<sub>3</sub></b> .....	38
<b>1.4.3 Evidência da via metabólica de fosfatidilinositol e do IP<sub>3</sub> em <i>Plasmodium</i></b> .....	39
1.5 Receptor Inositol 1,4,5-trifosfato (IP <sub>3</sub> R).....	41
<b>1.5.1 Busca pelo receptor de IP<sub>3</sub> em <i>Plasmodium</i></b> .....	42
1.6 Digestão da hemoglobina em <i>Plasmodium</i> e os efeitos tóxicos da formação da hemina.....	44
<b>1.6.1 Mecanismos de defesa contra hemina em <i>Plasmodium</i></b> .....	44
1.6.1.1 Hemozoína e sua formação.....	44
1.6.1.2 Heme oxigenase (HO).....	46
<b>1.6.2 Protoporfirina XI e metaloprotoporfirinas</b> .....	48
<b>1.6.3 Ação da metaloprotoporfirinas em <i>Plasmodium</i></b> .....	49
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	51
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
3.1 Cultivo e sincronização de fases intraeritrocíticas de <i>P. falciparum</i> .....	52
3.2 Lise de hemácias para isolamento de parasitas <i>P. falciparum</i> .....	52
3.3 Marcações com Fluo-4 AM e Fotólise do caged-IP <sub>3</sub> em eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> .....	52
3.4 Montagem do pARL-IP <sub>3</sub> -esponja e pARL-IRIS.....	53
3.5 Transfecção episomal em <i>Plasmodium falciparum</i> .....	54
3.6 Incorporação em eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i> com [H <sup>3</sup> ]-mio-inositol e medição de [H <sup>3</sup> ]-inositol polifosfatos.....	54
3.7 Cromatografia de afinidade ao inositol 1,4,5-trifosfato (IP <sub>3</sub> ).....	55

3.8 Clonagem, expressão e purificação da Heme Oxigenase Recombinante de <i>P. falciparum</i> .....	57
3.9 Atividade biliverdina redutase da heme oxigenase recombinante de <i>P. falciparum</i> e sua modulação na presença de metaloprotoporfirinas.....	58
3.10 Análise em HPLC.....	59
3.11 Incubação de <i>P. falciparum</i> na presença de metaloprotoporfirinas/ metaloprotoporfirinas encapsuladas, biliverdina e bilirrubina.....	60
3.12 Contagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de <i>P. falciparum</i> .....	60
3.13 Medição de hemozína <i>in vivo</i> em <i>P. falciparum</i> .....	61
3.14 Ensaio de identificação de proteínas de <i>P. falciparum</i> que se liga a biliverdina em sistema de eletroforese bidimensional.....	61
3.15 Análise estatística.....	62
<b>4 RESULTADOS</b> .....	63
4.1 Papel do IP <sub>3</sub> na transdução de sinal em <i>P. falciparum</i> .....	63
<b>4.1.1 Mobilização de Ca<sup>2+</sup> na presença do segundo mensageiro IP<sub>3</sub></b> .....	63
4.1.1.1 <i>Uso do probenecide na medição de Ca<sup>2+</sup> citossólico em P. falciparum</i> .....	63
4.1.1.2 <i>A fotoliberação de IP<sub>3</sub> induz a liberação de Ca<sup>2+</sup> em eritrócitos infectados com P. falciparum no estágio trofozoíto</i> .....	64
4.1.1.3 <i>A liberação de IP<sub>3</sub> induz a mobilização de Ca<sup>2+</sup> em compartimentos sensíveis a taspigargina em eritrócitos infectados com P. falciparum no estágio trofozoíto</i> .....	67
4.1.1.4 <i>Eritrócitos infectados com P. falciparum no estágio esquizonte são insensíveis ao IP<sub>3</sub></i> .....	69
<b>4.1.2 A via de sinalização da melatonina inclui a geração IP<sub>3</sub> em P. falciparum</b> .....	70
4.1.2.1 <i>Melatonina causa mobilização transiente de Ca<sup>2+</sup> em eritrócitos infectados com P. falciparum no estágio trofozoíto</i> .....	70
4.1.2.2 <i>Tratamento com melatonina aumenta a concentração de inositol fosfatos em eritrócitos infectados com P. falciparum</i> .....	72
4.1.2.3 <i>Pré-tratamento de melatonina previne a indução de Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub> em eritrócitos infectados por P. falciparum</i> .....	73
<b>4.1.3 Transfecção epissomal com moduladores e sensores de IP<sub>3</sub> em Plasmodium falciparum</b> .....	75
4.1.3.1 <i>Construção do plasmídeo IP<sub>3</sub>-esponja-pARL</i> .....	75
4.1.3.2 <i>Construção do plasmídeo IRIS-pARL</i> .....	77

4.1.3.3	Transfeção epissomal com as construções IP <sub>3</sub> -esponja e IRIS-pARL.....	78
<b>4.1.4</b>	<b>Busca pelo receptor de IP<sub>3</sub> em <i>P. falciparum</i>.....</b>	<b>80</b>
4.1.4.1	Coluna de cromatografia de afinidade ao IP <sub>3</sub> .....	80
4.2	Papel da heme oxigenase em <i>P. falciparum</i> .....	92
<b>4.2.1</b>	<b>Explorando a atividade biliverdina redutase da PfHO.....</b>	<b>92</b>
4.2.1.1	Expressão e purificação da <i>P. falciparum</i> heme oxigenase recombinante (PfHO).....	92
4.2.1.2	Atividade biliverdina redutase (BVR) da PfHO recombinante.....	93
4.2.1.3	Modulando a atividade biliverdina redutase (BVR) da PfHO recombinante com metaloprotoporfirinas.....	95
<b>4.2.2</b>	<b>Ação das metaloprotoporfirinas em <i>P. falciparum</i>.....</b>	<b>100</b>
4.2.2.1	Zn-PPIX inibe a formação de hemozoína em culturas de <i>P. falciparum</i> .....	100
4.2.2.2	Efeito da hemina, protoporfirina e metaloprotoporfirinas na viabilidade de <i>P. falciparum</i> .....	102
4.2.2.3	Efeito da hemina, protoporfirina e metaloprotoporfirinas encapsuladas na viabilidade de <i>P. falciparum</i> .....	109
<b>4.2.3</b>	<b>Ação da hemina, biliverdina e bilirrubina no ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>.....</b>	<b>112</b>
4.2.3.1	Efeito do catabolismo da hemina no ciclo celular de <i>P. falciparum</i> .....	112
4.2.3.2	Busca por proteínas de <i>P. falciparum</i> capazes de se ligar a biliverdina.....	116
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>122</b>
5.1	Papel do IP <sub>3</sub> na transdução de sinal em <i>P. falciparum</i> .....	122
<b>5.1.1</b>	<b>Mobilização de Ca<sup>2+</sup> na presença do segundo mensageiro IP<sub>3</sub> em <i>Plasmodium</i>.....</b>	<b>122</b>
5.1.1.1	Probenecide é importante nos ensaios de medição de Ca <sup>2+</sup> em <i>P. falciparum</i> .....	122
5.1.1.2	<i>P. falciparum</i> no estágio trofozoíto em seu ambiente natural é capaz de mobilizar Ca <sup>2+</sup> na presença de IP <sub>3</sub> .....	122
5.1.1.3	Retículo endoplasmático é o principal estoque de Ca <sup>2+</sup> sensível IP <sub>3</sub> em <i>P. falciparum</i> .....	124
5.1.1.4	Sensibilidade ao IP <sub>3</sub> em diferentes estágios de desenvolvimento do <i>P. falciparum</i> .....	125
<b>5.1.2A</b>	<b>via de sinalização da melatonina inclui a geração de IP<sub>3</sub> em <i>P. falciparum</i>.....</b>	<b>126</b>

5.1.2.1 Melatonina mobiliza $Ca^{2+}$ através da via dependente de $IP_3$ em <i>P. falciparum</i> .....	126
<b>5.1.3</b> Uso do modulador $IP_3$ -esponja e do sensor de $IP_3$ IRIS em <i>P. falciparum</i> .....	128
5.1.3.1 $IP_3$ -esponja e IRIS expresso episomalmente em <i>P. falciparum</i> no vetor pARL.....	128
<b>5.1.4</b> Busca pelo receptor de $IP_3$ em <i>P. falciparum</i> .....	130
5.1.4.1 Coluna de cromatografia de afinidade ao $IP_3$ .....	130
5.2 Papel da heme oxigenase em <i>P. falciparum</i> .....	133
<b>5.2.1</b> Atividade Biliverdina Redutase (BVR) da PfHO.....	133
<b>5.2.2</b> Metaloprotoporfirinas são capazes de modular a atividade biliverdina redutase (BVR) da PfHO recombinante.....	135
5.3 Ação das metaloprotoporfirinas em <i>P. falciparum</i> .....	136
<b>5.3.1</b> Zn-PPIX inibe a formação de hemozoína em culturas de <i>P. falciparum</i> .....	136
<b>5.3.2</b> Efeito da hemina, protoporfirina e metaloprotoporfirinas na viabilidade de <i>P. falciparum</i> .....	137
<b>5.3.3</b> O encapsulamento das metaloprotoporfirinas otimiza o potencial antimalárico contra <i>P. falciparum</i> .....	138
5.4 Ação da hemina, biliverdina e bilirrubina no ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> .....	139
<b>5.4.1</b> Hemina e biliverdina modulam o ciclo celular de <i>P. falciparum</i> .....	139
<b>5.4.2</b> Busca do receptor de BV em <i>P. falciparum</i> .....	140
<b>6</b> CONCLUSÕES.....	142
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	143
<b>APÊNDICE</b> - Melatonin and $IP_3$ -induced $Ca^{2+}$ release from intracellular stores in the malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> within infected red blood cells.....	159

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Malária

Malária, causada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, é um dos maiores flagelos da humanidade. Esta doença responde por mais de 500 milhões de casos clínicos por ano e mais de um milhão de mortes, na maioria crianças. (Snow et al., 2005).

O parasita da malária existe há pelo menos 150 milhões de anos (Carter, Mendis, 2002) e infecta vários grupos dentro de *Vertebrata*: aves, répteis e mamíferos. Há cinco espécies de *Plasmodium* capazes de infectar humanos: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. knowlesi*.

Atualmente, as espécies mais prevalentes que acometem humanos são *P. falciparum* (África sub-saariana) e *P. vivax* (Ásia, América Central e América do Sul) (Carter, Mendis, 2002), sendo *P. falciparum* a espécie que causa a forma mais letal da doença (Miller et al., 2002).

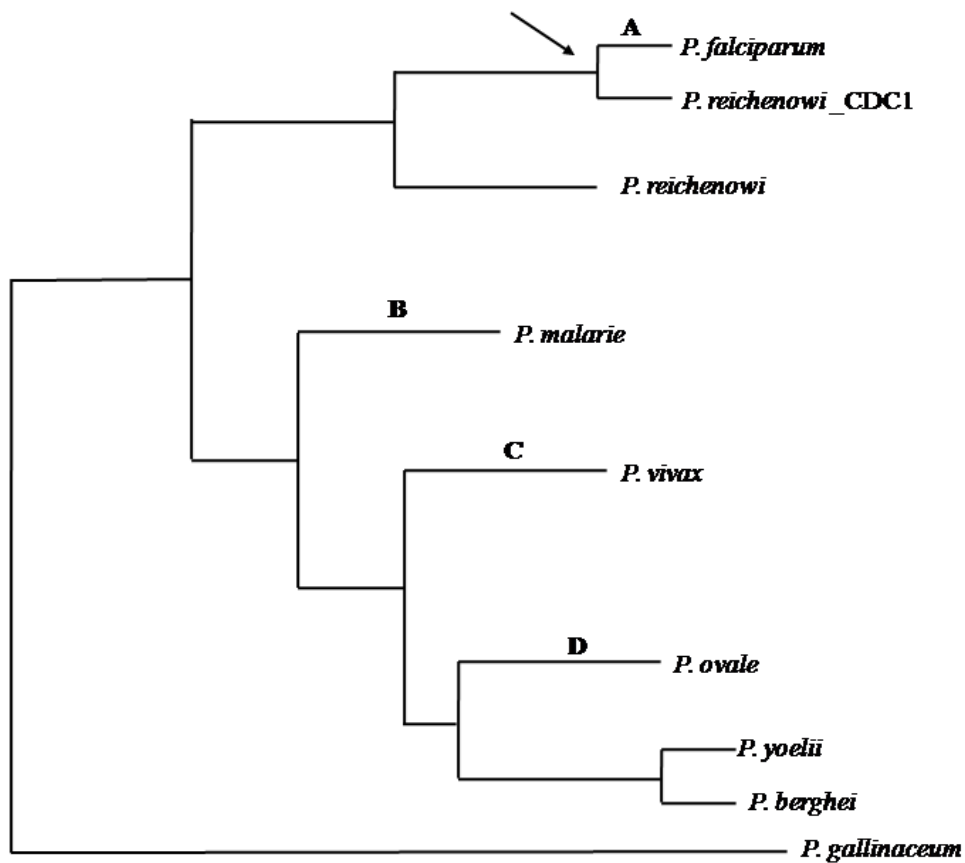
A extrema patogenicidade do *P. falciparum* sugere um recente contato com o humano, adquirido pela transferência de um hospedeiro não humano (Russel, 1950). Rich et al. (2009) mostraram que *P. falciparum* possui de fato pouco polimorfismo e corroboram com a hipótese de que *P. falciparum* originou de uma única transferência de um hospedeiro chimpanzé infectado com *P. reichenowi*, sendo que todas as cepas de *P. falciparum* estão ligadas a um braço da árvore de *P. reichenowi* (**figura 1**).

No decorrer da história, a malária tem sido um grande impedimento para o desenvolvimento humano. A doença sozinha já conseguia fazer com que projetos econômicos fossem grandemente dificultados ou até impossibilitados (Carter, Mendis, 2002). Apesar da área de ocorrência da malária ter sido confinada às regiões tropicais do globo após políticas de contenção, o número de pessoas que vivem em áreas de risco tem crescido e se encontra em torno de três bilhões, e há a expectativa de que continue crescendo (Guinovart et al., 2006). Há estudos evidenciando a relação causal existente entre malária e pobreza (Worrall et al., 2005) o que reduz o interesse no combate à doença. Além disso, a procura de tratamento especializado em países pobres é pequeno, observando-se mais o auto-tratamento (Worrall et al., 2005). Um fator agravante é o surgimento de cepas de parasitas resistentes às drogas comumente usadas. Apesar do aumento dos recursos para combate da malária para um bilhão de dólares em 2008 e o uso de várias estratégias (antimaláricos, mosquiteiros e inseticidas)



faz-se necessário um monitoramento para verificar os progressos no controle da doença e onde os esforços devem ser focados (Grabowsky, 2008).

**Figura 1**-Filogenia baseada no gene Citocromo B evidenciando as relações de parentescos entre quatro espécies de *Plasmodium* que acometem humanos.



**A:** *P. falciparum*. **B:** *P. malariae*, **C :** *P. vivax* e **D :** *P. ovale* e seus grupos irmãos. *P. reichenowi* parasita chimpanzês; *P. yoelii* e *P. berghei* parasitas de roedores e *P. gallinaceum* parasitas de aves. Seta preta evidencia o ponto de origem *P. falciparum*.

Fonte: Baseado no Rich et al.(2009).

## 1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium*

O desenvolvimento do parasita da malária é um processo complexo que envolve dois hospedeiros: o hospedeiro definitivo (fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*) que são os vetores da doença na qual ocorre a fase sexuada do desenvolvimento do parasita; e o hospedeiro intermediário (havendo espécies distintas de *Plasmodium* que infectam répteis, aves e mamíferas) ocorrendo nesses vertebrados à fase assexuada do parasita.

Ao picar um hospedeiro vertebrado, mosquitos do gênero *Anopheles* injetam através da saliva dezenas de esporozoítos dando início à fase assexuada do ciclo da malária. Os esporozoítos entram na corrente sanguínea e posteriormente no fígado, alojando-se nos hepatócitos e iniciando um ciclo de reprodução assexuada. Uma característica interessante dos esporozoítos é a capacidade de fazer *traversing*. *Traversing* é passagem através de diversos hepatócitos antes da invasão da célula em que o esporozoíto sofrerá mudança de formato (*round up*) e posterior desenvolvimento em merozoítos. É interessante que o processo de *traversing* acontece sem a formação de um vacúolo parasitóforo, o que contrasta com o processo de invasão do hepatócito para desenvolvimento em merozoítos (Mota et al., 2001). Na fase hepática, o *P. vivax* é capaz de se diferenciar em um estágio de dormência denominado hipnozoíto. Estas células podem reiniciar o desenvolvimento da fase hepática e causar sintomas clínicos da doença no hospedeiro sem o contato com o mosquito (Krotoski, 1985).

Após a fase hepática, milhares de merozoítos são liberados na corrente sanguínea dando início a invasão dos eritrócitos e ao ciclo intraeritrocítico, com estágios de maturação bem definidos: anel (A), trofozoíto (T) e esquizonte (E).

Após a ruptura da célula hospedeira, os merozoítos que são liberados na corrente sanguínea invadem os eritrócitos e recomeçam um novo ciclo. Alternativamente, há a diferenciação de alguns merozoítos que invadiram os eritrócitos em gametócitos femininos e masculinos, que formam gametas quando ingeridos pelo inseto, dando início a fase sexuada. A fecundação destes gametas dá origem a um oocineto móvel, que se aloja no intestino médio do inseto e sofre divisões reducionais formando esporozoítos. Os esporozoítos migram para as glândulas salivares do mosquito onde serão liberados durante a alimentação do mosquito (Bannister et al., 2003) (**figura 2**).

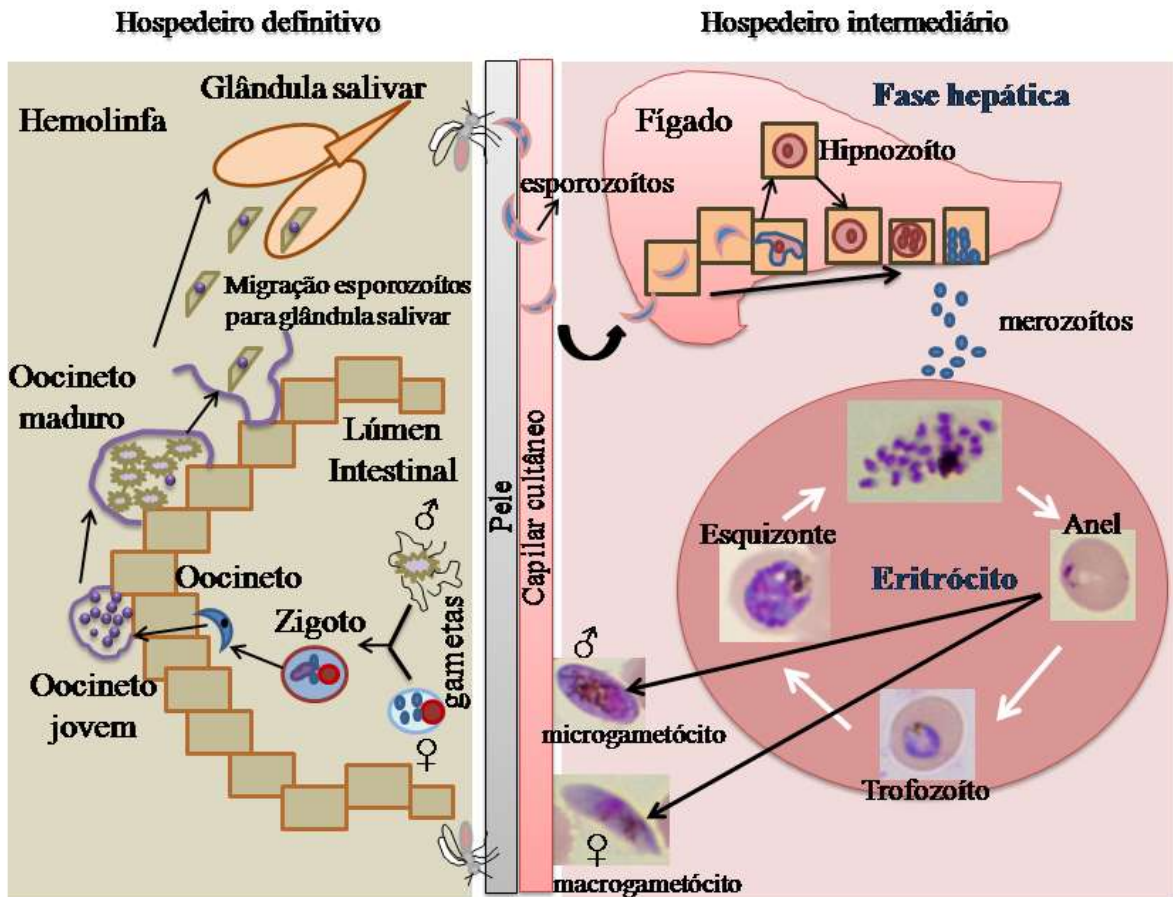
Aspectos interessantes do ciclo de vida do *Plasmodium* têm revelado estratégias que garantem o sucesso no desenvolvimento. Amino et al. (2006), acompanhando ao vivo e *in vivo* esporozoítos expressando GFP (Green fluorescence protein) revelaram a capacidade de

algum esporozoítos adentrarem os vasos linfáticos do hospedeiro intermediário. Sturn et al. (2006) demonstraram que durante o rompimento do hepatócito os merozoítos hepático são revestidos pela membrana do hepatócito (merossomo), esta estratégia evita o reconhecimento dos merozoítos pelas células de Kupffer que patrulham os sinusóides hepáticos. Durante o desenvolvimento intraeritrocítico, os eritrócitos infectados com *P. falciparum* apresentam citoaderência nas células endoteliais, este mecanismo é regulado por um conjunto de genes (var genes) que expressam proteínas PfEMP (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein) (revisado de Rowe et al., 2009). A aderência no endotélio é um mecanismo importante para evitar que eritrócitos infectados passem pelo baço, órgão capaz de remover eritrócitos envelhecidos do sistema. Mais recentemente, Riglar et al. (2013) usando técnica de microscopia tridimensional demonstraram a participação dinâmica de proteínas translocadoras no vacúolo parasitóforo no processo de exportação de proteínas, inclusive a PfEMP, em *P. falciparum*.

No mosquito, Rupp et al.(2011) reportaram que durante a ativação dos gametócitos há formação de filamentos no citossol do parasita contendo uma isoforma da actina 2, estes filamentos formam uma estrutura tubular que permite uma comunicação célula-célula nos estágios sexual do parasita dentro do sistema digestivo do inseto. Mais recentemente, Riglar et al. (2013) usando técnica de microscopia tridimensional demonstraram a participação dinâmica de proteínas translocadoras no vacúolo parasitóforo no processo de exportação de proteínas, inclusive a PfEMP, em *P. falciparum*.

A fase intraeritrocítica do *P. falciparum*, que ocorre em um período de 48 horas, é a principal causa de morbidade e mortalidade para o hospedeiro, sendo esta fase um dos principais alvos farmacológicos no combate desta doença.

**Figura 2-**Ciclo de vida do *Plasmodium* evidenciando os eventos que ocorrem no hospedeiro invertebrado e vertebrado.



Fonte: Baseado em Kappe et al.(2010).

### 1.2.1 Desenvolvimento sincrônico da fase intraeritrocítica em *Plasmodium*

Na maioria das espécies de malária que infectam mamíferos a transição entre os estágios intraeritrocítico tal como as invasões de novos eritrócitos são eventos altamente sincronizados (Doerig et al.,1997). A periodicidade das febres, causada pela lise simultânea dos eritrócitos, é a característica mais marcante da infecção que geralmente ocorre em um padrão múltiplo de 24 horas. A aparente simultaneidade de bilhões de indivíduos do parasita na corrente sanguínea pode representar uma importante e eficiente estratégia evolutiva para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro. O'Donnell et al. (2011) corroboraram com esta hipótese ao reportar que a alteração do desenvolvimento sincrônico de *P. chabaudi* causada pela perturbação do ciclo claro/escuro do seu hospedeiro camundongo causa uma diminuição de até 50% na invasão dos eritrócitos.

A sincronia apresentada em várias espécies do gênero *Plasmodium* é rapidamente perdida em cultura indicando um possível envolvimento de um sinal derivado do hospedeiro (Trader, 1976). Hawking (1970) foi o primeiro a notar a semelhança entre o ciclo da malária e um ritmo circadiano. Boyd (1929), trabalhando com um parasita de aves, reportou que quando o hospedeiro era exposto a um ritmo invertido de claro/escuro o ciclo do parasita também era invertido. Fenômeno similar foi observado em *P. brazilianum* (infesta macacos), a alteração do ciclo circadiano do hospedeiro altera o ciclo intraeritrocítico deste parasita (Taliaferro, 1934). Arnold et al. (1969) concluíram que a retirada da glândula pineal do hospedeiro gera uma dessincronização do ciclo do parasita *P. berghei*. Esses experimentos demonstraram que a sincronia do ciclo do parasita está intimamente relacionada ao ritmo circadiano do hospedeiro. Na busca de encontrar um sinal que desencadeassem mudanças circadianas em mamíferos e que poderia ser usado pelo parasitas da malária, o hormônio melatonina surgiu como um forte candidato.

A melatonina participa na regulação do ritmo circadiano de muitos eucariontes, incluindo vertebrados, invertebrados, plantas terrestres e dinoflagelados (Cassone et al., 1997).

Hotta et al. (2000), reportaram um aumento na proporção de esquizontes em culturas de *P. falciparum* tratadas com o hormônio melatonina. Neste mesmo trabalho reportaram que parasitas *P. chabaudi* (infesta camundongos) perde sua sincronia quando seu hospedeiro é pinealectomizados (remoção da glândula pineal, local onde ocorre produção de melatonina). Entretanto a sincronia é restabelecida com a aplicação de melatonina exógena. Este efeito é abolido quando a melatonina é aplicada na presença do luzindole, uma antagonista que se liga ao receptor de melatonina.

N-acetilserotonina, triptamina, serotonina (moléculas precursores da melatonina) e N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxicimuramina (AFMK, produto de degradação da melatonina) também são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum* (Beraldo et al., 2005; Budu et al., 2007).

Interessante que, *in vitro*, melatonina não é capaz de modular o ciclo celular de *P. berghei* e *P. yoelii*, dois parasitas de roedores que mostram um desenvolvimento desincronizado *in vivo* (Bagnaresi et al., 2009).

### 1.3 Sinalização celular em *Plasmodium*

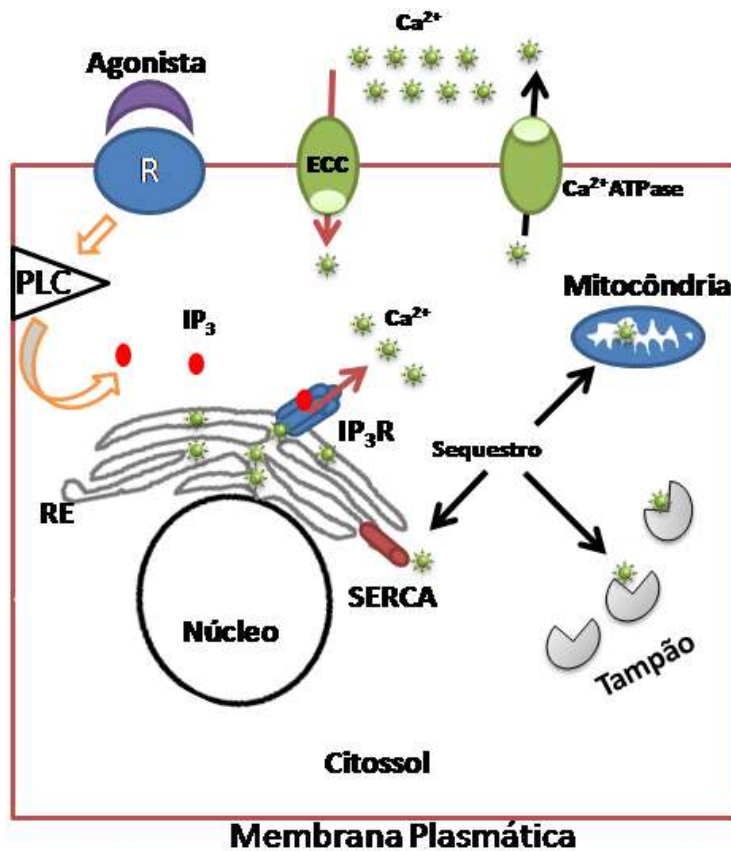
Para completar com sucesso o ciclo de vida, o parasita precisa perceber e se adaptar a diferentes ambientes que incluem regiões intra e extracelulares em hospedeiros filogeneticamente muito distantes (Bannister, Mitchell, 2003). A percepção do ambiente é um fato fundamental para sobrevivência do parasita que conta com mecanismos de sinalização intracelular que ativam e modulam diversos processos que preparam o parasita a enfrentar eficientemente as diferentes fases de desenvolvimento em seu ciclo.

#### **1.3.1 Maquinaria de sinalização via $\text{Ca}^{2+}$**

O  $\text{Ca}^{2+}$  é um sinalizador intracelular muito versátil capaz de regular diversas funções celulares diferentes (Berridge et al., 2003). Ele é capaz de agir em milissegundos na exocitose de vesículas sinápticas ou ao longo de horas, no caso da regulação da expressão gênica. Cada tipo de célula expressa componentes da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  distintos, gerando sistemas distintos de sinalização (Berridge, 2003). Esses sistemas funcionam através da criação de breves pulsos de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, pelo controle do aumento e diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (**figura 3**).

Assim como qualquer célula eucariótica, o parasita da malária mantém uma baixa concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  (Garcia, 1999) e pequenas variações deste íon são capazes de modular importantes processos como a invasão dos merozoítos nas células vermelhas (Lew, Tiffert, 2007).

**Figura 3-**A sinalização por  $\text{Ca}^{2+}$  e sua homeostase.



O estímulo (agonista) se liga receptor (R) na membrana ativando uma fosfolipase C (PLC) formando inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) que libera  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares, no caso, do retículo endoplasmático. Uma grande quantidade do  $\text{Ca}^{2+}$  que entra liga-se a tampões, uma pequena quantidade liga-se a efetores que participarão efetivamente do processo de sinalização celular. O sequestro do  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico pode consistir na expulsão do  $\text{Ca}^{2+}$  da célula através de canais uniporta, canais que trocam sódio ou através do sequestro do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RE pela  $\text{SERCA}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático). O  $\text{Ca}^{2+}$  também pode ser sequestrado pela mitocôndria através de uma uniporta e então ser lentamente devolvido ao citosol para ser captado pelo RE ou ser bombeada para fora por uma cálcio-ATPase da membrana plasmática.  $\text{IP}_3\text{R}$ : receptor do inositol-1,4,5-trisfosfato, R- receptor da membrana plasmática.  $\text{ECC}$ : entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ .  
 Fonte: Baseado na revisão de Berridge (2003).

Há duas formas com a qual a célula pode mobilizar o  $\text{Ca}^{2+}$ : através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  em depósitos intracelulares e o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do ambiente extracelular. A mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de depósitos intracelulares é um mecanismo ubíquo e um evento essencial para a transdução de sinal ativada por hormônios e outros agonistas. Por outro lado, a homeostasia deste íon precisa acontecer para a sobrevivência da célula, pois altas concentrações citosólicas de cálcio mantidas por muito tempo provocam apoptose (revisado de Berridge, 2009).

Diversos trabalhos têm mostrado evidências da existência de dois compartimentos distintos de estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  em *Plasmodium* (Biagini et al., 2003; Garcia et al., 1996; Varotti

et al., 2003): retículo endoplasmático, sensível à thapsigargina (thaps) que age inibindo a SERCA (Sarco Endoplasmatic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), responsável pelo bombeamento deste íon para dentro da organela e um compartimento ácido caracterizado através do colapso do gradiente de pH intracelular e consequente mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do uso de ionóforos  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (monensina) e  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (nigericina).

Na fase intraeritrocítica o parasita enfrenta um desafio para utilizar o  $\text{Ca}^{2+}$  para a sinalização, pois se encontra separado do meio externo que contém concentrações milimolar de  $\text{Ca}^{2+}$ , pela membrana do vacúolo parasitóforo, pelo citossol e pela membrana da hemácia. Gazarini et al. (2003) demonstraram que o vacúolo parasitóforo, espaço existente entre a membrana do parasita e a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) é rico em  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerindo que durante a invasão as bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática do eritrócito passam a fazer parte da MVP e bombeiam  $\text{Ca}^{2+}$  para o vacúolo parasitóforo. O  $\text{Ca}^{2+}$  é importante para a ativação de algumas enzimas no parasita, como a PKB (proteína quinase do tipo B), ativada por cálcio-calmodulina (Vaid, Sharma 2006; Vaid, Sharma 2008) e cisteíno-proteases (Farias et al., 2005).

Muitos componentes básicos para uma clássica sinalização dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  já foram caracterizados em *Plasmodium* e outros Apicomplexas (filo que inclui o gênero *Plasmodium*) incluindo: quatro sequências putativas de receptores heptaélicos (Madeira et al., 2008); proteína-G, inferida pela interferência que a toxina colérica e pertúnica causam na gametogênese em *P. falciparum* além das sequências de isoenzimas similares a PLC $\delta$  em *Plasmodium* e *Toxoplasma* (Fang et al., 2006; Gardner et al., 2002). Além do mais, bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases como SERCA e proteínas que regulam excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  já foram identificadas (Billker et al., 2009; Dvorin et al., 2010; Koyama et al., 2009; Nagamune et al., 2006; Vaid et al., 2006; Vaid et al., 2008). Estes trabalhos indicam a clara importância que a regulação e a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  neste grupo.

Entretanto, após mais de uma década do sequenciamento do genoma do *P. falciparum*, componentes importantes na sinalização dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  ainda não foram identificados, dentre eles, destacam-se a proteína-G e o receptor de  $\text{IP}_3$ .



### 1.3.2 Via de sinalização induzida pela melatonina em *Plasmodium*

A melatonina é um composto lipofílico e, portanto, pode-se difundir livremente através de membranas biológicas e bem como na barreira hematoencefálica. Nos animais, a via biossintética utiliza serotonina como precursor, possuindo dois passos que envolvem: N-acetilação (formando o N-acetil-serotonina) e O-metilação (formando a melatonina). A enzima N-acetil-transferase é produzida constitutivamente na glândula pineal, porém, devido à ação inibitória da luz, à noite sua produção aumenta 20 a 100 vezes (Reiter, 1991; Vanecek, 1998). Este fato implica que o parasita *Plasmodium* recebe um pico deste hormônio durante o ciclo escuro do hospedeiro.

Hotta et al. (2000), ao explorarem as vias de sinalização ativada pela melatonina em *P. chabaudi* e *P. falciparum*, reportaram que este hormônio induz a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico tanto na presença quanto na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, sugerindo a participação de  $\text{Ca}^{2+}$  nos compartimentos intracelulares. Porém, a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  é abolida na presença da droga U73122 (um inibidor de fosfolipase C) e luzindol (um antagonista dos receptores de melatonina). Este trabalho é uma evidência de que a melatonina atua por uma via de sinalização dependente do  $\text{IP}_3$  em *Plasmodium*. A mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina não é observada em *P. berghei* e *P. yoelii* (espécies cujo ciclo não é modulado pela melatonina) (Bagnaresi et al., 2009).

Beraldo et al. (2005) reportaram a interação da via de sinalização de entre os segundos mensageiros  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{AMP}_c$ . Neste trabalho, foi demonstrado que em *P. falciparum* a melatonina aumenta os níveis de  $\text{AMP}_c$ , efeito bloqueado com a adição do U73122 (inibidor da PLC) e por um quelante intracelular de cálcio (BAPTA). A adição de 6-BZ-cAMP (análogo permeável do  $\text{AMP}_c$ ), um ativador clássico da proteína PKA (fosfo quinase A), aumenta as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico que culmina na modulação do ciclo. O bloqueio da PKA abole o efeito na modulação do ciclo induzida pela melatonina. A PKA, também conhecida como proteína quinase dependente de  $\text{AMP}_c$ , é um importante mediador na fosforilação de proteínas e está envolvida na regulação de canais de ânions e na invasão de eritrócitos em *Plasmodium* (Leykauf et al., 2010, Merckx et al., 2008). Em adição, Fariaset al. (2005) reportaram que uma cisteína protease também é ativada por cálcio e melatonina.

Levano-Garcia et al. (2010) demonstraram que a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina em eritrócitos infectados com *P. falciparum* nos estágios trofozoíto (T) e esquizontes (E) é sustentada na presença de nucleotídeos ATP e UTP. Esta mobilização de

$\text{Ca}^{2+}$  é abolida quando se remove o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, sugerindo a participação de um receptor de ATP que atua como canal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Koyama et al. (2012) investigaram a participação de uma proteína quinase (PfPK7) na sinalização mediada pela melatonina em *P. falciparum*. Neste trabalho, foi demonstrado que *P. falciparum* nocautes para o gene PfPk7 (PfPK7<sup>-</sup>) tem mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina diminuída comparado com parasitas selvagens e não tem seu ciclo regulado pela melatonina, entretanto a expressão epissomal do gene PfPK7 nos parasitas PfPK7<sup>-</sup> restabeleceu a capacidade destes parasitas em ter seu ciclo modulado pela melatonina. Este trabalho demonstra a importância dos eventos de fosforilação na via de transdução de sinal estimulada pela melatonina. Interessante ressaltar que a o nocaute do gene PfPK7 reduz o número de merozoítos produzidos na esquizogonia diminuindo a parasitemia na fase intraeritrocítica, além de bloquear a formação dos oocistos no trato intestinal dos mosquitos (Dorin-Semblat et al., 2005).

O sistema ubiquitina/proteossomo (UPS) é uma via de degradação de proteínas que desempenha diversos papéis no ciclo celular, regulação de transcrição e transdução de sinal em eucariotos (Hershko et al., 1998). Koyama et al. (2012) ao medirem a transcrição gênica de 14 genes que codificam componentes do UPS em *P. falciparum*, reportaram que este sistema era positivamente regulado em parasitas tratados com melatonina, este efeito era abolido quando melatonina era adicionada com luzindol. Usando a mesma técnica, Koyama et al. (2012) demonstraram que melatonina não foi capaz de regular os componentes do sistema UPS em parasitas PfPK7<sup>-</sup>. Este trabalho demonstra a importância dos eventos de fosforilação e a participação do UPS na transdução de sinal em *P. falciparum*.

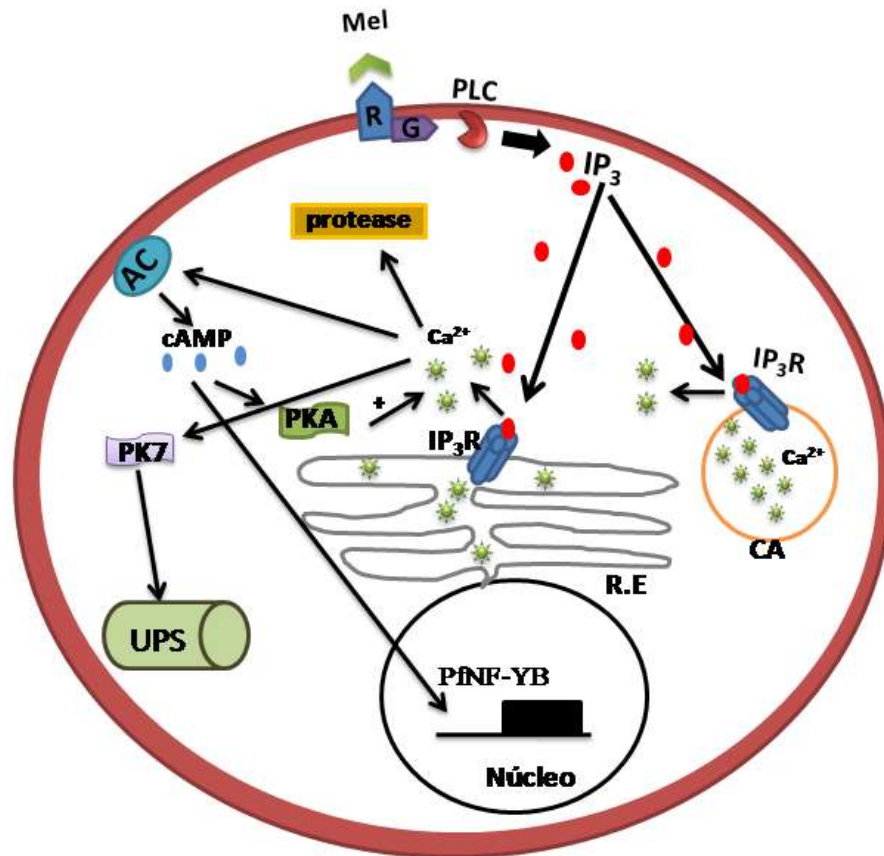
Em vertebrados, a melatonina é capaz de regular genes dependentes do fator de transcrição NF-YB (Nuclear transcription factor subunit beta), estes genes estão associados à expressão de enzimas antioxidantes e fatores inflamatórios (Tomas-Zapico et al., 2005). Lima et al. (2013) usando PCR em tempo real e western blot reportaram que melatonina e 6-BZ-AMP<sub>c</sub> regulam o fator de transcrição *CCAAT-box DNA binding protein subunit B* (PfNF-YB, número de acesso PF11\_0477) em *P. falciparum*. Este trabalho demonstrou que a ubiquitinação da PfNF-YB é estimulada pela melatonina e que o uso do bortezomide (inibidor do UPS) é capaz de regular a expressão do PfNF-YB.

Em humanos, os receptores de melatonina MT1 e MT2 estão geralmente associados à proteína G $\alpha_1$  (Jockers et al., 2008) mediando as respostas celulares via inibição da AMP<sub>c</sub> e PKA. Entretanto, os receptores de melatonina também podem se associar à proteína G que provoca a ativação da PLC e geração de IP<sub>3</sub> (Brydon et al., 1999; Lai et al., 2002; Steffens et

al., 2003), inclusive em melanócitos de *Xenopus* (Mullins et al., 1997) e dinoflagelados (Tsim et al., 1997). A ausência de uma proteína G indetificada no genoma de *Plasmodium* sugere que a identidade do receptor de melatonina em *P. falciparum* seja distinta do hospedeiro humano.

A sinalização induzida pela melatonina no *Plasmodium* (**Figura 4**) tem contribuído para revelar os mecanismos fisiológicos que permitem estas células regularem seu ciclo de vida além de revelar potenciais alvos no compate à malária.

**Figura 4**-Via de sinalização de melatonina em *Plasmodium*.



Mel: Melatonina, R: receptor, G: proteína-G, PLC: fosfolipase C, RE: retículo endoplasmático, IP<sub>3</sub>R: receptor de IP<sub>3</sub>, PK7: proteína quinase 7, AC: adenilato ciclase, PKA: proteína quinase A, CA: vacúolo ácido, cAMP: adenosina monofosfato cíclica, PK7: proteína quinase 7, UPS: sistema ubiquitina/proteossomo e Pfnf-YB: CCAAT-box DNA binding protein subunit B.

Fonte: Baseado nos dados de: Beraldo et al. (2005); Beraldo et al. (2007); Farias et al. (2005); Gazarini et al. (2003); Hotta et al. (2000); Passos et al. (1998); Koyama et al. (2012); Lima et al. (2013); Varotti et al. (2003).

## 1.4 Inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>)

### 1.4.1 IP<sub>3</sub> e metabolismo

A abolição da mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida por melatonina pela droga U73122 (Beraldo et al., 2005) em *Plasmodium* sugere a existência de uma clássica via de sinalização baseada no mio-inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>).

IP<sub>3</sub> é um segundo mensageiro ubiqüitário que regula a atividade do Ca<sup>2+</sup> citossólico. Muitos trabalhos levaram a suspeita do IP<sub>3</sub> como segundo mensageiro. Hokin et al. (1953) demonstraram que a formação de fosfatidilinositol (PI) era estimulada por agonistas externos a células. Michell (1975) foi o primeiro a propor que a hidrólise dos lipídeos de membrana era capaz de mobilizar Ca<sup>2+</sup>, esta hipótese foi validada pelo Berridge et al. (1979) ao estudar mobilização de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> em glândulas de insetos. Berridge (1983) sugeriu que o IP<sub>3</sub> era o fator solúvel que causava a mobilização de Ca<sup>2+</sup> em compartimentos intracelulares, mas foi o trabalho de Streb et al. (1983) que demonstrou diretamente a função do IP<sub>3</sub> como segundo mensageiro ao estudar a mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida por concentrações micromolares de IP<sub>3</sub> em células acinares pancreáticas permeabilizadas. Neste trabalho, a mobilização de Ca<sup>2+</sup> era originada de compartimentos não mitocondriais.

A formação do IP<sub>3</sub> na célula envolve desde a captação do inositol que é inserido nos fosfolipídeos específicos na membrana. A via metabólica mais simples e a mais bem estudada em mamíferos envolve ativação da fosfolipase C beta (PLCβ) mediada por receptor na superfície da membrana plasmática acoplada a proteína G. PLCβ cliva o fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) formando 1,2-diacilglicerol (DAG) e IP<sub>3</sub> (Woodcock, 1996). DAG ativa vários isômeros de proteína quinase C (PKC) enquanto que o IP<sub>3</sub> tem a importante função na liberação de Ca<sup>2+</sup> de compartimentos intracelulares (Berridge, 1987) (**figura 5**).

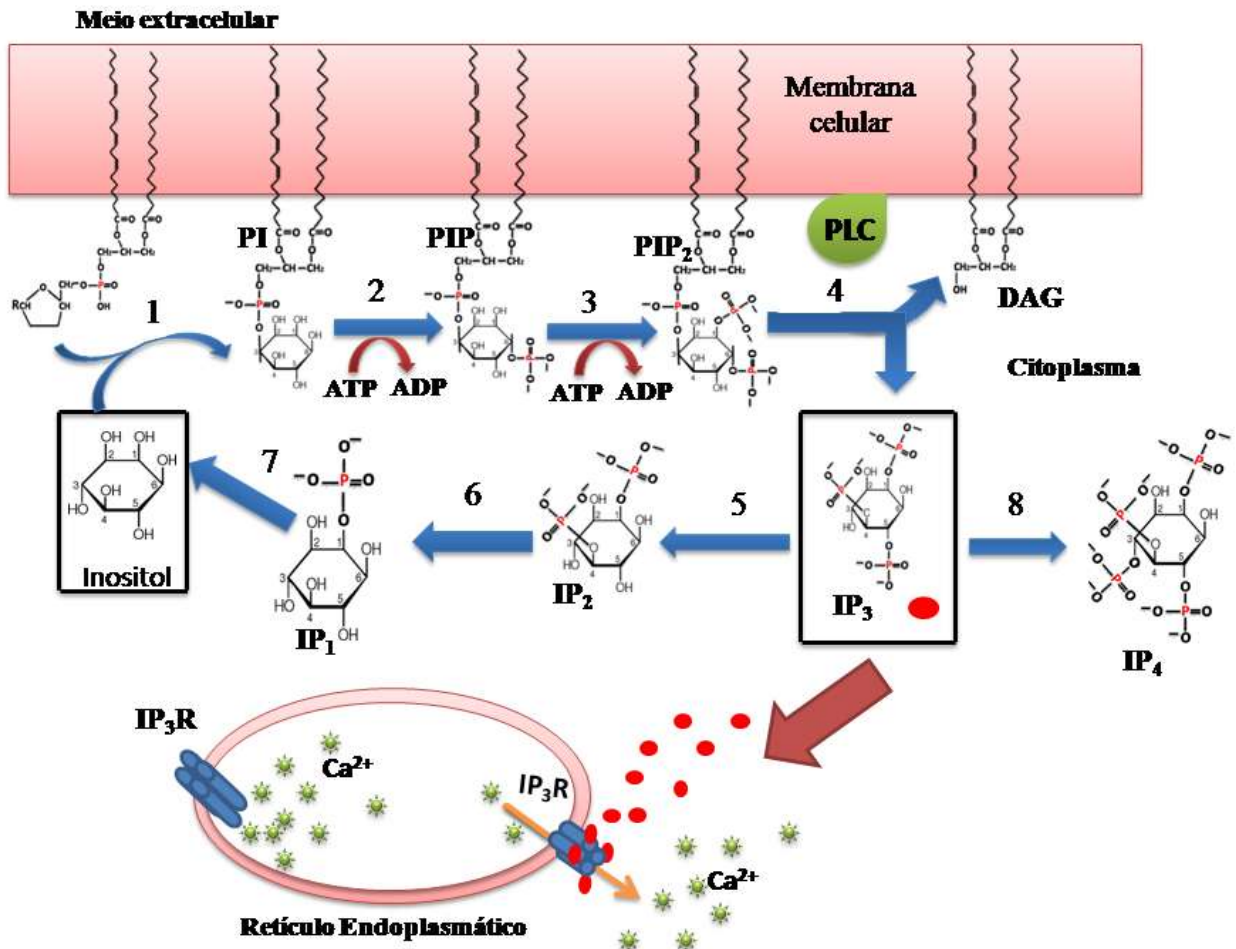
Como qualquer segundo mensageiro, o IP<sub>3</sub> tem vida curta dentro da célula e seu rápido metabolismo ocorre por duas vias: remoção do fosfato na posição 5 do anel inositol pela enzima inositol polifosfato 5-fosfatase (IP<sub>5</sub>-fosfatase) que resulta na formação do IP<sub>2</sub> e um fosfato inativo. O IP<sub>2</sub> é posteriormente desfosforilado para inositol monofosfato que pode ser reciclado para formar novos fosfatidilinosídeos (PI), a segunda via é a fosforilação do IP<sub>3</sub> pela enzima IP<sub>3</sub>(1,4,5) 3-quinase, que é dependente de ATP, resultando na formação de IP<sub>4</sub> (Irvine et al., 1986). O IP<sub>4</sub> pode ser rapidamente metabolizado para IP<sub>3</sub> pela mesma enzima que desfosforila IP<sub>3</sub> para formar IP<sub>2</sub> (Pattni et al., 2004).

O IP<sub>4</sub> também participa na mobilização de Ca<sup>2+</sup> em células de mamíferos (Irvine et al., 1999). Diversos trabalhos reportaram que a presença do IP<sub>4</sub> permite a mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub> de compartimentos diferentes do RE (Cullen et al., 1995; Irvine et al., 1999). Estes trabalhos sugerem ao IP<sub>4</sub> um papel de potencializador na mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub>. Uma possível explicação para este fenômeno é o papel protetor que o IP<sub>4</sub> exerce sobre IP<sub>3</sub> uma vez que o IP<sub>4</sub> se liga a IP<sub>5</sub>-fosfatase aumentando o tempo de vida útil do IP<sub>3</sub> (Hermosura et al., 2000).

Os fosfatidilinositois IP<sub>5</sub> e IP<sub>6</sub> também estão presentes nas células de mamíferos (Hughes et al., 1990). Porém as concentrações IP<sub>5</sub> e IP<sub>6</sub> não se alteram com a ação de agonista sugerindo que a formação dos fosfoinositois acima de 4 fosfatos não se origina da fosforilação do IP<sub>3</sub> e IP<sub>4</sub> (Heslop et al., 1985).

O surgimento dos fosfatidilinositóis (PI) foi um evento antigo na evolução, este é encontrado desde bactérias (actionobactérias), Apicomplexas, fungos, plantas verdes e metazoas (revisado de Irvine, 2005). Acredita-se que o uso desta via com finalidade de sinalização ativada por um receptor de membrana culminando na produção de IP<sub>3</sub> e DAG através de uma PLC tenha sido um evento mais recente (Michell, 2008).

**Figura 5**-Esquema clássico da formação e degradação do inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e sua função como segundo mensageiro.



Passo metabólico 1: incorporação do inositol no lípide CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) catalisada pela enzima fosfatidilinositol sintase formando fosfatidilinositol (PI). Passo 2: formação do fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP) catalisada pela enzima fosfatidilinositol quinase (PI4K). Passo 3: formação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a partir da fosforilação do PIP pela enzima fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase (PIPKI). Passo 4: PIP<sub>2</sub> é clivado pela enzima fosfolipase C (PLC) formando inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol DAG. O IP<sub>3</sub> é solúvel e se liga ao receptor de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) localizado no retículo endoplasmático causando a abertura do canal que culmina na liberação de Ca<sup>2+</sup>. Passo 5: o IP<sub>3</sub> é desfosforilado pela enzima inositol polifosfato 5-fosfatase (IP<sub>5</sub>-fosfatase) formando inositol 1,4-bifosfato (IP<sub>2</sub>). Passo 6: formação do inositol 1-monofosfato (IP<sub>1</sub>) a partir do IP<sub>2</sub> catalisado pela enzima inositol polifosfatase 1-fosfato. Passo 7: formação do inositol a partir do IP<sub>1</sub> pela enzima inositol monofosfatase. Passo 8: formação do inositol 1,3,4,5-tetrafosfato a partir do IP<sub>3</sub> catalisada pela enzima inositol 1,4,5-trifosfato 3-quinase (IP<sub>3</sub> 3-KI).

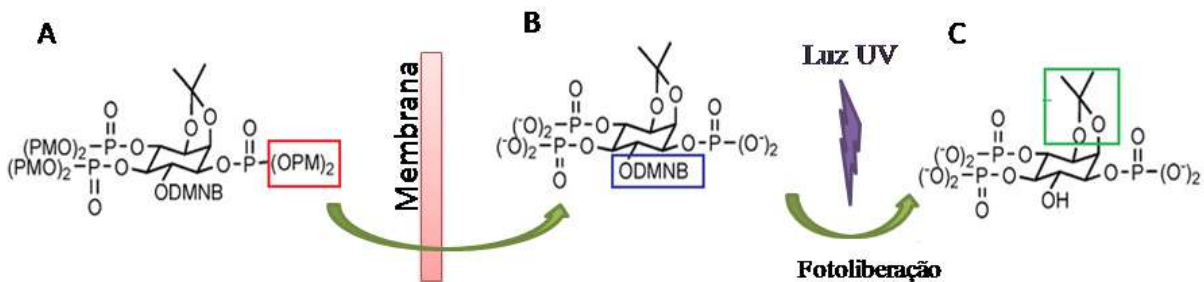
Fonte: Baseado no Berridge, (1987); Irvine et al. (1986); Michell, (1975); Streb et al. (1983); Woodcock, (1996).

### 1.4.2 Caged-IP<sub>3</sub>

O conhecimento das propriedades da molécula de IP<sub>3</sub> em sistemas biológicos permitiu desenvolver ferramentas farmacológicas usadas para investigar a resposta de Ca<sup>2+</sup> induzida via IP<sub>3</sub> através de IP<sub>3</sub> sintéticos. IP<sub>3</sub> é uma molécula com cargas hidrofílica sendo impermeáveis as hidrofóbicas membranas plasmáticas (Dakin et al., 2006). Ésteres lipofílicos associados ao IP<sub>3</sub> e análogos têm sido usados para facilitar a entrada não invasiva deste segundo mensageiro nas células (Li et al., 1997). A concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup> é em geral 10000 vezes maior que a concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular, qualquer manipulação invasiva a membrana pode facilmente perturbar a homeostase de Ca<sup>2+</sup> na célula.

O caged-IP<sub>3</sub> é um composto sintético produzido a partir do mio-inositol, que é permeável a membrana graças à adição de esterases e possui uma molécula 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil (molécula fotosensível ao UV que impede a ligação do IP<sub>3</sub> ao domínio de ligação do IP<sub>3</sub>R) (Hirata et al., 1993). O estímulo do caged-IP<sub>3</sub> com a luz ultravioleta (UV) libera um IP<sub>3</sub> com as mesmas propriedades do IP<sub>3</sub> celular, ou seja, ele é passível de ser degradado ou de se ligar ao receptor de IP<sub>3</sub> (**figura 6**).

**Figura 6**-Esquema do processo de fotoliberação do caged-IP<sub>3</sub>.



Em **A**: caged-IP<sub>3</sub> antes de entrar na célula. Retângulo vermelho evidencia o grupo metil propioniloxi (PM) que confere a lipossolubidade ao composto. **B**: Estrutura do caged-IP<sub>3</sub> após ataque das esterases que removem o grupo PM. O retângulo azul evidencia o grupo 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzil (DMNB) que é fotosensível ao UV e impede a ligação do IP<sub>3</sub> ao receptor e a ligação das enzimas que degradam IP<sub>3</sub>. **C**: Estrutura do IP<sub>3</sub> livre pelo pulso de luz UV, quadrado verde evidencia o pequeno grupo metoximetileno que evita o ressonância dos fosfatos no anel inositol evitando a formação de insômeros de IP<sub>3</sub>.

Fonte: Modificado de Dankin et al. (2006).

O caged-IP<sub>3</sub> é uma ferramenta muito útil, pois permite estimular diretamente o receptor de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) sem a necessidade de agonistas.

A fotoliberação do IP<sub>3</sub> a partir do caged-IP<sub>3</sub> já foi usada para estudar a dinâmica de mobilização de Ca<sup>2+</sup> em diversos modelos biológicos: neurônios humanos (Stork et al., 2010), células de músculo liso (Rainbow et al., 2009), oocisto de *Xenopus* (Smith et al., 2009), plantas (Monteiro et al., 2005) e no *Trypanosoma brucei* (Huang et al., 2013).

#### **1.4.3 Evidência da via metabólica de fosfatidilinositol e do IP<sub>3</sub> em *Plasmodium***

O surgimento dos diversos fosfatidilinositois (PI) foram eventos antigos na evolução e o uso desta via ativada por um receptor de membrana culminando na produção de segundos mensageiros como IP<sub>3</sub> e DAG tenha sido um evento derivado (Michell, 2008).

Nos Apicomplexas já foram caracterizados genes que codificam as enzimas fosfatidilinositol quinase (PI4K) e fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase PIPKI (Gardner et al., 2002; Wengelnik et al., 2007) e uma enzima PLC $\delta$  foi clonada de *Toxoplasma gondii*, porém esta apresentou melhor atividade na presença de PI como substrato ao invés da PIP<sub>2</sub> (Fang et al., 2006).

Já foram caracterizadas a síntese de vários fosfatidilinositois de membrana derivado do PI em *P. falciparum* durante a fase intraeritrocítica (Elabbadi et al., 1994; Gerold et al., 1994). Vaid et al. (2010) reportaram que na fase intraeritrocítica o *P. falciparum* exporta a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (enzima que usa PI como substrato para produzir um tipo de PIP que não é substrato para formação do PIP<sub>2</sub>) para o eritrócito e este desempenha função importante no transporte de hemoglobina para o parasita. Fosfatidilinositois são moléculas versáteis que podem sofrer fosforilação em diferentes pontos do anel inositol gerando uma variedade de fosfoinositois de membranas com funções bem distintas, tal como conferir estabilidade a membrana plasmática e vesículas (Koga et al., 2007).

Glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma classe de glicolípides formadas por PI ancora a proteína e açúcares na membrana e possui importante papel na patogenicidade da malária (Gerold et al., 1994). No desenvolvimento intraeritrocítico, o *Plasmodium* produz proteínas como MSP1 (merozoite surface protein 1) e MSP2 (merozoite surface protein 2) que são ancoradas na membrana com envolvimento do diacilglicerol DAG) (Haldar et al., 1986; Holder et al., 1985). Interessante que nenhuma GPI em *Plasmodium* parece ser afetada com tratamento da PLC (Gerold et al., 1994), porém foi reportado que a incubação da PLC de *Staphylococcus aureus* em merozoítos e esquizontes é capaz de induzir a atividade de uma proteína de membrana de 76kDa.



Schofield et al. (1993) sugeriram que GPI do *P. falciparum* são os compostos dominantes pela patogenicidade da malária. Esta idéia vem do fato que GPIs têm habilidade de induzir TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$  em macrófagos e causar sintomas graves de malária como hipoglicemia. GPIs também são capazes de induzir óxido nítrico sintase e aumentar a expressão de moléculas adesivas como ICAM-I, VCAM-1 e E-selectin na superfície das células endoteliais através da ativação da PKC (proteína quinase C) e PYK (proteína tirosina quinase) (Schofield et al., 1996; Tachado et al., 1996).

Olszewski et al. (2009), ao estudar os metabólitos encontrados durante a fase intraeritrocítica de *P. falciparum*, reportaram um aumento de mio-inositol. Este dado corrobora o trabalho de Elabbadi et al. (1994) que reportaram a existência da enzima mio-inositol 3- fosfatidil transferase (enzima que forma fosfatidilinositol tendo mio-inositol como substrato) em *P. knowlesi*. Este mesmo grupo mostrou que eritrócitos infectados com *P. knowlesi* e *P. falciparum* são capazes de sintetizar PIP<sub>2</sub>.

Elabbadi et al. (1994) ao adicionarem ionomicina (ionóforo de Ca<sup>2+</sup>) em eritrócitos infectados com *P. falciparum* que incorporaram [H<sup>3</sup>]-inositol monofosfato na presença de cloreto de lítio (um inibidor da desfosforilação do IP<sub>3</sub>), verificaram um acúmulo de IP, IP<sub>2</sub> e IP<sub>3</sub> marcados. Os eritrócitos de mamíferos contêm quinases necessárias para formar PIP<sub>2</sub> a partir do PI (Allan, 1982), entretanto eritrócitos não infectados com *Plasmodium* apresentam uma baixa renovação de seu PIP<sub>2</sub> além de outros lípidos de membrana (Van Deenen et al., 1975), A renovação do PIP<sub>2</sub> é aumentada quando o eritrócito é invadido pelo *Plasmodium* (Vial et al., 1990).

A função do IP<sub>3</sub> como segundo mensageiro em *Plasmodium* foi sugerida no trabalho de Martin et al. (1994) que demonstraram a formação de IP<sub>3</sub> e DAG marcados durante o processo de exflagelação em gametócitos de *P. falciparum*.

Passos et al. (1998) demonstraram que *P. chabaudi* isolados e permeabilizados no estágio de trofozoíto liberam Ca<sup>2+</sup> com a adição do segundo mensageiro IP<sub>3</sub> exógeno. A origem do Ca<sup>2+</sup> induzida pelo IP<sub>3</sub> provinha de dois compartimentos distintos: um sensível a tapsigargina (retículo endoplasmático) e um sensível a cloroquina (compartimentos ácidos). Este foi o primeiro trabalho a relacionar diretamente a mobilização de Ca<sup>2+</sup> com o IP<sub>3</sub>. Entretanto, devido à incapacidade do IP<sub>3</sub> de atravessar a membrana, esta mobilização de Ca<sup>2+</sup> não pode ser testada no ambiente natural do parasita (dentro do eritrócito) e nem com a membrana celular do parasita íntegra.

Como descrito anteriormente, Hotta et al. (2000) reportaram que o hormônio melatonina induz mobilização de Ca<sup>2+</sup> em *P. chabaudi* e *P. falciparum* sendo que esta resposta

é abolida na presença do inibidor de fosfolipase C, adicionando uma importante evidência farmacológica do uso da via dependente de PLC/IP<sub>3</sub>.

Raabe et al. (2011) estudaram gametócitos *P. berghei* transfectados com uma construção que gera uma sonda fluorescente que se liga ao PIP<sub>2</sub>. Quando o PIP<sub>2</sub> fluorescente é clivado pela PLC, o domínio fluorescente permanece ligado ao IP<sub>3</sub>. Neste modelo, ao estimular a atividade da PLC deste parasita com ácido xanturênico, este grupo reportou um deslocamento da fluorescência da membrana para o citoplasma, um padrão de deslocamento esperado para a função do segundo mensageiro IP<sub>3</sub>.

Enomoto et al. (2012) demonstraram uma inibição da mobilização espontânea de Ca<sup>2+</sup> em *P. falciparum* com o uso da droga 2-aminoetil difenilborinato (2-APB), um inibidor do receptor de IP<sub>3</sub>. Esta inibição causou a morte dos parasitas no estágio intraeritrocítico indicando a importância desta via de sinalização no parasita da malária.

O conjunto destes trabalhos demonstra que *Plasmodium* usa a via de sinalização mediada por IP<sub>3</sub>. Entretanto, falta caracterizar um componente básico para o funcionamento desta via: o receptor de IP<sub>3</sub>.

### 1.5 Receptor Inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>R)

Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>R) são canais intracelulares de Ca<sup>2+</sup> que têm função crítica na geração do sinal de Ca<sup>2+</sup> que acompanha as células estimuladas com diferentes tipos de agonistas (Berridge, 1993). A abertura dos IP<sub>3</sub>R depende da ligação com o segundo mensageiro IP<sub>3</sub> e do Ca<sup>2+</sup> no sítio do receptor que está voltado ao citossol (Smith et al., 2009). Todas as células nucleadas de mamíferos contêm uma ou mais das três isoformas do IP<sub>3</sub>R (IP<sub>3</sub>R tipo I, tipo II e tipo III) (Joseph et al., 2005) enquanto que em invertebrados possuem somente uma isoforma do IP<sub>3</sub>R (Baylis et al., 2012).

Em vertebrados, a proteína que forma o IP<sub>3</sub>R tem aproximadamente 2700 resíduos, mas para que receptor fique funcional esta proteína tem que formar um homotetrâmero (Taylor et al., 1999). Os IP<sub>3</sub>R geralmente são organizados em três partes: um domínio de ligação com IP<sub>3</sub> na região N-terminal (região que efetivamente se liga ao IP<sub>3</sub>), o domínio do canal localizado na região C-terminal (onde se localizam as regiões transmembrânicas para o acoplamento do receptor na membrana) e um domínio regulatório/acoplamento na região intermediária que possui sítios de ligação a diversas moléculas como PKA, calmodulina, ATP e Ca<sup>2+</sup> (Patel et al., 1999).

Além do sítio de ligação ao  $IP_3$ , o  $IP_3R$  apresenta ao menos dois sítios de ligação com  $Ca^{2+}$ , estes sítios ajudam a regular a sensibilidade deste receptor ao  $IP_3$  permitindo um melhor controle na homeostase de  $Ca^{2+}$ , por exemplo, o  $Ca^{2+}$  em baixas concentrações é capaz de estimular  $IP_3R$  do tipo I e inibir o mesmo receptor em altas concentrações (Taylor et al., 2002). Além do  $Ca^{2+}$ , os  $IP_3R$  podem ser regulados por eventos de fosforilação ou associação a outras proteínas graças aos estímulos de sinais intracelulares como  $AMP_c$ , ATP e intermediários da via glicolítica (Foskett et al., 2007).

Os receptores de rianodina (RyR) pertencem a uma família de canal de  $Ca^{2+}$  que compartilha características com o  $IP_3R$ : localizam-se no RE, possuem 3 isoformas em mamíferos, o canal é formado por um complexo homotetrâmero, pode ser regulado por  $Ca^{2+}$ , PKA e calmodulina além de possuir um poro iônico muito similar ao  $IP_3$  (revisado de Van Petegem, 2012). Entretanto os RyR não se ligam ao  $IP_3$  e sim ao segundo mensageiro ribose ADP cíclica (cADPR) (Chini et al., 2002).  $IP_3R$  e RyR compartilham uma história evolutiva em comum (Mackrill, 2012) e revela parte da diversidade dos canais de  $Ca^{2+}$ .

O conhecimento das propriedades e sítios de ligação do  $IP_3R$  em vertebrados permitiu algumas estratégias para construção de sensores e moduladores de  $IP_3$ . Uchiyama et al. (2002) clonaram um domínio de ligação modificado do receptor de  $IP_3$  de camundongo, construção denominada  $IP_3$ -esponja, capaz de se ligar a molécula de  $IP_3$  produzido pela célula, competindo com os receptores nativos de  $IP_3$ . Esta construção é uma ferramenta molecular importante uma vez que permite observar o que ocorre com a dinâmica de  $Ca^{2+}$  quando se limita a disponibilidade deste segundo mensageiro.

Outra construção interessante para monitorar  $IP_3$ , é um sensor de  $IP_3$  conhecida com pelo nome IRIS (nome dedicado ao deus grego do arco-íris). O IRIS é baseado no domínio de ligação do receptor de  $IP_3$  tipo 1 em camundongos que foi inserida entre duas proteínas (Venus e ECFP) que emitem luz em comprimento de onda específico quando ficam próximas (sistema FRET). O IRIS atua como um sensor intracelular de  $IP_3$  e não compete fortemente com  $IP_3R$  comparado ao  $IP_3$ -esponja (Matsu-ra et. al., 2006).

### **1.5.1 Busca pelo receptor de $IP_3$ em *Plasmodium***

O receptor de  $IP_3$  está bem caracterizado em vertebrados e diversos grupos de invertebrados. O conhecimento da sequência dos receptores destes grupos é largamente usado como sondas na busca que envolve técnicas de bioinformática.

Prole et al. (2011) usaram as regiões conservadas dos receptores de IP<sub>3</sub> e do receptor de rianodina em mamíferos, em particular a região do poro responsável pela condutividade iônica, para realizarem um BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nos genomas de diversos parasitas: *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Babesia bovis*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* e *Schistosoma mansoni*. Porém, este trabalho não encontrou nenhum gene candidato para receptor de IP<sub>3</sub> nos parasitas do grupo dos Apicomplexa (*Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Babesia*).

A despeito das evidências de que o *Plasmodium* usa IP<sub>3</sub> como segundo mensageiro, os domínios conservados do IP<sub>3</sub>R em animais (tal como domínio de ligação ao IP<sub>3</sub>) não são encontrados no genoma de *Plasmodium*, indicando que no Apicomplexa estes receptores sejam mais similares com as plantas (Nagamune et al., 2006).

Quanto à caracterização do IP<sub>3</sub>R, as plantas terrestres estão em uma situação similar a de *Plasmodium* e outros Apicomplexas. Há evidência de que receptores de IP<sub>3</sub> participam na sinalização de Ca<sup>2+</sup> estimulada por ácido abscísico (Meimoun et al., 2009). Lin et al. (2004), usando a técnica de microarray, tentaram identificar genes relacionados a via de sinalização por inositol, entretanto os candidatos apontados pela técnica não atuam como IP<sub>3</sub>R em plantas. O uso do BLAST tendo como sonda a região de ligação do receptor de IP<sub>3</sub> em camundongos não revelou nenhum candidato no genoma de diversas plantas (Krinke et al., 2007).

Hirata et al. (1990) desenvolveram uma coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub>. Sintetizando um composto análogo ao IP<sub>3</sub> ( 2-O-[4-(5-aminoetil-2-hidroxifenilazo) benzoil]-1,4,5 tri-O-fosfo-mio-inositol ) capaz de se ligar a uma coluna de sefarose (5-carboxipentil-sefarose), este grupo foi capaz de purificar proteínas que tem afinidade ao IP<sub>3</sub> como IP<sub>5</sub>-fosfatase e IP<sub>3</sub> 3- KI. Kishigami et al. (2001) utilizaram uma coluna similar para purificar proteínas do extrato de células do olho de polvo *Todarodes pacificus* que se ligavam ao IP<sub>3</sub>. Com esta técnica, este grupo conseguiu identificar uma fosfolipase C (PLC) em *T. pacificus*.

Uma vez que as ferramentas de bioinformática ainda não apontaram candidatos para receptor de IP<sub>3</sub> em *Plasmodium*, o uso de uma coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> pode trazer resultados interessantes na identificação deste receptor em Apicomplexa e em plantas.

## 1.6 Digestão da hemoglobina em *Plasmodium* e os efeitos tóxicos da formação da hemina

Durante o ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium* ocorre uma intensa endocitose de hemoglobina como fonte de nutriente (Langreth, 1976).

Elliot et al. (2007) em um elegante trabalho, demonstraram que a absorção da hemoglobina pelo *P. falciparum* abrange quatro processos distintos. Um deles descreve o parasita engolindo o citosol da célula hospedeira (que deram o nome de "grande gole"). Além deste, outros dois processos ocorrem de forma semelhante a uma endocitose (citóstoma) que levam à formação de vesículas pequenas ou vesículas em forma de longos tubos finos. O último processo é semelhante a uma fagocitose e é similar ao "grande gole". A formação do citóstoma constitui um serviço de transporte das vesículas que finalmente entrega hemoglobina parcialmente degradadas para o vacúolo alimentar. Estes estudos foram conduzidos por meio de análise de microscopia eletrônica de seção fina no parasita em diferentes estágios do ciclo intraeritrocítico.

A degradação bioquímica da hemoglobina dentro do parasita é um processo especializado e eficiente, mas isto gera a liberação da hemina (ferro protoporfirina IX).

Altas concentrações de hemina livre promove um efeito detergente que danifica a membrana celular (Schmitt et al., 1993) além de inibir uma ampla variedade de enzimas como proteases (Aft et al., 1983). Hemina em baixas concentrações é capaz de causar peroxidação lipídica (Graça-Souza et al., 2006). Além disto, a hemina e o próprio ferro presente nesta molécula podem atuar como agente pró-oxidante danificando o DNA e promovendo a decomposição de peróxidos orgânicos (Van der Zee et al., 1996). A toxicidade da hemina é uma das barreiras que *Plasmodium* precisa lidar para completar seu desenvolvimento intraeritrocítico.

### **1.6.1 Mecanismos de defesa contra hemina em *Plasmodium***

#### *1.6.1.1 Hemozoína e sua formação*

O mecanismo de desintoxicação da hemina mais importante encontrado em *Plasmodium* é sua conversão da hemina em hemozoína ( $\beta$ -hematina) (Sherman et al., 1965). Em *P. falciparum*, a hemina é sequestrada no vacúolo digestivo e polimerizada em estrutura cristalina marrom escura denominada hemozoína, também conhecida como pigmento malárico. Durante o ciclo intraeritrocítico, metade da hemoglobina presente no eritrócito

infectado é convertida em hemozoína (Moore et al., 2006) e em trofozóitos de *P. falciparum*, 95% da hemina livre é convertida em hemozoína (Egan et al., 2002).

A estrutura da hemozoína nas espécies de *Plasmodium* é mantida por interações iônicas e ligação de hidrogênio entre os agrupamentos da hemina (Pagola et al., 2000). Há diversas propostas que explicam a formação da hemozoína em *Plasmodium*.

Os primeiros trabalhos que estudaram a origem da hemozoína em *Plasmodium* sugeriram que esta era formada por hemoglobina parcialmente degradada e não indicavam a presença de nenhum catalisador além das enzimas responsáveis pela proteólise da hemoglobina (Goldie et al., 1990).

Posteriormente, Slaler et al. (1992), na busca de um catalisador na formação de hemozoína, identificaram e caracterizaram uma proteína que apresentava uma atividade “heme polimerase” dependente de temperatura e pH nos extratos de trofozóito.

Entretanto Dorn et al. (1995) reportaram um processo auto catalítico, promovido por uma hemozoína pré formada ao invés de uma enzima. Neste trabalho os autores demonstraram a formação da hemozoína em amostras livres de proteína e que a adição de diversas proteases não alterava a formação deste cristal.

Bendrat et al. (1995) sugeriram a participação de lipídios de membrana na formação da hemozoína, indicando que o processo auto catalítico proposto no trabalho de Dorn et al. (1995) era causado pela contaminação destes lipídeos na amostra.

Entretanto a participação de proteínas ricas em histidina também foi reportada como importantes componentes no processo de formação da hemozoína em *P. falciparum* (Sullivan et al., 2002). Em especial a proteína HRPII, abundante em *P. falciparum*, capaz de induzir a formação de hemozina *in vitro*. Esta proteína tem a capacidade de se ligar a várias moléculas de hemina graças à interação com o aminoácido histina (Choi et al., 1999), induzindo assim a formação do cristal por facilitar a formação de dímero de hemina (Pandey et al., 2003).

Muitos trabalhos contestaram a importância das proteínas ricas em histidina no processo de polimerização da hemina. Papalexis et al. (2001) reportaram que apenas uma quantidade pequena da HRPII eram encontradas no vacúolo digestivo. Pandey et al. (2003) reportaram que somente a presença da HRPII *in vitro* não aumentava a velocidade de formação da hemozoína de forma compatível *in vivo* sugerindo a importância da interação desta proteína com lipídeos. Interessante que os parasitas *P. berghei* e *P. vivax* não possuem a proteína HRPII, porém são capazes de formar hemozoína.

Jani et al. (2008) reportaram a existência de uma proteína (número de acesso no Plasmodb: PF14\_0446) conservada em *Plasmodium* capaz de converter hemina em

hemozoína no vacúolo digestivo, sugerindo esta proteína como alvo interessante para tratamento contra malária.

O bloqueio da formação da hemozoína é o principal alvo das terapias antimaláricas (Rathore et al., 2005). Drogas importantes como cloroquina e artemisinina atuam na formação da hemozoína embora a natureza bioquímica desta inibição ainda seja alvo de investigação.

#### *1.6.1.2 Heme oxygenase (HO)*

A degradação da hemina a biliverdina (BV), catalisada pela enzima heme oxigenase (HO) é a via principal para o catabolismo de hemoproteínas em mamíferos e também é uma estratégia para lidar com a toxicidade da hemina (Docherty et al., 1984). HO é encontrada em todos os vertebrados, é amplamente distribuída em insetos, já foi indentificada em plantas, cianobactérias, algas e em algumas bactérias patogênicas (revisado de Kikuchi et al., 2005).

A heme oxigenase é capaz de clivar a hemina utilizando NADPH e O<sub>2</sub> na presença de P450 redutase, gerando biliverdina, CO e Fe<sup>2+</sup> (Schacter et al., 1972). A transformação da hemina em biliverdina (BV), catalisada pela HO, envolve três passos. No primeiro passo, a hemina férrica é oxidada a  $\alpha$ -meso-hidroxiemina, com o uso de 2 elétrons cedidos pela P450 redutase e uma molécula de oxigênio. O  $\alpha$ -meso-hidroxiemina é então convertido a verdohemina ferroso, em uma reação que utiliza 2 elétrons, uma molécula de oxigênio e libera CO. No passo final, o verdohemina é convertido à biliverdina ferrosa, com consumo de 3 elétrons e mais uma molécula de oxigênio. O íon ferroso é liberado, seguido da dissociação da biliverdina da enzima (Wang et al., 2003). BV é então convertido em bilirrubina (BR) por uma segunda enzima, a biliverdina-redutase (BVR) na presença do NADPH que atua como doador de elétrons (Docherty et al., 1984; Kutty et al., 1988).

Em humanos há duas isoformas da HO (HO-1 e HO-2) expressas por genes diferentes, mas com propriedades bioquímicas similares (McCoubrey et al., 1997). A HO-2 é expressa constitutivamente enquanto que a expressão da HO-1 é regulada por diversos fatores como estresse oxidativo, citocinas, metais pesados e hipóxia (Kikuchi et al., 2005). Esta regulação confere uma importante função na citoproteção em diversas células e tecidos.

Em grupos como répteis, aves, peixes e insetos a atividade da HO é importante para regular as concentrações de BV que é usada diretamente na pigmentação (Terry et al., 2002).

Em plantas e cianobactérias, a atividade da HO tem importante função na produção de biliverdina IX $\alpha$ , composto chave para síntese de fitobilina que é usado como sensor de luz vermelha e infravermelha (Beale, 1991).

Em algumas bactérias patogênicas, a atividade da HO tem como função obter ferro como nutriente a partir da hemina do hospedeiro além de regular a produção de toxinas protéicas (Schmitt et al., 1993).

Okada (2009) reportou a existência de uma heme oxigenase em *P. falciparum* (*PfHO*), número de acesso PlasmoDB: PF10\_0116. Okada (2009) demonstrou que a *PfHO* é capaz de converter hemina em bilirrubina na presença de quelantes de ferro (ferrodoxina e de ferroxamina). Este trabalho revelou uma propriedade interessante da *PfHO*: a capacidade de converter hemina em biliverdina (atividade heme oxigenase) e biliverdina em bilirrubina (atividade biliverdina redutase). O papel da *PfHO* foi considerada como mecanismo secundário de lidar com o hemina livre (**figura 7**). No genoma de *P. falciparum* não foi encontrado uma biliverdina redutase (BVR), enzima que converte a biliverdina (BV) em bilirrubina (BR) (Gardner et al., 2002).

Sartorello et al. (2010) também demonstraram a atividade heme oxigenase da *PfHO*. Entretanto, a afinidade da *PfHO* com hemina ( $K_D$   $4 \pm 2 \mu M$ ) foi considerada baixa comparada a heme oxigenase (HO) de humanos ( $0.84 \pm 0.2 \mu M$ ) (Wilks et al., 1996) sugerindo uma baixa eficiência em remover hemina no meio celular.

Kumar et al. (2008) demonstraram que os produtos de degradação da hemina (BV e BR), em concentrações micromolares, inibem o crescimento de *P. falciparum* no ciclo intraeritrocítico pela formação de espécies reativas de oxigênio. Este trabalho sugere que a falta de uma via clássica de detoxificação do heme a partir de uma HO é uma forma de proteção contra os efeitos tóxicos da BV e BR. Considerando este fato, é notável a capacidade de *P. falciparum* de realizar a biossíntese da hemina apesar da sua toxicidade (Sato et al., 2004; Surolia et al., 1992). O genoma deste parasita codifica todas as enzimas necessárias para a formação da hemina (Gardner et al., 2002), sugerindo um papel importante para a hemina no ciclo do parasita.

*P. berghei* e *P. yoelii* ativam a HO do hepatócito e o aumento da concentração de BV resultante da atividade HO do hospedeiro aumenta a parasitemia na fase hepática (Epiphonio et al., 2008). Este trabalho revelou que o parasita pode se beneficiar da heme oxigenase do hospedeiro, uma vez que baixas concentrações de hemina evita processos inflamatórios.

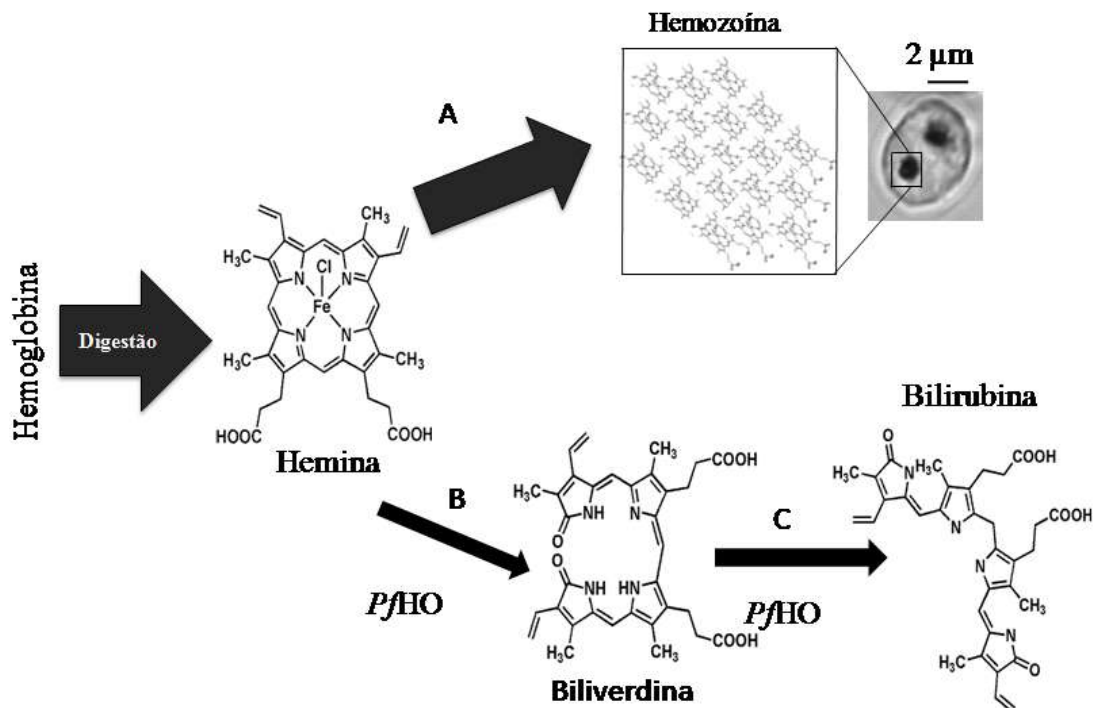
A atividade heme oxigenase e biliverdina redutase da *PfHO* ainda é controversa. Sigala et al., 2012, ao usarem uma sonda fluorescente que se liga a BV em *P. falciparum*, não detectou indícios da atividade HO. Este mesmo grupo, trabalhando com a proteína *PfHO* purificada, não conseguiu obter *in vitro* a conversão de hemina para biliverdina embora tenha



detectado a ligação entre hemina e *PfHO*. Este trabalho sugeriu que a *PfHO* não possui a função de participar da via de desintoxicação da hemina através da produção de BV e BR.

Considerando a importância para o parasita em lidar com a hemina no estágio intraeritrocítico, a investigação da atividade e função da *PfHO* pode revelar importantes informações a respeito da biologia e estratégia de sobrevivência deste parasita.

**Figura 7**-Esquema das vias de remoção da hemina em *P. falciparum*.



Em **A**: seta evidenciando a formação da hemina em hemozoína (cristal escuro evidenciado na foto feita em microscopia confocal). Principal mecanismo de detoxificação da hemina. **B**: seta indicando a atividade heme oxygenase da *PfHO*, que converte hemina em biliverdina. **C**: seta indicando a atividade biliverdina redutase, converte biliverdina em bilirubina.

Fonte: Baseado em Okada (2009); Sartorello et al. (2010); Sherman et al. (1965).

### 1.6.2 Protoporfirina XI e metaloprotoporfirinas

A protoporfirina XI é um composto formado por um anel tetrapirrólico precursor de diversas moléculas biológicas importantes como a hemina, a clorofila e citocromo C (Battersby et al., 1980). Este é capaz de formar metaloprotoporfirinas ao se associar a diferentes íons metálicos pela remoção dos íons  $H^+$  presentes nos grupos internos N-H (Borovkov et al., 1999).

Nos organismos as metaloprotoporfirinas são geralmente associadas às proteínas formando estruturas de grande importância biológica, como a hemoglobina, a mioglobina (papel no armazenamento de oxigênio nos músculos) e em várias enzimas envolvidas em processos metabólicos como os citocromos e vitaminas (revisado de Leeper et al., 1989).

Na forma livre, as metaloprotoporfirina têm sido caracterizadas como moduladores da atividade heme oxigenase (Vreman et al., 1981). Esta propriedade das metaloprotoporfirinas tem sido explorada para tratar pacientes com alta concentração de BR (Vreman et al., 2001) além de ótima ferramenta farmacológica para estudar o efeito da modulação da heme oxigenase em sistemas biológico e *in vitro* (Drummond et al., 1986).

O metal localizado na protoporfirina altera as propriedades modulatórias sobre a heme oxigenase. O zinco protoporfirina XI (Zn-PPIX) é um clássico e eficiente inibidor da HO. Zn-PPIX é formado naturalmente no organismo especialmente no período de depleção do ferro (Labbe et al., 1999).

O cobalto protoporfirina XI (Co-PPIX) é um conhecido indutor da atividade heme oxigenase e foi um dos primeiros íons identificados a exibir esta propriedade de indução *in vivo* em diversos tecidos (Maine et al., 1977).

Estudos em que o ferro da hemina é substituído sinteticamente por outros metais formando metaloprotoporfirinas que não são encontradas em sistemas biológicos, tal como caso da Ni-protoporfirina IX, ampliam as opções do uso clínico e experimental das metaloprotoporfirinas.

### **1.6.3 Ação das metaloprotoporfirinas em *Plasmodium***

Os derivados sintéticos da hemina, denominados metaloprotoporfirinas, têm sido caracterizados como inibidores por competição da enzima heme oxigenase (Drummond et al., 1981).

Metaloprotoporfirinas são potentes inibidores da polimerização *in vitro* da hemina (Basilico et al., 1997; Martiney et al., 1996; Monti et al., 1999). O íon metálico localizado no centro da protoporfirina IX tem importante função em inibir as interações  $\pi$ - $\pi$  formadas entre a hemina e o íon metálico (Cole et al., 2000).

A atividade antimalárica de diversas metaloprotoporfirinas já foi testada (Begum et al., 2003). Entretanto, foram necessárias concentrações de até 190  $\mu$ M para obter o valor do IC<sub>50</sub> em alguns destes compostos após 72 horas de incubação em cultura de *P. falciparum*.

O potencial antimalárico das metaloprotoporfirinas é limitado pela baixa solubilidade em meio aquoso e baixa permeabilidade em membranas biológicas (Begum et al., 2003; Borovkov et al., 1999). Esta limitação levou diversos trabalhos a usar polímeros e micelas associados a metaloprotoporfirina melhorando seu potencial terapêutico. (Ding et al., 2011; Engelmann et al., 2007).

Goldberg (2007) demonstrou que, além do metal, a alteração no anel da protoporfirina XI é capaz de otimizar as propriedades oxidativas e solubilidade.

A via de detoxificação da hemina é um importante alvo para ação de antimaláricos como a cloroquina (Gorka et al., 2013). Até o presente trabalho, a modulação pelas metaloprotoporfirinas na enzima heme oxigenase de *P. falciparum* nunca foi testada. Este estudo pode revelar características interessantes sobre o funcionamento desta enzima e explorar novas vias de inibição do catabolismo do heme neste parasita.

## 2 OBJETIVOS

O trabalho envolvendo o papel do segundo mensageiro IP<sub>3</sub> teve como objetivo investigar se o *Plasmodium falciparum* em seu ambiente natural (dentro do eritrócito) usa a via de sinalização dependente de IP<sub>3</sub>. Com a finalidade de obter evidência da via de sinalização baseada em IP<sub>3</sub> em *P. falciparum*, o trabalho teve as seguintes propostas de ação:

- 1) Com o uso da tecnologia de fotoliberação de IP<sub>3</sub> em microscópio confocal, testar se o parasita intacto percebe este segundo mensageiro sem removê-lo do eritrócito.
- 2) Verificar se o hormônio melatonina atua diretamente na via de sinalização IP<sub>3</sub> em *P. falciparum* com uso de mio-inositol marcado.
- 3) Monitoramento e modulação do IP<sub>3</sub> produzido pelo parasita transfectado com sondas e proteínas que se ligam ao IP<sub>3</sub> (IRIS e IP<sub>3</sub>-esponja, respectivamente).
- 4) Busca pelo candidato ao receptor de IP<sub>3</sub> usando uma coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub>.

O trabalho envolvendo o estudo da função da heme oxigenase de *P. falciparum* (*PfHO*) teve como objetivo explorar a via de degradação da heme através da produção de biliverdina/bilirrubina além de estudar a modulação desta enzima na presença de metaloprotoporfirinas. Com esta finalidade este trabalho focou nas seguintes estratégias:

- 1) Ensaio enzimático com *PfHO* editada e recombinante explorando a atividade biliverdina redutase e sua modulação pelas metaloprotoporfirinas.
- 2) Incubação do *P. falciparum* na presença das metaloprotoporfirinas e dos produtos de degradação da heme para obter dados sobre a viabilidade e modulação do ciclo do parasita na presença destes compostos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo e sincronização de fases intraeritrocíticas de *P. falciparum*

*P. plasmodium* (cepa 3D7) foram mantidos em cultura contendo hemácias humanas (A<sup>+</sup>/O<sup>+</sup>) em meio RPMI 1640 com 0,5% de NaHCO<sub>3</sub>, 0,04% de sulfato de gentamicina, 0,05% de hipoxantina e suplementado com 10% de plasma humano (A<sup>+</sup>/O<sup>+</sup>) inativado. A atmosfera das garrafas foi padronizada em 5% de CO<sub>2</sub>, 3% de O<sub>2</sub> e 92% de N<sub>2</sub> seguindo o protocolo de Trager, Jensen (1976). O meio de cultura foi trocado diariamente sendo adicionadas hemácias frescas a cada dois dias. O desenvolvimento dos parasitas foi acompanhado através de lâminas coradas com Giemsa.

A cultura de *P. falciparum* foi sincronizada, quando indicado, com sorbitol 5% (Lambros et al., 1979).

#### 3.2 Lise de hemácias para isolamento de parasitas *P. falciparum*

Hemácias parasitadas foram lavadas em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) por 5 min, 300 g e ressuspendidas em PBS contendo 0,3% (m/v) saponina e dos seguintes inibidores de proteases: benzamidina (400 µM, Sigma), antipaína, pepstatina A, leupeptina e quimostatina (Sigma, todos 20 µg/mL). Após centrifugação a 13000 g durante 10 min, 4°C, os parasitas foram lavados três vezes em tampão PBS com os inibidores de proteases nas concentrações indicadas acima (300 g, 5 min).

#### 3.3 Marcações com Fluo-4 AM e Fotólise do caged-IP<sub>3</sub> em eritrócitos infectados com *P. falciparum*

Eritrócitos infectados e sincronizados com parasitas no estágio de trofozoíto foram lavados 2 vezes em tampão Krebs-Henseleit (118 mM NaCl, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM D-glucose, 10 mM HEPES e 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) e ressuspendidos em 1 mL do mesmo tampão contendo 40 µM de probenicida e foram adicionados 5 µM Fluo-4 AM e 2,5 µM ci-IP<sub>3</sub> (siChem) por 1 hora à 37°C. Ao término da incubação o indicador fluorescente extracelular foi removido por 2 lavagens (300g, 4 minutos) com mesmo tampão. Para os experimentos de microscopia confocal alíquotas de 200 µL contendo células

marcadas foram colocadas em placas para microscopia, incubadas previamente com L-polisina por 1 hora, e deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos para aderirem nas placas.

As placas foram colocadas em um suporte do microscópio confocal Axiovert 2000 (Zeiss) e os experimentos foram realizados a temperatura ambiente. Imagens de fluorescência para Fluo4-AM (excitação 488nm, emissão >500 nm) foram adquiridas em intervalos de 100ms por uma câmera refrigerada (CCD- *charge-coupled device* ) e os dados gravados usando o software Piper Control<sup>TM</sup> (Stanfordphotonics).

A liberação do caged-IP<sub>3</sub> foi obtida excitando a amostra com um pulso de luz de uma lâmpada UV(pulsos de 1 ns com comprimento de onda de 337 nm e energia 1.45 mj) carregada com nitrogênio (Photon technology international).

Imagens foram capturadas usando uma objetiva de 40x com transmitância suficiente para passar a luz UV. Os dados foram analisados com uso do programa ImageJ (NIH).

#### 3.4 Montagem do pARL-IP<sub>3</sub>-esponja e pARL-IRIS

Plasmídeo GST-m49&m30/pGEX-2tcontendo IP<sub>3</sub> esponja (Uchiyama et al.,2002) teve o domínio de ligação do receptor de IP<sub>3</sub> de camundongo amplificado com o uso de oligonucleotídeos (Senso: 5'GTCCTCCATTATATAAATTG3'; Antisenso : 5'GTAAGTTTTCCGATAGTTG3') em condições ótimas de PCR. Estes oligonucleotídeos alteraram as enzimas de restrição que flanqueavam o domínio de ligação do IP<sub>3</sub>-esponja de BamHI/EcoRI para KpnI/AvrII, além de remover o códon de parada do domínio. O domínio foi adicionado em um vetor pARL (um vetor melhorado do pHH2) (Crabb et al.,2004) contendo a proteína fluorescente GFP. A ligação do vetor pARL com o domínio de ligação do IP<sub>3</sub>-esponja foi obtida com uma enzima ligase (incubação 12 horas à 16°C, seguindo o protocolo da Invitrogen). Após a obtenção do vetor pARL-IP<sub>3</sub>-esponja, 10ng da construçãofoi usada para transformar bactérias quimiocompetentes DH5α.

As colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB suplementado com 0,1 mg/ml de ampicilina, e incubados por 12 horas à 37°C sob agitação de 250 rpm. A obtenção dos plasmídeos foi feita através de mini-prep por lise alcalina e o plasmídeo resgatado seguindo o protocolo da Qiagen. A construção foi verificada por múltiplas digestões com enzimas de restrição além do sequenciamento usando os oligonucleotídeos utilizados para flanquear o domínio IP<sub>3</sub>-esponja.

Para a construção pARL-IRIS, o domínio IRIS foi amplificado do vetor IRIS-1 His-pcDNA3.1 zeo(+) (Matsu-ura et al.,2006) utilizando-se dos oligonucleotídeos (Senso: 5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGCTGTTC3' e Antisense: 5'GACTCGAGCTACTTGTAC3'). Estes oligonucleotídeos alteraram as enzimas de restrição que flanqueavam o domínio de ligação do IRIS de AvrII/XhoI para KpnI/XhoI. Nesta construção removeu-se o GFP do vetor pARL uma vez que as proteínas Venus e ECFP (contida no IRIS) emitem no mesmo comprimento de onda do GFP.

### 3.5 Transfecção epissomal em *Plasmodium falciparum*

*P. falciparum* (cepa Dd2) sincronizadas no estágio de anel (parasitemia entre 5-10%) foram transfectadas usando um eletroporador programado para 0.31 KV e 950  $\mu$ F com capacitância máxima seguindo a recomendações de Fidock et al. (1998) e Wu et al. (1995). Em cada transfecção, usou-se 80  $\mu$ g de DNA. A droga de seleção (2,5 nM WR99210) foi adicionada 24 horas após da eletroporação e presente continuamente no meio de cultura para evitar liberação do plasmídeo.

Após três a quatro semanas, quando a parasitemia ultrapassa 1%, as células foram levadas ao microscópio de fluorescência com câmera. GFP foi excitada usando laser 488nm, a luz emitida foi coletada usando filtro de longa banda (515nm) e os dados analisados com programa Simple PCI software (Compix Inc, Cranberry, PA).

### 3.6 Incorporação em eritrócitos infectados com *P. falciparum* com [H<sup>3</sup>]-mio-inositol e medição de [H<sup>3</sup>]-inositol polifosfatos

Os eritrócitos infectados com *P. falciparum* sincronizados com sorbitol foram cultivados até obter parasitemia aproximada em 5%. Quando os eritrócitos infectados chegaram ao estágio de trofozoítos maduros (aproximadamente 30 horas após a invasão) as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de plasma humano e 2.5  $\mu$ Ci/mL de [H<sup>3</sup>]-mio-inositol (Perkin Elmer). A incorporação do [H<sup>3</sup>]-mio-inositol continuou até a cultura chegar ao estágio de trofozoíto jovem (aproximadamente 18 horas após invasão) com parasitemia aproximada em 10%. A cultura de eritrócitos infectados foi lavada três vezes com tampão HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*) e incubada em tampão HBSS sem plasma por 15 minutos a 37°C. Após esta incubação adicionou-se 10 mM de LiCl<sub>2</sub> e incubou novamente as células por 20 minutos à 37°C. Após a incubação com LiCl<sub>2</sub>, 5ml da cultura (contém

aproximadamente  $2 \times 10^8$  células) foram alicotado em tubo de 15 ml para receber o tratamento com melatonina e ionomicina. Eritrócitos infectados marcados com  $[H^3]$ -mio-inositol sem adição de melatonina ou ionomicina e eritrócitos não infectados marcados com  $[H^3]$ -mio-inositol foram usados como controles. Após 20 minutos da adição das drogas, as células foram centrifugadas e o sobrenadante removido. As células foram então ressuspendidas com 0.5 M de ácido tricloroacético (mesmo volume do pellet) e incubadas no gelo por 30 minutos. Ao término da incubação no gelo, adicionou 150  $\mu$ L de EDTA 10 mM (pH7.0) e 2mL de uma mistura (proporção 1:1) de tri-n-octilamina e 1,1,3-triclorofluor etano para extrair os componentes contendo  $[H^3]$ -inositol solúveis. As amostras foram vortexadas e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas 400 g por 3 minutos. O sobrenadante que contém os componentes com  $[H^3]$ -inositol solúveis foram transferidos para um novo tubo contendo 75  $\mu$ L de  $NaHCO_3$  250 mM e armazenados à 4°C.

Para separação dos  $[H^3]$ -inositol fosfato usou-se colunas de cromatografia de troca iônica contendo resina Dowex (Bio-RAD™, coluna tipo AG1 1- $\lambda$ 8) seguindo as recomendações de Berridge et al. (1983). As amostras armazenadas a 4°C foram adicionadas a coluna previamente umidificada com água destilada. Glicerofosfolípedes, anel inositol,  $IP_1$  e  $IP_2$  foram removidos por eluição com 40 mL de água Milli-Q contendo 0,4 M de formiato de amônio e 0,1M de ácido fórmico.  $IP_3$  e outros inositóis contendo mais de três fosfatos foram eluidos com 10 mL da solução contendo água Milli-Q com 1,2 M de formiato de amônio e 0,1M de ácido fórmico. 5 mL da eluição contendo  $IP_3$  e outros inositóis contendo mais de três fosfatos foram misturadas com 5 mL de líquido cintilante Ultima-Flo (Perkin Elmer) para determinar a DPM (desintegração por minuto) com o uso de um aparelho cintilador.

### 3.7 Cromatografia de afinidade ao inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ )

Para a montagem da coluna de cromatografia de afinidade ao  $IP_3$  adaptamos o protocolo proposto por Hirata et al. (1990). Para a coluna, usou-se o substrato sefarose de alta performace ligada a estreptavidina (GE Healthacare Life Science) e  $IP_3$  conjugado a biotina (Echelom Biosciences).

A coluna de sefarose-estreptavidina foi equilibrada lavando com volume 10x com tampão de ligação gelado. Para preparar o tampão de ligação usou-se: 20mM de fosfato de sódio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ), 150mM de cloreto de sódio (NaCl), 20mM de cloreto de lítio (LiCl) e 2mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pH 7,5. O tampão de ligação foi



filtrado em filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . A sefarose-estreptavidina foi ressuspensa de modo que 25% do volume final fosse o tampão de ligação e 75% sefarose-estreptavidina.

O IP<sub>3</sub>-biotina foi ressuspensa em água MilliQ gelada em ambiente escuro de forma que cada 1  $\mu\text{L}$  de água contesse 1 $\mu\text{g}$  de IP<sub>3</sub>-biotina. As colunas foram montadas em tubo falcon estéril de 15 mL. Para cada coluna contendo 1,25 mL de sefarose-estreptavidina ressuspensa em tampão de ligação foram adicionados 20  $\mu\text{g}$  de IP<sub>3</sub>-biotina. As colunas foram deixadas por agitação constante por 12 horas a 4°C em ambiente privado de luz.

Ao final do processo de ligação da biotina associada ao IP<sub>3</sub> com a estreptavidina da sefarose, as colunas foram centrifugadas por 1 minuto, 300 g a 4°C. O sobrenadante contendo excesso de IP<sub>3</sub>-biotina foi removido e as colunas foram lavadas 5 vezes com 2 mL de tampão de ligação gelado para remover eventuais moléculas de IP<sub>3</sub>-biotina que não tenha se ligado a sefarose-estreptavidina. No final da última lavagem, a coluna foi ressuspensa em tampão de ligação de forma que o volume final de tampão atingisse 25% do volume final de cada coluna. Foram montadas três colunas distintas, duas contendo IP<sub>3</sub>-biotina-sefarose-estreptavidina e uma contendo apenas sefarose-estreptavidina. Como controle positivo, foi usado extrato de proteínas totais de fígado de camundongo (orgão rico em receptores de IP<sub>3</sub>) aplicado à coluna IP<sub>3</sub>-biotina-sefarose-estreptavidina; como controle negativo, foi aplicado o extrato total de proteínas de *P. falciparum* na coluna contendo apenas sefarose-estreptavidina.

O extrato de proteínas de fígado foi obtido a partir de dois fígados (cedido pelo laboratório da Professora Dra Bettina Malnic, IQ-USP) de camundongos BALB/C com 3 semanas de idade. Os fígados foram macerados com uso de um Polytron (Brinkmann Instruments) na presença de tampão PBS pH 7.4 na presença de inibidores de proteases antipaína, pepstatina, quimostatina e leupeptina (Sigma) nas concentrações de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cada e 500  $\mu\text{M}$  de benzamidina (Sigma). Para o extrato de proteínas de *P. falciparum*: 2,5 L de cultura de *P. falciparum*, 10% de parasitemia no estágio trofozoíta (aproximadamente 20h após a invasão) foram lavados três vezes em PBS (300 g, 5 minutos) e isolado dos eritrócitos utilizando saponina (Sigma) 0,03% (m/v) e na presença dos inibidores de protease e benzamidina (Sigma) em 25 mL de PBS. Após centrifugação de 1300 g durante 10 minutos a 4 °C, os parasitas foram lavados três vezes em PBS contendo os inibidores de proteases.

Após este passo, as amostras de fígado e parasitas foram ressuspensas em tampão 50 mM TRIS-HCl, 2 mM EDTA pH7.4 + 0,1% de Triton X-100 mais inibidores de protease e PMSF 1 mM. As amostras foram sonicadas no SONIC (Vibracell) potência de 50% por 20 segundos por 3 vezes no gelo (intervalo de 10 segundos entre cada sonicação). As amostras foram centrifugadas a 1300 g por 10 minutos a 4°C para remoção do pellet. Foram

adicionadas DNase e RNase (concentração final 200 ng/ $\mu$ L cada) e incubado por uma hora a 37°C. As amostras foram filtradas em filtro 0,45 $\mu$ m. A quantidade de proteína de cada amostra foi quantificada usando o kit “BCA protein assay kit” da Pierce. Foram adicionadas 2,5mg de extrato de proteína de fígado na coluna do controle positivo; 2,5mg do extrato de proteína de *P. falciparum* na coluna controle negativo e 2,5mg de extrato de proteína de *P. falciparum* na coluna IP<sub>3</sub>-biotina-sefarose-estreptavidina. O volume da coluna foi acertado com tampão de ligação gelado mais inibidores de protease até obter volume final de 5ml. As colunas foram incubadas a 4°C em agitação suave e constante em ambiente protegido da luz durante 12 horas.

Após a incubação, as colunas foram centrifugadas por 1 minuto a 300 g a 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionado novo tampão de ligação gelado com inibidores até o volume final 5 ml. As colunas foram incubadas no escuro por agitação constante a 4°C por 10 minutos. Após este período as colunas foram novamente centrifugadas e sobrenadantes removidos. Este passo foi repetido sete vezes. Parte do sobrenadante de cada lavagem foi armazenada para quantificação de proteínas.

Para eluir as proteínas que se ligaram a coluna foram usadas o tampão de eluição gelado. O tampão de eluição usado contém: 8M de Guanidina-HCl, 20mM de LiCl, 2mM de EDTA, pH: 1,5 contendo inibidores de protease descritos e filtrado em filtro 0,45 $\mu$ m. Adicionado 1mL do tampão de eluição em cada coluna e mantido por agitação constante por 1 hora a 4°C. Ao final da incubação as colunas foram centrifugadas por 1 minuto a 300 g e o sobrenadante recolhido em eppendorfs estéreis.

As amostras eluidas da coluna foram centrifugadas em uma speed vacuum a temperatura ambiente por 4 horas e ressuspendidas em 150 $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada.

As amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 8% e corridas em voltagem baixa (60 v) até a discriminação das bandas. Após a corrida, o gel foi fixado e corado seguindo as recomendações do kit “Colloidal Blue Staining kit” da Invitrogen. O gel foi escaneado e as seções do gel foram cortadas e enviadas para análise em espectômetro de massa na Taplin Mass Spectrometry, Escola Médica de Harvard (<https://taplin.med.harvard.edu/>) para identificação das proteínas.

### 3.8 Clonagem, Expressão e Purificação da Hemo Oxigenase Recombinante de *P. falciparum*

O gene da PfHO (número de acesso PlasmoDB: PF10\_0116) sem a sequência predita do peptídeo sinal de trânsito foi amplificado com os oligos senso 5'-

CCATATGCTTTTTGTAAGAAATGAAGTGCTACC-3' e antisenso 5'-CGGATCCTTATGATTTTACTTTTTCGAAATGTTTAG-3'. O produto de amplificação foi introduzido no vetor comercial pET28a vector (Novagen), no qual adiciona a *PfHO* uma cauda de seis histidinas ligada ao domínio de protease da trombina. A clonagem foi realizada pelo Dr Robson Sartorello no Instituto de Biociências da USP e pela Professora Dra Ana Paula U. Araújo no Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Para a expressão, colônia de *Escherichia coli* transfectada com vetor pET28a contendo *PfHO* foi cultivada à 37°C em meio LB suplementado com canamicina 15 mg L<sup>-1</sup> até a densidade óptica 600 nm (OD<sub>600</sub>) chegar ao valor 0,5. A expressão da proteína foi então induzida com isopropílico β-D thiogalactopyranoside (IPTG) 0,4 mmol L<sup>-1</sup> a 20°C por 20 h. Posteriormente, as células foram colhidas por centrifugação a 4.000 g por 20 min a 4°C e pellet ressuspense em tampão de lise (Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4, NaCl 300 mmol L<sup>-1</sup>, imidazol 20 mmol L<sup>-1</sup>, fluoreto de fenil metil sulfônico (PMSF) 1 mmol L<sup>-1</sup>, e ditiotretitol (TDT) 4 mmol L<sup>-1</sup>. As células foram lisadas por sonicação (14 vezes durante 30s com de intervalo de 30s no gelo). Após a sonicação, os detritos insolúveis foram separados por centrifugação a 40.000 g por 30 min. a 4°C. A fração solúvel foi filtrada e carregada em temperatura ambiente em uma coluna superfluxo Ni-NTA (Qiagen), pré-equilibrada com 10 vezes o volumes de tampão de lise obtido. Proteínas com baixa afinidade a coluna foram eluídas com 10 vezes o volume de tampão de lise e *PfHO* contendo cauda de Histidina foi eluído com 5 volumes de Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,4, NaCl 300 mmol L<sup>-1</sup>, imidazol 250 mmol L<sup>-1</sup>.

A etapa de purificação final incluiu uma filtração em gel (Superdex 200, coluna 16/60, GE Healthcare) e da concentração da proteína, utilizando dispositivos Amicon Ultra (Millipore). A pureza da proteína foi confirmada por SDS-PAGE e a produção de proteína purificada foi de aproximadamente 25 mg L<sup>-1</sup> de cultura bacteriana. A expressão e purificação da enzima *PfHO* foi feita com a colaboração e auxílio do doutorando Fernando V. Maluf e Prof. Dr Rafael Guido no Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Cristalografia, USP.

### 3.9 Atividade Biliverdina redutase da hemo oxigenase recombinante de *P. falciparum* e sua modulação na presença de metaloprotoporfirinas

Para o ensaio enzimático da *PfHO* recombinante foi testado a reação redutora que forma bilirubina a partir de biliverdina. Para esta reação usou-se 2 mM de glicose-6-fosfato (Sigma); 0,8 mM de NADPH (Sigma); 0,2 u de glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma); 1  $\mu$ M de *PfHO* recombinante e 50 mM de biliverdina (Frontier Scientific). Os reagentes foram ressuspendidos em água (pH 7.4) contendo: 50 mM Tris-HCl, NaCl 100 mM. O ensaio foi realizada em placa ELISA de fundo chato e transparente a 37 °C. O volume total por poço foi 200  $\mu$ L.

O aumento da densidade óptica (O.D.) na absorvância de 454 nm (indicando formação de bilirubina) foram medidas com um espectrofotômetro Flexstation 3 (Molecular Devices).

A reação biliverdina redutase foi testada na presença de diferentes concentrações de metaloprotoporfirina (0,1, 1, 10, 25 e 50  $\mu$ M). As metaloprotoporfirinas usadas foram: Fe-PPIX (hemina) (Sigma); protoporfirina IX (PPIX) (Sigma) e metaloporfirinas sintéticas (Co-PPIX; Zn-PPIX; Cu-PPIX; Mn-PPIX e Ni-PPIX). As metaloprotoporfirinas sintéticas foram produzidas pelo Dr Bernardo A. Iglesias e Prof. Dr Koite Araki no Departamento de Química Fundamental, IQ-USP.

Para calcular a modulação, usamos o programa GraphPad Prism para fazer a regreção linear da curva cinética (O.D 454 versus tempo) da reação BVR catalisada pela *PfHO* para obtermos o valor do coeficiente angular ( $\alpha$ ) que indica a inclinação da reta. O valor do  $\alpha$  da reação BVR na presença da *PfHO* com solvente DMSO ou metaloprotoporfirina foi normalizada em relação ao  $\alpha$  da reação BVR na presença da *PfHO*.

Controle com todos os reagentes, exceto enzima foram realizados em paralelo a cada experimento. Os resultados representam a média de três experimentos distintos com triplicata cada.

### 3.10 Análise em HPLC

A detecção da bilirubina na reação catalisada pela *PfHO* (Volume final 2,5 mL) foi detectada com uso da cromatográfica líquida realizada em uma coluna C18 Luna Phenomenex 5  $\mu$  (250  $\times$  4,60 milímetros), utilizando um cromatógrafo LC 20AT equipado com um detector de arranjo de diodos UV-Vis (SPD-M20A). As amostras foram acidificadas com ácido clorídrico concentrado (HCl<sub>(aq)</sub>36% w/w, Labsynth) e extraídas 3 vezes com 1 mL de diclorometano. O solvente orgânico foi removido com fluxo de N<sub>2</sub> gasoso e ressuspendido em 0.5 mL de DMSO e 1 mL de metanol.

As análises foram realizadas utilizando acetonitrila 5% com 0,05% de ácido fórmico como solvente (A), e acetonitrila como solvente (B), a uma vazão de 0,4 mL / min. Dez minutos após a injeção de uma amostra de gradiente linear de 40 minutos foi aplicado uma mudança de solvente A para uma mistura de solvente A / B (2:8), que foi mantido por 20 minutos. A condição inicial foi devolvida por um gradiente linear de acetonitrila (5 min).

Os experimentos com HPLC-UV foram realizadas pela Dra. Vânia B. Bueno orientada pelo Prof. Dr. Luiz H. Catalani no Departamento de Química Fundamental no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

### 3.11 Incubação de *P. falciparum* na presença de metaloprotoporfirinas/ metaloprotoporfirinas encapsuladas, biliverdina e bilirrubina

Eritrócitos infectados *P. falciparum* desincronizados (parasitemia 2%) foram incubadas durante 48 horas em uma placa ELISA de fundo plano com 96 poços, contendo diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu$ M) de hemina, protoporfirina IX e metaloprotoporfirinas (Zn-PPIX, Ni-PPIX, Mn-PPIX, Cu-PPIX e Co-PPIX). Hemácias infectadas sem tratamento e hemácias infectadas com DMSO foram usadas como controle. DMSO é o solvente usado para solubilizar as metaloprotoporfirinas.

Seguindo o mesmo protocolo, foram testadas concentrações (0,1; 1; 10  $\mu$ M) de hemina, biliverdina, bilirrubina e controle contendo solvente DMSO.

Diferentes concentrações (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 nM) de Zn-PPIX, Ni-PPIX, Mn-PPIX, Cu-PPIX, Co-PPIX, hemina, PPIX e DMSO encapsulados foram testadas em *P. falciparum*. As drogas foram solubilizadas em meio RPMI completo e adicionadas nas placas. As metaloprotoporfirinas foram encapsuladas com uma formulação contendo atelocolágeno marinho usando a técnica de coacervação (Menger et al., 1998). As metaloprotoporfirinas foram encapsuladas pela Dra Daiana K. Deda e pelo Prof. Dr Koite Araki no Departamento de Química Fundamental, IQ-USP.

Após a montagem das placas, estas foram colocadas em uma estufa a 37°C em atmosfera controlada durante todo o período de incubação.

### 3.12 Contagem de fases intraeritrocíticas e parasitemia de *P. falciparum*

Ao final da incubação nas placas, as células foram centrifugadas e o pelete fixado por pelo menos 12 horas com PBS, pH 7,4, contendo formaldeído a 2% (v / v) (Labosynth). As

células fixadas foram ressuspensas em PBS pH 7,4 contendo 0,1% de Triton-100X (v / v) (Sigma) e 5 nM de homodímro oxazole amarelo (YOYO-1-labeled DNA, Molecular Probes) e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Parasitemia e proporção de A+T e E foram determinados a partir de gráficos de pontos (dispersão lateral versus fluorescência) de 10<sup>5</sup> células adquiridos num citómetro de fluxo FACS Calibur utilizando software CellQuest (Becton Dickinson) usando as configurações sugeridas por Schuck et al. (2011). Fluorescência foi excitada com um laser de argônio a 488 nm e emissão de fluorescência foi coletada em 520-530 nm.

### 3.13 Medição de hemozína *in vivo* em *P. falciparum*

Eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio de trofozoíto foram lavados uma vez com PBS e colocados em um suporte previamente tratado com poli-L-lisina para aderências das células durante 15 minutos. O suporte foi levado ao microscópio confocal. As imagens foram captadas em microscópio confocal LSM 510 (Zeiss), utilizando o laser de Argônio (comprimento de onda 488 nm) e espelho dicróico principal 488 (HFT 488). A objetiva utilizada foi apocromática com 63x de aumento e de abertura numérica de 1.4. Todas as imagens foram captadas com a mesma resolução.

As imagens foram analisadas e a área do cristal de hemozoína foi obtida com o uso do programa Image J. O tamanho da hemozína da cultura previamente tratada com 1 µM de cloroquina e 25 µM de Zn-PPIX durante 2 horas foram comparadas com grupo controle que recebeu o solvente DMSO.

### 3.14 Ensaio de identificação de proteínas de *P. falciparum* que se liga a biliverdina em sistema de eletroforese bidimensional

Cultura desincronizada de *P. falciparum*, parasitemia 10%, foi incubada com 20 µM de biliverdina durante 30 minutos. Uma cultura de *P. falciparum* desincrônica foi incubada com DMSO (0,02% do volume final) por 30 minutos como controle. Os parasitas foram isolados das hemácias e resuspensos em tampão DeStreak (GE) contendo inibidores de protease: 20 µM de antipaina, pepstatina, leupeptina e quimostatina (Sigma) e 500 mM de benzamidina (Sigma). As células foram rompidas por ultra sonicação (Sonics, Cell Vibra modelo VCX 130PB) em amplitude máxima por 90 segundos em suporte refrigerado. Os

detrítos celulares foram centrifugados (10.000 g durante 10 min a 4 °C) para recuperar a fração de proteína solúvel. As amostras foram quantificadas com reagente de Bradford.

Para corrida das amostras em um gel bidimensional, 600 µg de proteína total foram aplicadas em uma tira de pH4-7, de 13cm (13cm Immobiline DryStrip [pH4-7]) pré-hidratada e a primeira dimensão (IEF) foi realizada utilizando Ettan IPGphor 3 Sistem (GE Healthcare). A isoeletrofocalização (IEF) foi realizada em três passos: 1000 V em gradiente por 800 Vh; 8000 V em gradiente por 11300 Vh; e por fim, manteve-se 8000 V constante por 5400 Vh. Para a segunda dimensão, as tiras foram previamente incubadas com tampão de equilíbrio (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M uréia; glicerol 29% e SDS a 2%) acrescido de 1% de DTT durante 15 minutos, seguido de 15 minutos em tampão de equilíbrio suplementado com 2,5% de iodoacetamida.

Para visualização das proteínas que se ligam a biliverdina, adaptou-se o protocolo sugerido por Berkelman et al. (1985). Os géis foram incubados em solução contendo 1 mM de acetato de zinco por 30 minutos e, em seguida, escaneado em um Storm 860 Scanner (excitação 450 nm / emissão 520 nm, no modo de alta sensibilidade) e posteriormente corados seguindo as recomendações do kit “Colloidal Blue Staining kit” (Invitrogen). Os géis foram digitalizados com ImageScanner III (GE Healthcare), para visualização das proteínas totais. Todas as regiões do gel que fluoresceram com a incubação de acetato de zinco e identificadas como proteína com Colloidal Blue foram enviadas para análise em espectômetro de massa na Taplin Mass Spectrometry (Escola Médica de Harvard) para identificação das proteínas.

### 3.15 Análise estatística

Todos os resultados são expressos com média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experimentos distintos. One-Way ANOVA foi utilizado para comparações entre os grupos, seguido pelo teste Dunnett Newman-Keuls post. Para o cálculo do IC<sub>50</sub>, aplicamos a regressão linear no gráfico (parasitemia vs Log[concentração]) usado equação sigmoideal dose-resposta. O valor P menor que 0,05 foi considerado indicativo de uma diferença estatisticamente significativa. O programa GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA) foi utilizado em todos os testes estatísticos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Papel do IP<sub>3</sub> na transdução de sinal em *P. falciparum*

No genoma do *Plasmodium* ainda não foi caracterizado um receptor de IP<sub>3</sub> (Gardner et al., 2002), importante componente para via de sinalização do IP<sub>3</sub>. No entanto há diversos trabalhos que sugerem a existência desta via em *Plasmodium* (Elabbadi et al., 1994; Enomoto et al., 2012; Hotta et al., 2000; Martin et al., 1994, Raabe et al., 2011).

Com a finalidade de testar se *P. falciparum* dentro do eritrócito é capaz de mobilizar Ca<sup>2+</sup> na presença do IP<sub>3</sub>, marcamos o parasita com o caged-IP<sub>3</sub> e marcador fluorescente de Ca<sup>2+</sup> Fluo 4-AM. A liberação do IP<sub>3</sub> dentro de eritrócitos infectados permite obter uma evidência direta da capacidade do *P. falciparum* em mobilizar Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub> além da existência de um receptor de IP<sub>3</sub> em *P. falciparum*.

#### 4.1.1 Mobilização de Ca<sup>2+</sup> na presença do segundo mensageiro IP<sub>3</sub>

##### 4.1.1.1 Uso do probenecide na medição de Ca<sup>2+</sup> citossólico em *P. falciparum*

Com a finalidade de monitorar a mobilização de Ca<sup>2+</sup> em eritrócitos infectados com *P. falciparum* utilizamos o marcador de Ca<sup>2+</sup> fluorescente Fluo 4-AM. Entretanto, umas das principais complicações na realização de medidas Ca<sup>2+</sup> citossólico em *Plasmodium* está no fato do marcador fluorescente ser compartimentalizado nos vacúolos ácidos destes parasitas (Biagini et al., 2003; Rohrbach et al., 2005).

Para evitar a compartimentalização dos Fluo 4-AM, utilizamos o probenecide, um inibidor não específico do transportador de ânions orgânicos (Di Virgilio et al., 1988). Para demonstrar a eficiência do probenecide, testamos o protocolo de marcação com Fluo 4-AM e caged-IP<sub>3</sub> na presença e na ausência deste inibidor (**figura 8**).

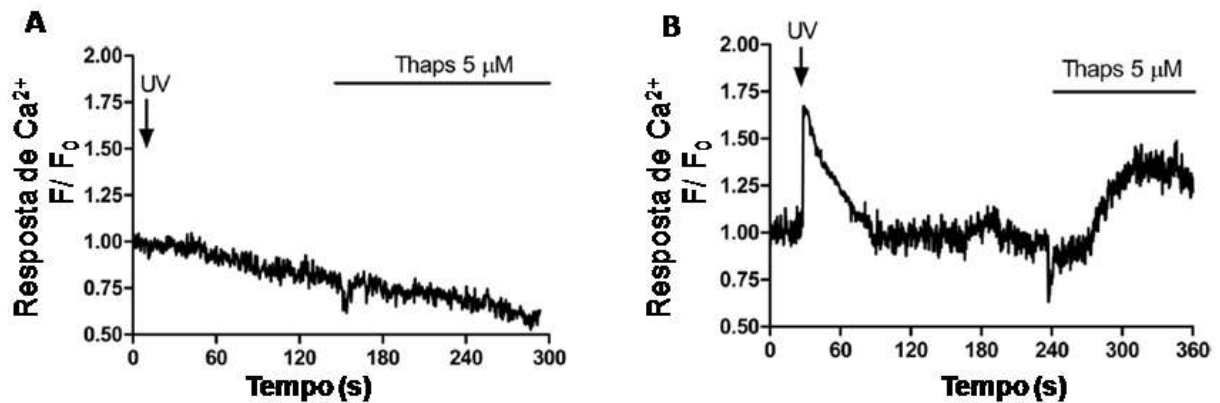
Não observamos uma mobilização de Ca<sup>2+</sup> pela fotoliberação do caged-IP<sub>3</sub> e pouca ou nenhuma mobilização de Ca<sup>2+</sup> foi obtida com a adição de 5 µM de tapsigargina, um inibidor da Ca<sup>2+</sup> ATPase no retículo endoplasmático (**figura 8 A**). Na ausência do probenecide a linha basal de Ca<sup>2+</sup> decresce com o passar do tempo indicando a contínua remoção do Fluo 4-AM.

Quando tratamos os eritrócitos infectados com *P. falciparum* com 40 µM de probenecide durante a marcação do Fluo 4-AM e caged-IP<sub>3</sub>, observamos a mobilização de Ca<sup>2+</sup> após a fotoliberação do IP<sub>3</sub> e adição de 5 µM de tapsigargina (**figura 8 B**).



Demonstramos que a adição do probenecide é importante para observar o monitoramento de  $\text{Ca}^{2+}$  em *P. falciparum*.

**Figura 8**–Uso do probenecide inibe a compartimentalização do Fluo 4-AM.



Medição da fluorescência  $\text{Ca}^{2+}$  captada por microscopia confocal. Razão da intensidade de fluorescência ( $F/F_0$ ) foi plotado em função do tempo (segundos). Eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio de trofozoíto marcados com Fluo 4-AM e caged- $\text{IP}_3$ . **A**: resposta de uma célula não tratada com probenecide estimulada pelas fotólise do caged- $\text{IP}_3$  (indicada pela seta) mais adição de  $5 \mu\text{M}$  de tapsigargina (gráfico representativo de 17 células em 3 experimentos distintos). **B**: resposta de uma célula tratada com  $40 \mu\text{M}$  de probenecide estimulada pela fotólise do caged- $\text{IP}_3$  (indicada pela seta) mais adição de  $5 \mu\text{M}$  de tapsigargina (gráfico representativo de 36 células em 11 experimentos distintos).

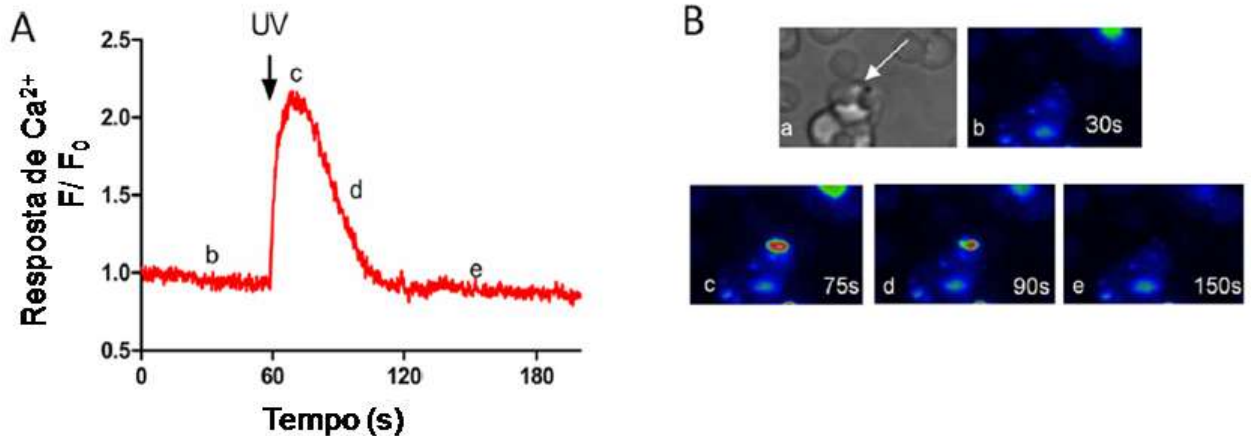
Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

#### 4.1.1.2 A fotoliberação do $\text{IP}_3$ induz a liberação de $\text{Ca}^{2+}$ em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíto

Com eritrócitos infectados com *P. falciparum* marcados com o caged- $\text{IP}_3$  e Fluo 4-AM, testamos se a liberação do  $\text{IP}_3$  permite obter uma evidência direta da capacidade deste segundo mensageiro em mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  neste parasita.

Investigamos a capacidade do  $\text{IP}_3$  em mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  do parasita *P. falciparum* no estágio de trofozoíto (aproximadamente 24 horas após a invasão) dentro do eritrócito (**figuras 9 A e 9B**). Observamos um aumento transiente do  $\text{Ca}^{2+}$  em um eritrócito infectado após a fotoliberação do  $\text{IP}_3$  com pulso de luz UV. A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma ocorreu imediatamente após aplicação do UV sendo que este íon foi removido gradualmente até chegar a condições basais após 60 segundos.

**Figura 9-** Fotólise do caged-IP<sub>3</sub> mobilizando Ca<sup>2+</sup> em eritrócito infectado por *P. falciparum* em estágio trofozoíto marcado com Fluo 4-AM (5μM) e caged-IP<sub>3</sub> (2μM).



Em **A**: Gráfico representativo da mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida pela fotólise do caged-IP<sub>3</sub>. Gráfico de unidades arbitrárias de fluorescência (F/F<sub>0</sub>) por Tempo em segundos (s). Seta indica o momento em que o pulso de UV foi acionado (60s). Resposta representativa de 81 células em 15 experimentos. **B**: Imagens do Confocal da célula representada em A. Da esquerda para direita. Painel: **a**) Luz de transmissão evidenciando um *P. falciparum* dentro do eritrócito. **b-e**) mudanças nas concentrações de Ca<sup>2+</sup> são mostradas em pseudocores (azul para concentrações mais baixas e vermelho para [Ca<sup>2+</sup>] mais altas), em **b**) linha basal (t=30s), **c**) pico transitente na [Ca<sup>2+</sup>] (t=75s), em **d**) diminuição do pico de Ca<sup>2+</sup> (t=90s) e **e**) o retorno a linha de base (t=150s).

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

Para certificar que a mobilização de Ca<sup>2+</sup> em nosso sistema não foi causada por um efeito direto do pulso UV, repetimos o mesmo protocolo em eritrócitos infectados marcados com Fluo 4-AM sem caged-IP<sub>3</sub>.

Na **figura 10** (linha verde) demonstramos que o pulso de luz UV não é capaz de mobilizar Ca<sup>2+</sup> do eritrócito infectado no estágio trofozoíto, porém a adição de 5 μM de tapsgargina foi capaz de liberar Ca<sup>2+</sup> nestas células indicando que este íon estava passível de ser mobilizado. Na **figura 10** (linha vermelha) demonstramos que eritrócitos não infectados marcados com Fluo 4-AM não são capazes de mobilizar Ca<sup>2+</sup> na presença do pulso UV ou tapsgargina. Este dado indica que o eritrócito humano não tem estoque de Ca<sup>2+</sup> sensível a tapsgargina e não contribui com a mobilização de Ca<sup>2+</sup> observada em eritrócitos infectados.

**Figura 10-** Estímulo do pulso ultravioleta não mobiliza  $\text{Ca}^{2+}$  em eritrócitos não infectados e infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíto marcados com Fluo 4-AM.

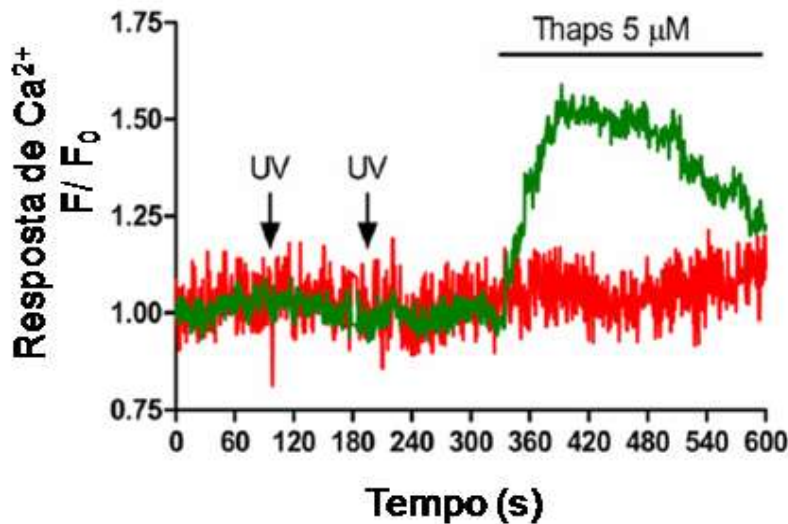


Gráfico de unidades arbitrárias de fluorescência ( $F/F_0$ ) por Tempo em segundos (s). Gráfico representativo de um eritrócito infectado (verde) e não infectado (vermelho) marcado com Fluo4-AM sem caged- $\text{IP}_3$ . Aplicação do pulso UV está indicada pelas setas. Adição de tapisigargina (Thaps)  $5 \mu\text{M}$  está evidenciada pela reta.

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

Para certificar que o eritrócito humano não mobiliza  $\text{Ca}^{2+}$  na presença do  $\text{IP}_3$ , excitamos eritrócitos não infectados marcados com Fluo 4-AM e caged- $\text{IP}_3$  com o pulso de luz UV. Na **figura 11** demonstramos que mesmo com a fotoliberação do  $\text{IP}_3$  com o UV, o eritrócito humano não foi capaz de mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$ . Este dado confirma que eritrócitos humanos não possuem um compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  sensível ao  $\text{IP}_3$ .

Os controles da **figura 10** e **11** indicam que a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela fotoliberação do  $\text{IP}_3$  em eritrócitos infectados tem origem exclusiva no parasita *P. falciparum*. Este é o primeiro trabalho a mostrar que *P. falciparum* no interior do eritrócito responde ao  $\text{IP}_3$  liberando  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares para o citossol.

**Figura 11-A** fotoliberação do IP<sub>3</sub> não mobiliza Ca<sup>2+</sup> em eritrócitos humanos marcados com caged-IP<sub>3</sub> e Fluo 4-AM.

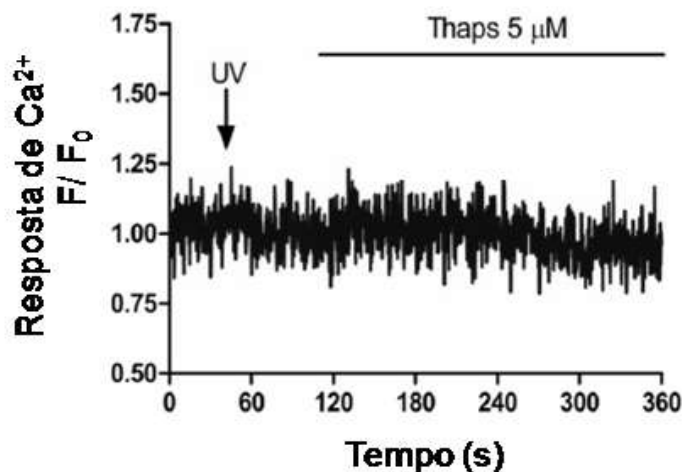


Gráfico de unidades arbitrárias de fluorescência (F/F<sub>0</sub>) por Tempo em segundos (s). Gráfico representativo de um eritrócito não infectado (vermelho) marcado com Fluo 4-AM e caged-IP<sub>3</sub>. Aplicação do pulso UV está indicada pelas setas. Adição de tapisigargina (Thaps) 5 µM está evidenciada pela reta.

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

#### 4.1.1.3 A liberação de IP<sub>3</sub> induz a mobilização de Ca<sup>2+</sup> em compartimentos sensíveis a tapisigargina em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíta

Passos et al. (1998) demonstraram que *P. chabaudi* isolados e permeabilizados no estágio de trofozoíta liberam Ca<sup>2+</sup> com a adição de IP<sub>3</sub>. A origem do Ca<sup>2+</sup> induzida pelo IP<sub>3</sub> provinha de dois compartimentos distintos: um sensível a tapisigargina (retículo endoplasmático) e um sensível a cloroquina (compartimentos ácidos).

Demonstrada a capacidade do *P. falciparum* em mobilizar Ca<sup>2+</sup> na presença de IP<sub>3</sub>, decidimos estudar a participação dos compartimentos sensível a tapisigargina e do compartimento ácido na resposta de Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub>.

A fim de caracterizar a sensibilidade dos estoques de Ca<sup>2+</sup> ao IP<sub>3</sub> em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio de trofozoíta, testamos a habilidade do IP<sub>3</sub> em mobilizar Ca<sup>2+</sup> após depletar seletivamente cada um destes dois compartimentos (**figura 12**).

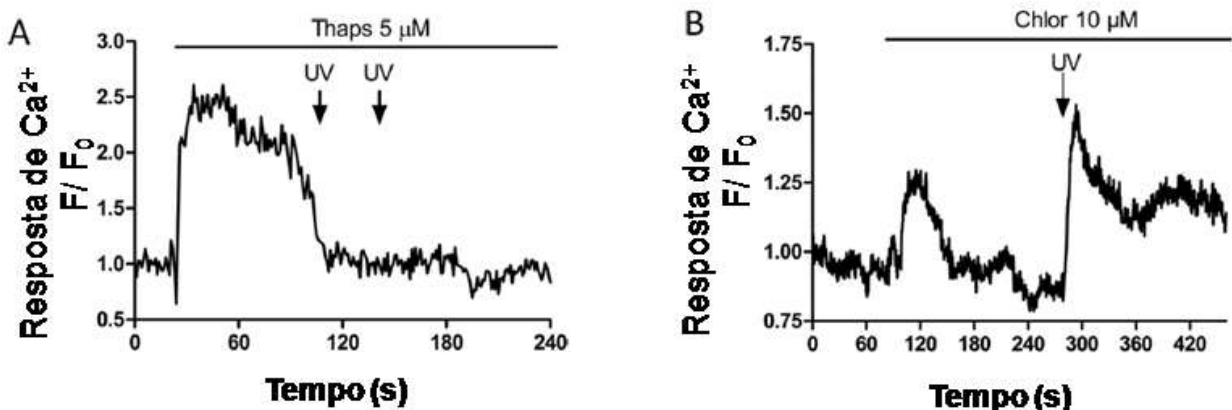
A capacidade dos compartimentos ácidos em armazenar Ca<sup>2+</sup> foi descrita em *Plasmodium* (Garcia et al., 1998; Gazarini et al., 2007; Passos et al., 1998), plantas (Ruiz et al., 2001) e *Trypanosoma* (Huang et al., 2012). Uma das ações da cloroquina em *Plasmodium*

é a alcalinização dos vacúolos ácidos e consequente extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  deste compartimento (Gazarini et al., 2007).

Após depletarmos os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do compartimento ácido em eritrócitos infectados marcados com caged-IP<sub>3</sub> e Fluo 4-AM com 10  $\mu\text{M}$  de cloroquina, estimulamos a fotoliberação do IP<sub>3</sub> (**figura 12 B**). Observamos que a depleção dos compartimentos ácidos não impediu o IP<sub>3</sub> de mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  no parasita.

Entretanto, quando depletamos o estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático (ER) com 5 $\mu\text{M}$  de tapsigargina (inibe a SERCA) o parasita perde a capacidade de mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de IP<sub>3</sub> (**figura 12 A**).

**Figura 12-**A liberação de IP<sub>3</sub> induz a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  em compartimentos sensíveis a tapsigargina em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíto.



Medição da fluorescência  $\text{Ca}^{2+}$  captada por microscopia confocal. Razão da intensidade de fluorescência (F/F<sub>0</sub>) foi plotado em função do tempo (segundos). Eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio de trofozoíto marcados com Fluo 4-AM e caged-IP<sub>3</sub>. Setas indicam o momento que o pulso UV causou fotoliberação do caged-IP<sub>3</sub>. **A:** Fotólise do caged-IP<sub>3</sub> após adição de 5 $\mu\text{M}$  de tapsigargina (Thaps). Gráfico representativo de 12 células de 3 experimentos distintos **B:** Fotólise do caged-IP<sub>3</sub> após adição de 10 $\mu\text{M}$  de cloroquina (Chlor). Gráfico representativo de 11 células em 3 experimentos distintos.

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

Este dado sugere que ER é o principal compartimento sensível ao IP<sub>3</sub> em *P. falciparum*. Diferente do observado em *P. berghei* no trabalho de Passos et al. (1998), o  $\text{Ca}^{2+}$  presentes nos compartimentos ácido em *P. falciparum* parece não participar da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelo IP<sub>3</sub>.

#### 4.1.1.4 Eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio esquizonte são insensíveis ao IP<sub>3</sub>

Demonstramos a capacidade do eritrócito infectado com *P. falciparum* no estágio de trofozoíto (aproximadamente 24 horas após a invasão) em mobilizar Ca<sup>2+</sup> na presença do IP<sub>3</sub>. Decidimos investigar a capacidade do IP<sub>3</sub> em mobilizar Ca<sup>2+</sup> em diferentes estágios do desenvolvimento intraeritrocítico do *P. falciparum*. Com esta finalidade, incubamos eritrócitos infectados com esquizonte (aproximadamente 38 horas após invasão) com Fluo 4-AM e caged-IP<sub>3</sub>.

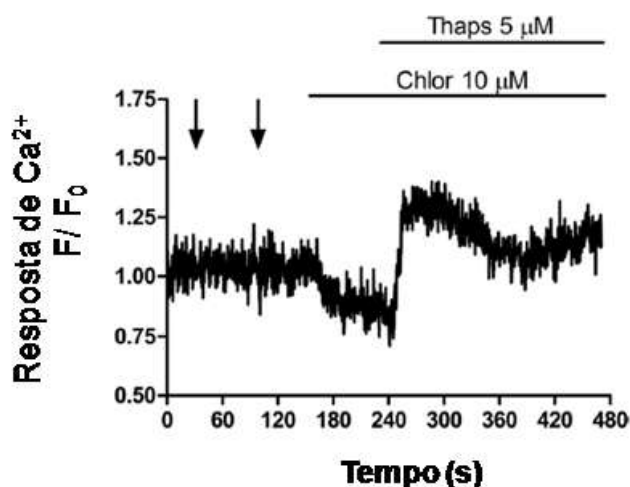
Na **figura 13** demonstramos que eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio esquizonte não foram capazes de mobilizar Ca<sup>2+</sup> na presença de IP<sub>3</sub>, entretanto a mobilização de Ca<sup>2+</sup> foi observada após a adição da tapsigargina o que sugere a integridade do retículo endoplasmático. Na **figura 12 A** demonstramos que o RE é o principal compartimento sensível ao IP<sub>3</sub> em trofozoítos.

Não observamos a liberação de Ca<sup>2+</sup> induzida pela cloroquina nestas células indicando que o Ca<sup>2+</sup> dos vacúolos ácidos não estava disponível para ser mobilizado.

Este dado demonstra a diferente sensibilidade ao IP<sub>3</sub> durante o ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum*.

Tentamos explorar a sensibilidade ao IP<sub>3</sub> do *P. falciparum* em outros estágios do desenvolvimento como anel, merozoíto e esquizonte seguímentado. Ao utilizarmos a objetiva de 40 x no confocal não foi possível apontar com clareza os parasitas no estágio de anel e merozoítos. O uso de uma objetiva maior (63x) que permite a melhor visualização dos parasitas nestes estágios concentra toda a energia do pulso de UV em uma área muito menor causando dano celular. O pulso de luz UV em uma objetiva 40x é suficiente para romper a membrana do eritrócito infectado com esquizontes seguímentados (a partir de 44 horas após a invasão). Devido a estas limitações técnicas, não conseguimos investigar a sensibilidade do *P. falciparum* em todos os estágios do desenvolvimento intraeritrocítico.

**Figura 13-** Eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio esquizonte são insensíveis ao  $IP_3$ .



Medição da fluorescência  $Ca^{2+}$  captada por microscopia confocal. Razão da intensidade de fluorescência ( $F/F_0$ ) foi plotado em função do tempo (segundos). Eritrócitos infectados por *P. falciparum* no estágio esquizonte marcado com Fluo4-AM e Caged- $IP_3$  excitado com dois pulsos de UV (indicado pelas setas) mais adição de  $10\mu M$  de Cloroquina (Chlor) e  $5\mu M$  de Tapsigargina (Thaps). Gráfico representativo de 12 células em 4 experimentos distintos.

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

#### 4.1.2A via de sinalização da melatonina inclui a geração do $IP_3$ em *P. falciparum*

##### 4.1.2.1 Melatonina causa mobilização transiente de $Ca^{2+}$ em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíto

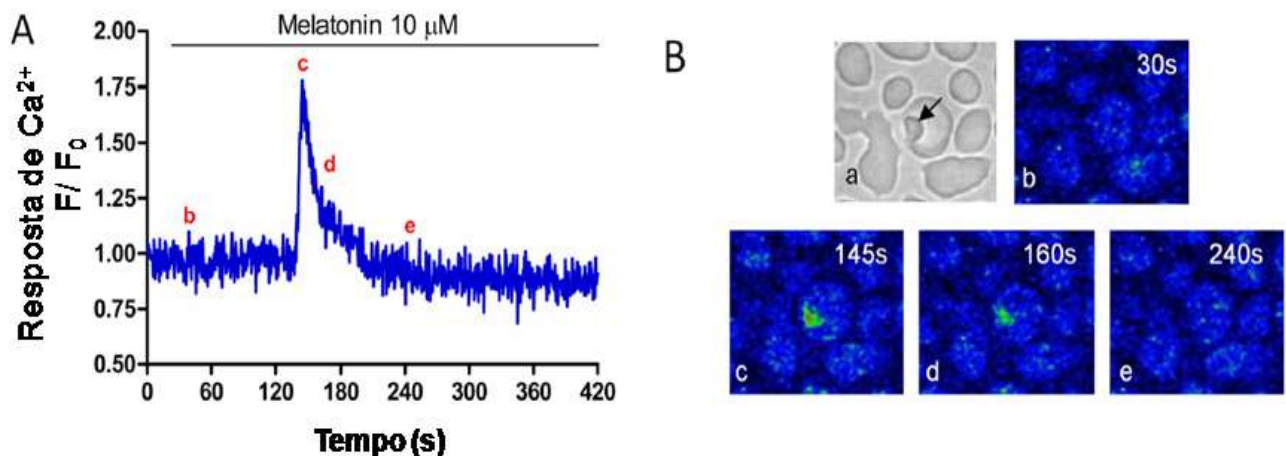
Hotta et al. (2000), ao explorarem as vias de sinalização ativada pela melatonina em *P. chabaudi* e *P. falciparum*, reportaram que este hormônio induz a liberação de  $Ca^{2+}$  citossólico nestes parasitas. A mobilização de  $Ca^{2+}$  induzida pela melatonina é abolida na presença da droga U73122 (inibidor da PLC) e luzindol (um antagonista de receptores de melatonina). Este trabalho forneceu a primeira evidência de que a melatonina atua por uma via de sinalização dependente de  $IP_3$  em *Plasmodium*.

Para estudar a natureza da mobilização de  $Ca^{2+}$  induzida pelo hormônio melatonina, observamos a dinâmica de  $Ca^{2+}$  em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíto tratados com melatonina usando o mesmo protocolo (marcação com Fluo 4-AM) e configurações no confocal utilizado para observar a resposta de  $Ca^{2+}$  induzida pela fotoliberação do  $IP_3$ .

Na **figura 14** observamos que a adição de 10  $\mu\text{M}$  de melatonina em um eritrócito infectado com *P. falciparum* causou um aumento transitente de  $\text{Ca}^{2+}$  similar ao padrão observado na resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela fotoliberação do  $\text{IP}_3$  (**Figura 9**). A resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  não ocorre imediatamente após a aplicação da melatonina, indicando que este agonista leva certo tempo até acessar o parasita no interior do eritrócito e ativar os processos de sinalização que culminam na liberação do  $\text{Ca}^{2+}$ . Na **figura 14 B** observamos que a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina está restrita ao parasita.

Na resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelo  $\text{IP}_3$  e melatonina observa-se um rápido aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico no parasita (**figura 9** e **figura 14**) seguida de uma queda gradual do  $\text{Ca}^{2+}$  citossólico que corresponde à captação gradual deste íon pelo RE.

**Figura 14-** Melatonina causa mobilização transitente de  $\text{Ca}^{2+}$  em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíto.



Em **A**: Gráfico representativo (Razão da intensidade de fluorescência ( $F/F_0$ ) vs tempo em segundos ) da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por 10 $\mu\text{M}$  de melatonina em eritrócito infectado por *P. falciparum* no estágio trofozoíto. Gráfico representativo de 12 células em 3 experimentos distintos. **B**: Imagens obtidas no confocal evidenciando a célula em diferentes momentos da medição: **a**- luz visível mostrando *P. falciparum* dentro do eritrócito, **b-d**: mudanças nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  são mostradas em pseudocores (azul para concentrações mais baixas e vermelho para  $[\text{Ca}^{2+}]$  mais altas), em **b**) linha basal ( $t=30\text{s}$ ), **c**) pico transitente na  $[\text{Ca}^{2+}]$  ( $t=145\text{s}$ ) e **d**) diminuição do pico de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $t=240\text{s}$ ) e **e**) o retorno a linha de base ( $t=150\text{s}$ ).

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

O retorno a linha basal indica que a maquinaria celular responsável pela homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  está funcional nas condições testadas neste protocolo.



#### 4.1.2.2 Tratamento com melatonina aumenta a concentração de inositol fosfatos em eritrócitos infectados com *P. falciparum*

Para testar a hipótese de que a melatonina é capaz de mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  através da via de sinalização PLC/IP<sub>3</sub> em *Plasmodium*, medimos diretamente os níveis dos fosfoinositóis (IP<sub>3</sub>/IP<sub>4</sub>) em parasitas tratados com melatonina. Para isto, eritrócitos infectados com *P. falciparum* foram incorporados com [H<sup>3</sup>]-mio-inositol como descrito no material e métodos.

O esquema da **figura 5** mostra a incorporação do inositol até a formação do PIP<sub>2</sub>, substrato da PLC para formação do IP<sub>3</sub> e DAG. Desta forma a incorporação do [H<sup>3</sup>]-mio-inositol é capaz de gerar o IP<sub>3</sub> marcado.

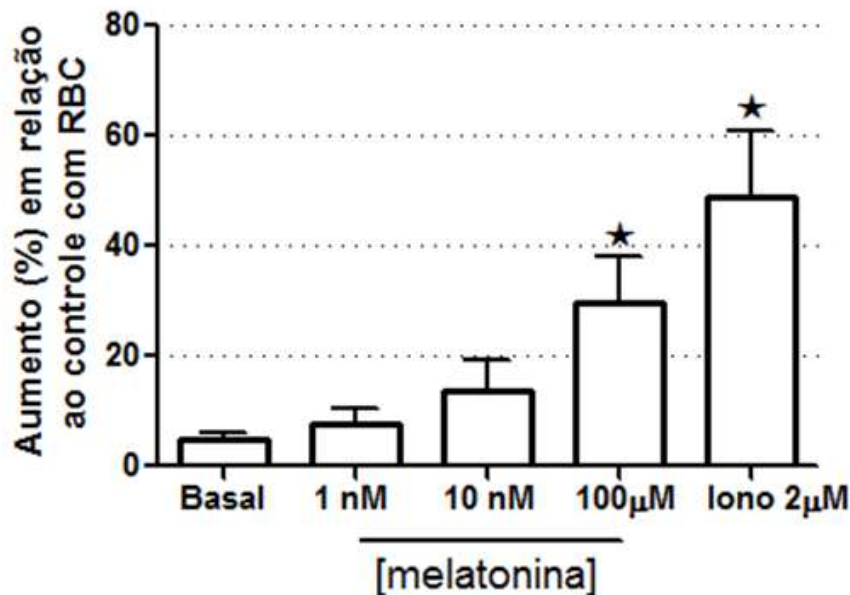
Elabbadi et al. (1994) demonstraram que a ionomicina (Iono), um ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , é capaz de aumentar os níveis de fosfoinositóis em *P. falciparum* incorporados com [H<sup>3</sup>]-mio-inositol. Desta forma, usamos o tratamento com ionomicina (2  $\mu\text{M}$ ) em parasitas incorporados com [H<sup>3</sup>]-mio-inositol como controle positivo para o aumento do IP<sub>3</sub>/IP<sub>4</sub>. Parasitas incorporados com [H<sup>3</sup>]-mio-inositol sem receber tratamento com ionomicina e melatonina foram usadas para medir as concentrações basais de inositol fosfato. A medição do inositol fosfato (IP<sub>3</sub>/IP<sub>4</sub>) foi induzida durante 20 minutos em diferentes concentrações de melatonina (1 nM, 10nM e 100  $\mu\text{M}$ ) (**figura 15**).

Os dados dos gráficos foram normatizados com os valores de inositol fosfato gerado por eritrócitos não infectados sem o tratamento com drogas. Esta normatização é importante para excluir os valores de inositol fosfato originado pela membrana do eritrócito.

A concentração 2  $\mu\text{M}$  de ionomicina causou um aumento do inositol fosfato (IP<sub>3</sub>/IP<sub>4</sub>) em  $49 \pm 20\%$  em relação ao controle basal ( $5 \pm 2\%$ ) que não recebeu tratamento. Melatonina 100  $\mu\text{M}$  foi capaz de induzir um aumento significativo de IP<sub>3</sub>/IP<sub>4</sub> em  $30 \pm 14\%$ . As concentrações de melatonina (1 nM e 10 nM) não conseguiram causar um aumento expressivo de IP<sub>3</sub>/IP<sub>4</sub> durante os 20 minutos de incubação porém os valores de inositois fosfatos estimulados nestas concentrações seguem uma tendência de aumento.

Esta é a primeira evidência direta de que o hormônio melatonina induz um aumento nas concentrações IP<sub>3</sub> em *Plasmodium*. Desta forma, corroboramos com a hipótese de que a melatonin é capaz de ativar uma PLC e consequente produção de IP<sub>3</sub> em *Plasmodium*.

**Figura 15**-Aumento na formação de fosfoinosítois induzido por melatonina em eritrócitos infectados com *P. falciparum*.



Concentração de melatonina (1nM, 10 nM e 100μM; 20 minutos) e ionomicina ( 2μM; 20 minutos). Basal representa o controle com eritrócitos infectados sem tratamento. Dados apresentados com média +/- desvio padrão de 3 experimentos independentes, cada um contendo triplicata. (★p<0.05). Os valores foram normalizados com o valor de incorporação do [H<sup>3</sup>]-mio-inositol de eritrócitos (RBC) não infetados.

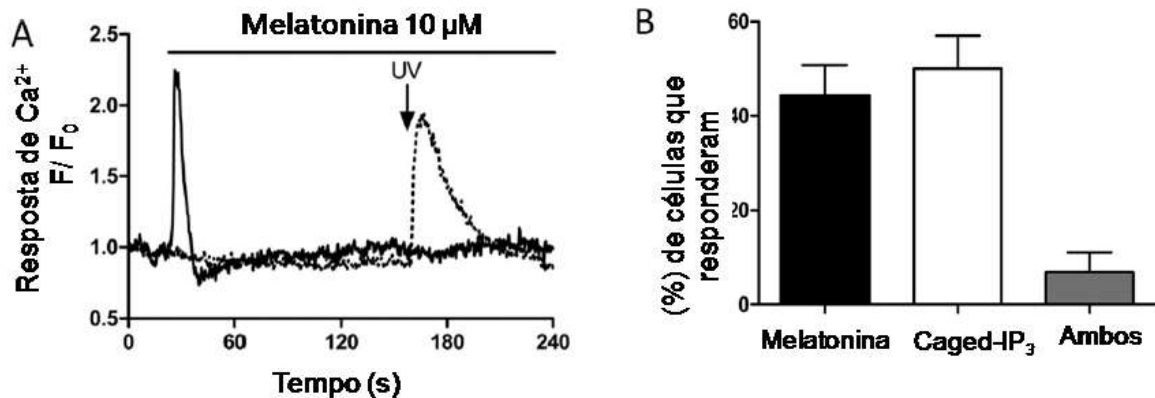
Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

#### 4.1.2.3 Pré-tratamento de melatonina previne a indução de Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub> em eritrócitos infectados por *P. falciparum*

Após demonstrarmos que a melatonina gera um aumentadas concentrações de IP<sub>3</sub>/IP<sub>4</sub> em *P. falciparum*, decidimos estudar o comportamento da mobilização de Ca<sup>2+</sup> em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíta na presença destes dois estímulos. Com este objetivo, testamos a capacidade do *P. falciparum* de mobilizar Ca<sup>2+</sup> com a fotólise do caged-IP<sub>3</sub> após submeter os parasitas a uma dose de 10 μM de melatonina.

Na **figura 16**, observamos que a maior parte dos eritrócitos infectados foi capaz de mobilizar Ca<sup>2+</sup> em apenas um dos estímulos (melatonina / IP<sub>3</sub>) aplicados. A maior parte das células que não mobilizaram Ca<sup>2+</sup> na presença de melatonina conseguiu mobilizar este íon na presença do IP<sub>3</sub>.

**Figura 16**-Aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por  $\text{IP}_3$  é abolido após o estímulo com melatonina.



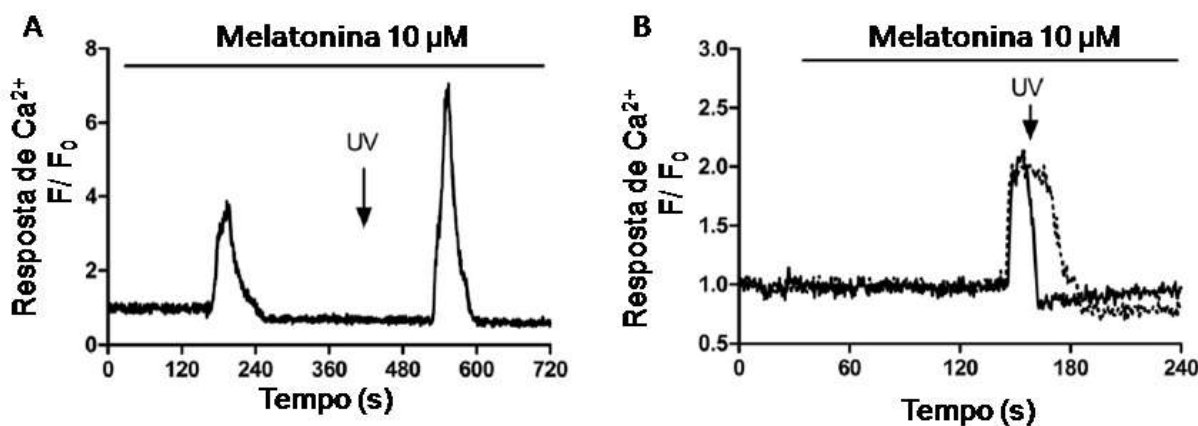
Eritrócitos infectados com Fluo4-AM e caged- $\text{IP}_3$  foram estimulados com melatonina ( $10 \mu\text{M}$ ) seguido da fotoliberação do  $\text{IP}_3$ . **A**: gráfico representativo de células em um mesmo experimento respondendo a melatonina (linha sólida) e ao  $\text{IP}_3$  (linha pontilhada). Resultados similares foram obtidos em 5 experimentos distintos, total de 54 células analisadas. **B**: Porcentagem de células que responderam a melatonina ( $10 \mu\text{M}$ ), fotólise do caged- $\text{IP}_3$  e ambos os estímulos (média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos).

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

O gráfico da **figura 16 B** revela que no total de células analisadas (54 eritrócitos infectados em 5 experimentos distintos), menos de 5% conseguiram liberar  $\text{Ca}^{2+}$  de forma transiente com a indução da melatonina e do  $\text{IP}_3$ . A **figura 17 A** revela o padrão de resposta de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  nos eritrócitos infectados que responderam a ambos os estímulos. Interessante observar que células que mobilizaram  $\text{Ca}^{2+}$  com melatonina não foram capazes de liberar prontamente o  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de  $\text{IP}_3$ . Estes dados sugerem uma convergência na via de sinalização induzida pela melatonina e pelo  $\text{IP}_3$ .

Verificamos se a liberação adicional de  $\text{IP}_3$  é capaz de potencializar a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina, para isto acionamos o pulso de luz UV durante a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada pela melatonina em eritrócitos infectados marcados com Fluo 4-AM e caged- $\text{IP}_3$ . A fotoliberação do  $\text{IP}_3$  não causou um aumento da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina (**Figura 17 B**). Este dado sugere que as concentrações de  $\text{IP}_3$  estimuladas pela melatonina são suficientes para saturar os receptores de  $\text{IP}_3$  em *Plasmodium*, assim a presença adicional de  $\text{IP}_3$  originada da fotólise do caged- $\text{IP}_3$  não consegue potencializar a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma do parasita.

**Figura 17-** Fotoliberação do IP<sub>3</sub> não potencializa a mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida pela melatonina.



Eritrócitos infectados com Fluo4-AM e caged-IP<sub>3</sub> foram estimulados com melatonina (10 μM) seguido da fotoliberação do IP<sub>3</sub>. **A:** gráfico representativo de células em um mesmo experimento respondendo a melatonina (linha sólida) e ao IP<sub>3</sub> (linha pontilhada). Resultados similares foram obtidos em 5 experimentos distintos, total de 54 células analisadas. **B:** Porcentagem de células que responderam a melatonina (10 μM), fotólise do caged-IP<sub>3</sub> e ambos os estímulos (média ± desvio padrão de 5 experimentos).

Fonte: Adaptado de Alves et al. (2010).

### 4.1.3 Transfecção epissomal com moduladores e sensores de IP<sub>3</sub> em *Plasmodium falciparum*

#### 4.1.3.1 Construção do plasmídeo IP<sub>3</sub>-esponja-pARL

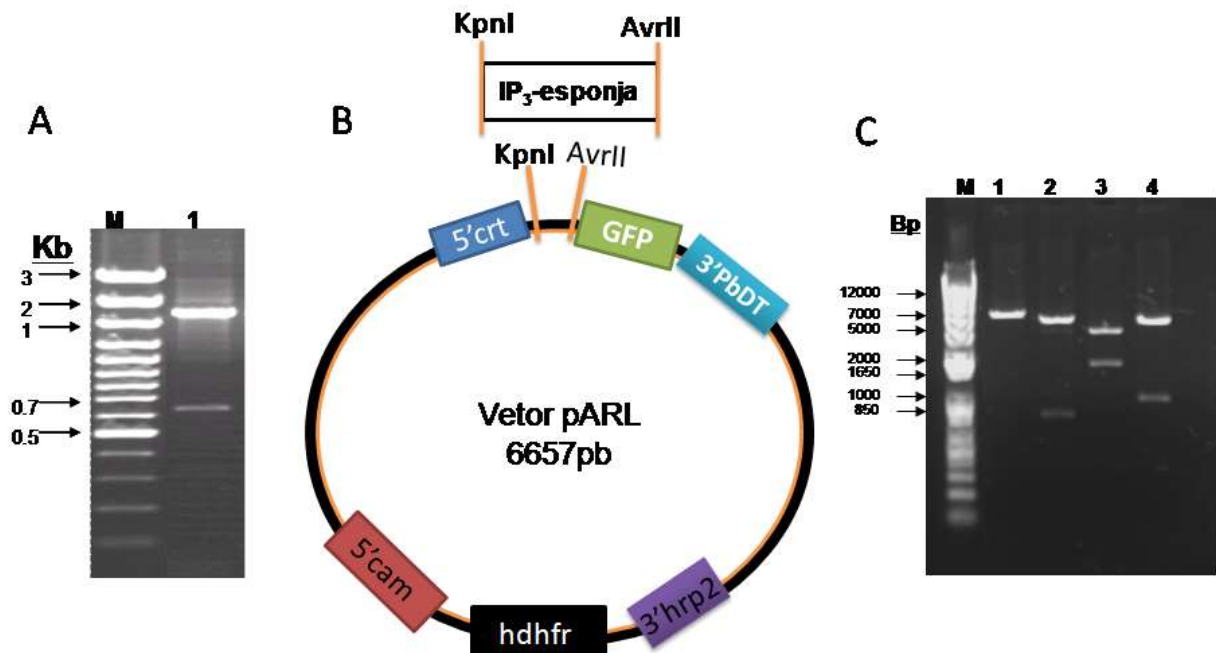
O IP<sub>3</sub> esponja é um peptídeo de 380 aminoácidos derivado do sítio de ligação do receptor de IP<sub>3</sub> do tipo I de camundongos (Uchiyama et al., 2002) e possui a capacidade de se ligar ao IP<sub>3</sub> atuando assim como um tampão de IP<sub>3</sub> celular. Usui-Aoki et al. (2005) com o uso do IP<sub>3</sub> esponja e RNA de interferência (RNAi) conseguiram dessensibilizar a percepção do sabor doce em drosófilas indicando que as células gustativas deste inseto usam esta via dependente de IP<sub>3</sub> para percepção de alimentos doces.

Com a finalidade de expressar a proteína IP<sub>3</sub>-esponja em *P. falciparum* de forma epissomal (sem incorporar no genoma), removemos o IP<sub>3</sub>-esponja no vetor GST-m49&m30/pGEX-2t (Uchiyama et al., 2002) como descrito no material e métodos e inserimos no vetor de *Plasmodium* com expressão constitutiva denominado pARL (Struck et al., 2005).

A amplificação do domínio de ligação do IP<sub>3</sub>-esponja resulta em um fragmento de 1143 pb. O fragmento do domínio de ligação do IP<sub>3</sub>-esponja é flanqueado pelos sítios de restrição KpnI/AvrII. A amplificação em PCR revelou uma forte banda de tamanho esperado (aproximadamente 1100 pb) e outra inesperada (aproximadamente 600 pb) que não foi usada na para montagem do plasmídeo IP<sub>3</sub>-esponja-pARL (**figura 18A**).

O vetor pARL foi digerido pelas enzimas de restrição KpnI/AvrII para receber o domínio IP<sub>3</sub>-esponja. Após uma reação usando ligase, os fragmentos IP<sub>3</sub>-esponja amplificado e o vetor pARL digerido resultaram em um plasmídeo IP<sub>3</sub>-esponja-pARL (7788 pb), esquema na **figura 18 B**. A integridade do plasmídeo foi primeiramente verificada por múltiplas digestões (**Figura 18 C**) e posterior confirmação com sequenciamento.

**Figura 18**-Estratégia e construção do plasmídeo IP<sub>3</sub>-esponja-pARL.



Em **A**: Gel de agarose 1% mostrando a amplificação em PCR do domínio de ligação do IP<sub>3</sub>-esponja. Coluna M= Middle range DNA Marker (*ladder* usado); coluna 1= banda forte de tamanho esperado (aproximadamente 1143 pb) e uma banda inespecífica entre 600 e 700 pb. **B**: esquema do vetor pARL (6657 pb) indicando a região onde as enzimas de restrição KpnI e AvrII clivarão o plasmídeo para receber o inserto IP<sub>3</sub>-esponja. 5'crt (região promotora do transportador resistente a cloroquina); 3'PbDT (região terminadora do gene diifolato redutase em *P. berghei*), 5'cam (região promotora da do gene expressa calmodulina), hdhfr (gene humano para diifolato redutase) e 3'hrp2 (região terminadora do gene que expressa antígeno rico em histidina 2). **C**: Gel de agarose 1% mostrando múltipla digestão da construção pARL-IP<sub>3</sub>-esponja. Coluna M: 1Kb Plus DNA Ladder; coluna 1: digestão com KpnI que cliva que lineariza a construção (7788 pb); coluna 2: digestão AvrII/NotI que liberando o promotor crt da construção pARL-IP<sub>3</sub>-esponja (812 pb e 6976 pb); coluna 3: KpnI/XhoI liberando IP<sub>3</sub>-esponja mais GFP da construção (1869 pb e 5919 pb); coluna 4: KpnI/AvrII liberando o IP<sub>3</sub>-esponja da construção (1143pb e 6645 pb). DNA marcado com brometo de etídio.

#### 4.1.3.2 Construção do plasmídeo IRIS-pARL

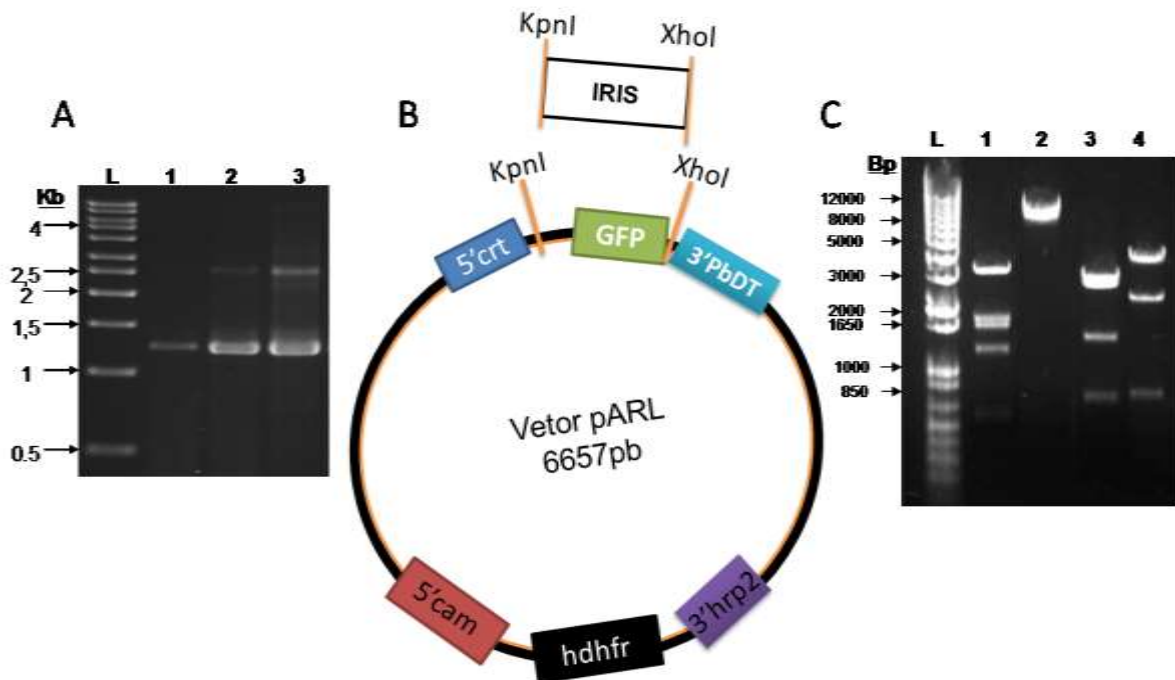
O sensor de IP<sub>3</sub> denominado IRIS é derivado do sítio de ligação do receptor de IP<sub>3</sub> do tipo I de camundongos, entretanto se liga com menor afinidade ao IP<sub>3</sub> comparado ao IP<sub>3</sub> esponja sendo usado como um sensor de IP<sub>3</sub> celular graças à inserção de duas proteínas fluorescente (Venus e ECFP) (Matsu-ura et al., 2006). Este mesmo grupo monitorou a dinâmica da formação e degradação do IP<sub>3</sub> em células HeLa expressando IRIS na presença do agonista glutamato.

Na tentativa de expressar epissomalmente o sensor de IP<sub>3</sub> denominado IRIS em *P. falciparum*, amplificamos o domínio IRIS do vetor IRIS-1 His-pcDNA3.1 zeo(+) (Matsu-ura et al., 2006) como descrito nos material e métodos.

A **figura 19 A** mostra o resultado da amplificação em PCR, testadas em diferentes condições de temperatura de anelamento, do domínio IRIS (2501 pb). A amplificação resultou em um fragmento de tamanho esperado de aproximadamente 2500 pb e um fragmento inesperado (amplificação inespecífica) com 1250 pb. Com a amplificação, o fragmento do domínio de ligação do IRIS passou a ser flanqueado pelos sítios KpnI/XhoI (**figura 19 B**).

Digerimos o vetor pARL com as enzimas de restrição KpnI/XhoI para receber o domínio IRIS. Após uma reação com ligase contendo o vetor pARL digerido com o IRIS amplificado, o plasmídeo IRIS-pARL (8432 pb) foi finalmente obtido. O plasmídeo IRIS-pARL foi primeiramente verificado por múltiplas digestões (**figura 19 C**) e posterior confirmação com sequenciamento.

**Figura 19**-Estratégia e construção do plasmídeo IRIS-pARL.



Em **A**: Gel de agarose 1% mostrando a amplificação em PCR do domínio de ligação do IRIS. Coluna L= 500 pb DNA Ladder; coluna 1, 2 e 3: diferentes condições de anelamento no PCR, o tamanho esperado de 2501 pb aparecem nas colunas 2 e 3. **B**: esquema do vetor pARL (6657 pb) indicando a região onde as enzimas de restrição KpnI e XhoI clivarão o plasmídeo para receber o inserto IRIS. 5'crt (região promotora do transportador resistente a cloroquina); 3'PbDT (região terminadora do gene diifolato redutase em *P. berghei*), 5'cam (região promotora da do gene expressa calmodulina), hdhfr (gene humano para diifolato redutase) e 3'hrp2 (região terminadora do gene que expressa antígeno rico em histidina 2). **C**: Multipla digestão da construção IRIS-pARL. Coluna L: 1Kb Plus DNA Ladder; coluna 1: DraI que digere a construção em 4 fragmentos (3493 pb, 1780pb, 1659pb, 1500pb), todos com tamanho esperado; coluna 2: HindIII que lineariza a construção (8432 pb); coluna 3: SmaI que cliva a construção em 4 fragmentos (3120, 3050, 1580 e 682 pb); coluna 4: BglII que cliva a construção em 3 fragmentos (4916, 2804 e 712pb). Usado gel de agarose 1% e DNA marcado com brometo de etídio.

#### 4.1.3.3 Transfecção epissomal com as construções IP<sub>3</sub>-esponja e IRIS-pARL

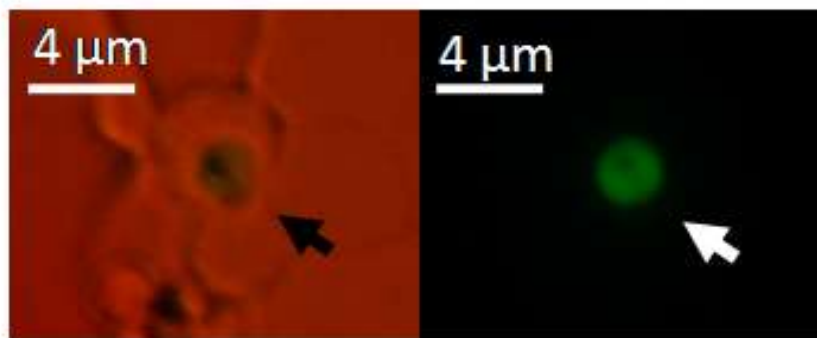
Confirmada a integridade das construções IP<sub>3</sub>-esponja-pARL e IRIS-pARL, iniciamos a transfecção epissomal em *P. falciparum* (cepa Dd2) no estágio de anel seguindo as recomendações de Fidock et al. (1998). Parasitas transfectados com o vetor pARL com GFP sem IP<sub>3</sub>-esponja e IRIS foram usados como controle.

Adicionamos a droga de seleção para o vetor pARL, a WR99210, 24 horas após a transfecção em culturas de *P. falciparum* com pARL (contém GFP), IP<sub>3</sub>-esponja-pARL e IRIS-pARL. O meio de cultura completo contendo WR99210 foi trocado diariamente e a

parasitemia da cultura foi monitorada diariamente a partir do décimo quarto dia após a transfeção.

Após 30 dias com a constante pressão seletiva da WR99210 não encontramos parasitas em culturas transfectadas com IP<sub>3</sub>-esponja-pARL ou com IRIS-pARL. Entretanto, 21 dias após a data de transfeção, foram observados parasitas na cultura transfectada com o vetor pARL (**figura 20**).

**Figura 20-** Eritrócito infectado com *Plasmodium falciparum* transfectado com vetor pARL GFP.



À esquerda, uma fotografia com luz visível, a seta preta indica a localização do eritrócito infectado. À direita, o mesmo eritrócito parasitado excitado com feixe de luz 488nm, evidenciado pela seta branca. Fotografias foram realizadas com câmera fotográfica digital acoplada a um microscópio de fluorescência. Objetiva 40 vezes. Traço branco indica escala em µm.

A técnica de transfeção funcionou uma vez que parasitas transfectados com o vetor pARL foram selecionados pela droga de seleção WR99210 e apresentam a expressão da GFP. Este dado indica que a mortalidade da cultura transfectada com as construções IP<sub>3</sub>-esponja-pARL e IRIS-pARL não está relacionada ao protocolo de transfeção e nem ao vetor pARL utilizado.

Estes dados sugerem que a modulação do IP<sub>3</sub> com a proteína IP<sub>3</sub>-esponja e o uso do sensor IRIS, que também é capaz de se ligar ao IP<sub>3</sub>, impedem a viabilidade do parasita *P. falciparum* no estágio intraeritrocítico.



#### 4.1.4 Busca pelo receptor de IP<sub>3</sub> em *P. falciparum*

##### 4.1.4.1 Coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub>

Na busca por candidatos ao receptor de IP<sub>3</sub> em *P. falciparum*, utilizamos uma coluna de afinidade ao IP<sub>3</sub> proposta por Hirata et al. (1990). Os extratos de proteínas (2,5 mg) de fígado de camundongo e de *P. falciparum* desincronizados e isolados do eritrócito foram adicionadas nas colunas de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> como descrito no material e métodos.

A coluna que utilizamos é formada por uma matriz de sefarose associada à estreptavidina, esta última é capaz de se ligar na biotina que está ligada ao IP<sub>3</sub>.

A coluna formada pela sefarose-estreptavidina-biotina-IP<sub>3</sub> que recebeu o extrato de fígado foi denominada “controle positivo”, uma vez que fígado de camundongos é um órgão rico em receptores de IP<sub>3</sub> (Mikoshiba, 2007). Este controle é importante para testar se a coluna usada neste trabalho é capaz de resgatar proteínas que se ligam ao IP<sub>3</sub>, o que inclui o receptor de IP<sub>3</sub>. Em camundongo, as proteínas que participam da via de sinalização e metabolismo do IP<sub>3</sub> já estão bem caracterizadas.

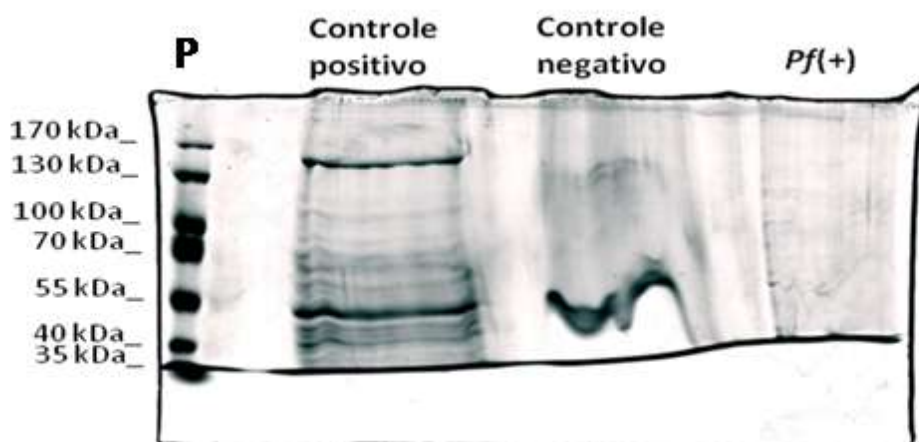
A coluna contendo apenas sefarose-estreptavidina que recebeu o extrato de *P. falciparum* foi denominada “controle negativo”. Este controle é necessário para apontar as proteínas de *P. falciparum* que se ligam na matriz de sefarose-estreptavidina independentemente da presença do IP<sub>3</sub> mesmo após os passos de lavagem.

A coluna contendo sefarose-estreptavidina-biotina-IP<sub>3</sub> que recebeu o extrato de proteínas de *P. falciparum* recebeu o nome de Pf(+). Esta é a coluna que utilizamos para resgatar e identificar as proteínas de *P. falciparum* que se ligam ao IP<sub>3</sub>.

A presença constante do LiCl nos tampões de lavagem e eluição (ver materiais e métodos) é importante para inibir a degradação do IP<sub>3</sub> presente na coluna.

Após a eluição das amostras da coluna, aplicamos as proteínas em um gel de poliacrilamida para verificar a presença das bandas (**figura 21**).

**Figura 21**-Proteínas eluidas da coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub>.



Gel de poliacrilamida 8% corado com Colloidal Blue Staining. Coluna P: usado “PageRuler Prestained Protein Ladder” da Thermo scientific. O tamanho das bandas estão indicadas em kDa. Controle positivo: extrato de proteínas de fígado de camundongo. Controle negativo: extato de proteínas de *P. falciparum* na coluna de sefarose sem IP<sub>3</sub>. Pf(+): extato de proteínas de *P. falciparum* na coluna de sefarose com IP<sub>3</sub>.

Foram obtidas bandas em todas as colunas. Devido à alta concentração de sal (guanidina) presente no tampão de eluição as amostras não correram de forma uniforme. Todo o gel foi cortado em seções e enviado para análise no espectômetro de massa (Taplin Mass Spectrometry) para a identificação das proteínas.

No controle positivo (coluna que recebeu o extrato com fígado de camundongo) foram identificadas 1549 proteínas. A coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> conseguiu ligar proteínas importantes para via de sinalização PLC/ IP<sub>3</sub> (**Tabela 1**).

A coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> conseguiu resgatar os receptores de IP<sub>3</sub> (tipo I e III) e uma PLC $\delta$ . Todas estas proteínas apresentaram ao menos 3 peptídeos exclusivos indentificados no massa. Levando em consideração a sensibilidade de detecção do equipamento, qualquer proteína que apresenta ao menos 3 peptídeos exclusivos não necessita de validação para confirmar sua presença na amostra.

**Tabela1**-Proteínas importantes para via de sinalização PLC/ IP<sub>3</sub> identificadas no controle positivo contendo extrato de proteína de fígado de *Mus musculus*.

Número da proteína	Código da proteína no NCBI	Nome	Peso molecular kDa	Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?
1	Gpld1	Fosfolipase D	93,6	Sim (3)
2	Itpr1	Receptor de IP <sub>3</sub> tipo 1	313,3	Sim (14)
3	Itpr3	Receptor de IP <sub>3</sub> tipo 1	304,3	Sim (10)

Foram identificadas 494 proteínas no controle negativo (extrato de proteína de *P. falciparum* na coluna sem biotina-IP<sub>3</sub>) e 700 proteínas no grupo Pf(+) (extrato de proteína de *P. falciparum* na coluna com biotina-IP<sub>3</sub>). Na busca no candidato ao receptor de IP<sub>3</sub> em *P. falciparum*, excluímos todas as proteínas em comum do controle negativo com Pf(+).

Das 206 proteínas exclusivas ao grupo Pf(+), consideramos que para uma proteína ser candidato ao receptor de IP<sub>3</sub>, esta deve apresentar ao menos um domínio transmembrânico para acoplar a uma membrana.

Para detectarmos a presença de um domínio transmembrânico, a sequência de aminoácidos das 206 proteínas de *P. falciparum* exclusivas na coluna Pf(+) foram analisadas pelo programa HMMTOP versão 2.0 ([www.enzim.hu/hmmtop/](http://www.enzim.hu/hmmtop/)) que prediz o número de domínios transmembrânicos em uma sequência de peptídeo/proteína. Das 206 proteínas analisadas pelo programa HMMTOP, apenas 51 proteínas apresentaram ao menos um domínio transmembrânico (**tabela 2**).

**Tabela 2** – Lista de proteínas de *P. falciparum* exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico.

(continua)

Número da proteína	Número de Acesso PlasmodB	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Domínios Transmembrânicos preditos	Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?
1	PF3D7_1035300	Proteína rica em glutamato (GLURP)	141	2	Sim (3)
2	PF3D7_1001500	Proteína de membrana transcrita em fase jovem10.1 (ETRAMP10)	11,2	2	Não (1)
3	PF3D7_0501300	Proteína tipo 1 liga ao citoesqueleto (SBP1)	36,2	1	Não (1)
4	PFIT_1134100	Antígeno 1 apical de membrana	72	1	Não (2)
5	PF3D7_0822800	Proteína específica da U5 smpU5, putativo	37	1	Não (2)
6	PF3D7_0827900	Proteína disulfeto isometase (PDI8)	55,5	1	Não (1)
7	PF3D7_0918000	Proteína 50 associado ao glideossomo. Fosfatase ácida secretada (GAP50)	44,6	1	Não (1)

**Tabela 2** – Lista de proteínas de *P. falciparum* exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico.

(continuação)

Número da proteína	Número de Acesso PlasmodB	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Domínios Transmembrânicos preditos	Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?
8	PF3D7_1364100	Proteína de superfície rica em Cisteína (Pf92)	92,7	1	Sim (4)
9	PF3D7_0523000	Proteína de resistência a multidrogas (MDR1)	162,2	11	Não (1)
10	PF3D7_0302200	Proteína asexual 3.2 associado à citoaderência (CLAG3.2)	167,4	2	Não (2)
11	PF3D7_0202500	Proteína 2de membrane de transcrição precoce (ETRAPM2)	11,5	2	Não (2)
12	PF3D7_1238800	Acetil CoA sintase (ACS11)	92	1	Sim (12)
13	PF3D7_0817500	Proteína parecida com inibidor de quinase C, putativo	21,1	1	Não (2)
14	PF3D7_0402100	Proteína de Plasmodium exportada (PHISTb), função desconhecida	67,7	1	Não (2)

**Tabela 2** –Lista de proteínas exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico (continuação)

<b>Número da proteína</b>	<b>Número de Acesso PlasmodB</b>	<b>Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada</b>	<b>Peso Molecular da Proteína (kDa)</b>	<b>Domínios Transmembrânicos preditos</b>	<b>Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?</b>
15	PF3D7_0401800	Proteína de Plasmodium exportada (PHISTb), função desconhecida (PfD80)	60,2	1	Sim (4)
16	PF3D7_0104200	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	53,6	1	Sim (4)
17	PF3D7_0919400	Proteínas disulfeto isomerase (PD19)	61	1	Sim (3)
18	PF3D7_0912400	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	52,7	1	Sim (3)
19	PF3D7_0902800	Antígeno 9 com repetições em serina (SERA9)	105,5	1	Sim (5)
20	PF3D7_0501200	Proteína de Plasmodium em superfície de eritrócito (PIESP2)	48,7	2	Sim (3)
21	PF3D7_0501100.1	Proteína 40 “Heat shock” tipo II (HSP40)	46,3	1	Sim (3)

**Tabela 2** –Lista de proteínas de *P. falciparum* exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico.

(continuação)

<b>Número da proteína</b>	<b>Número de Acesso PlasmodB</b>	<b>Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada</b>	<b>Peso Molecular da Proteína (kDa)</b>	<b>Domínios Transmembrânicos preditos</b>	<b>Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?</b>
22	PF3D7_0500800	Antígeno de parasita maduro na superfície de eritrócitos (MESA)	168,2	1	Não (1)
23	PF3D7_1252100	Proteína 3 do anel da rópria (RON3)	263,1	4	Sim (3)
24	PF3D7_1249100	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	44,8	1	Sim (4)
25	PF3D7_1237700	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	23,6	5	Não (2)
26	PF3D7_1212700	Fator 3 subunidade 10 de iniciação de tradução em eucariotos, putativo	166	1	Não (1)
27	PF3D7_1205600	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	39	2	Sim (9)
28	PF3D7_0801800	Manose-6-fosfato isomerase, putativa	117,6	2	Não (1)

**Tabela 2** –Lista de proteínas de *P. falciparum* exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico.

(continuação)

<b>Número da proteína</b>	<b>Número de Acesso PlasmodB</b>	<b>Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada</b>	<b>Peso Molecular da Proteína (kDa)</b>	<b>Domínios Transmembrânicos preditos</b>	<b>Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?</b>
29	PF3D7_0828900	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	21	2	Não (1)
30	PF3D7_0829200	Proibitina, putativo	30,5	1	Sim (3)
31	PF3D7_0731300	Proteína de Plasmodium exportada (PHISTb), função desconhecida (PfG174)	37,7	1	Sim (3)
32	PF3D7_0702500	Proteína de Plasmodium exportada, função desconhecida	27,6	1	Não (1)
33	PF3D7_1345100	Tioredoxina 2 (TRX2)	18,6	1	Sim (3)
34	PF3D7_1344800	Aspartato carbamoiltransferase (atcasE)	43,2	1	Não (2)
35	PF3D7_1332600	Apurina/apirimidina c endonuclease Apn1, putative (APN1)	69,7	1	Não (1)



**Tabela 2** – Lista de proteínas de *P. falciparum* exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico.

(continuação)

<b>Número da proteína</b>	<b>Número de Acesso PlasmodB</b>	<b>Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada</b>	<b>Peso Molecular da Proteína (kDa)</b>	<b>Domínios Transmembrânicos preditos</b>	<b>Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?</b>
36	PF3D7_1325100	Fosforibosilpirofosfato sintase	49,3	1	Não (1)
37	PF3D7_1321700	Fator de splicing, putativo	100,9	1	Não (1)
38	PF3D7_1149000	Antígeno 332, proteína DBL, (Pf332)	689,2	2	Não (2)
39	PF3D7_1132300	Proteína que liga ao ácido nucléico, putativa	31,7	1	Não (1)
40	PF3D7_1116000	Proteína anel de rópria 4 (RON4)	135,7	1	Sim (3)
41	PF3D7_1105600	Componente PTEX88 translocon (PTEX88)	90,7	2	Sim (7)
42	PBANKA_094160	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	83,8	1	Não (1)

**Tabela 2** – Lista de proteínas de *P. falciparum* exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico.

(continuação)

Número da proteína	Número de Acesso PlasmodB	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Peso Molecular da Proteína (kDa)	Domínios Transmembrânicos preditos	Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?
43	PF3D7_1038000.1	Antígeno UB05	13,7	2	Sim (4)
44	PBANKA_110850	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	297,8	1	Não (1)
45	PF3D7_1033700	Proteína bromodomínio, putativa	53,9	2	Não (1)
46	PF3D7_1016900	Proteína de membrana de expressão precoce 10.3 (ETRAPM 10.3)	11,9	2	Sim (5)
47	PF3D7_1002100	Proteína PF70 (PF70)	68,9	3	Não (1)
48	PF3D7_1476600	Proteína de Plasmodium exportada, função desconhecida	110,9	1	Não (1)
49	PF3D7_1458100	Proteína conservada em Plasmodium, função desconhecida	6,8	1	Não (1)

**Tabela 2** – Lista de proteínas de *P. falciparum* exclusivas a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> que contém ao menos um domínio transmembrânico.

(conclusão)

<b>Número da proteína</b>	<b>Número de Acesso PlasmodB</b>	<b>Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada</b>	<b>Peso Molecular da Proteína (kDa)</b>	<b>Domínios Transmembrânicos preditos</b>	<b>Ao menos 3 Peptídeos exclusivos encontrados? Quantos?</b>
50	PF3D7_1439800	Proteína de membrana associada à vesícula, putativo	26,7	1	Não (1)
51	PF3D7_0508000	Proteína 6- cisteína (P38)	40,5	2	Não (1)

Com a coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> conseguimos identificar 51 proteínas de *P. falciparum* capazes de se ligar especificamente ao IP<sub>3</sub>-biotina e que apresenta ao menos um domínio transmembrânico.

Infelizmente, não temos um modelo de referência para um receptor de IP<sub>3</sub> em plantas terrestres ou em Apicomplexa o que faz com que a posterior triagem destes 51 candidatos baseando em características estruturais seja um processo arriscado e complicado. Entretanto, este trabalho é importante para selecionar potenciais proteínas que interagem com IP<sub>3</sub> em *Plasmodium*, permitindo focar esforços na busca deste receptor em um número limitado de proteínas. Interessante ressaltar que a maior parte dos 51 potenciais candidatos ao receptor de IP<sub>3</sub> revelados em nossa coluna ainda não possui uma função caracterizada.

## 4.2 Papel da heme oxigenase em *P. falciparum*

O parasita possui um mecanismo classicamente conhecido para lidar com a heme, um produto tóxico da digestão da hemoglobina: a formação de hemozoína (Kumar et al., 2007). Em mamíferos a principal via de degradação da heme é a degradação em biliverdina (BV), catalisada pela enzima heme oxigenase (HO) (Docherty et al., 1984).

Okada (2009) reportou a existência de uma HO em *P. falciparum* (*PfHO*) capaz de converter heme em bilirrubina, entretanto a existência desta via de detoxificação neste parasita não é um consenso na literatura (Kumar et al., 2008; Sigala et al., 2012). Para compreender a função da *PfHO*, exploramos *in vitro* a sua capacidade em converter biliverdina em bilirubina (BR) e sua modulação na presença de metaloprotoporfirinas (moduladores clássicos da HO em mamíferos e inibidores da formação da hemozoína). Considerando a importância da via de detoxificação da heme, testamos o potencial antimalárico das metaloprotoporfirinas em cultura de *P. falciparum* além de explorar o potencial da heme, BV e BR em modular o ciclo deste parasita.

### 4.2.1 Explorando a atividade Biliverdina Redutase da *PfHO*

#### 4.2.1.1 Expressão e purificação da *P. falciparum* heme oxigenase recombinante (*PfHO*)

Okada (2009) e Sartorello et al. (2010) reportaram a capacidade da *PfHO* em converter heme em biliverdina, entretanto esta atividade foi contestada no trabalho de Sigala et al. (2012).

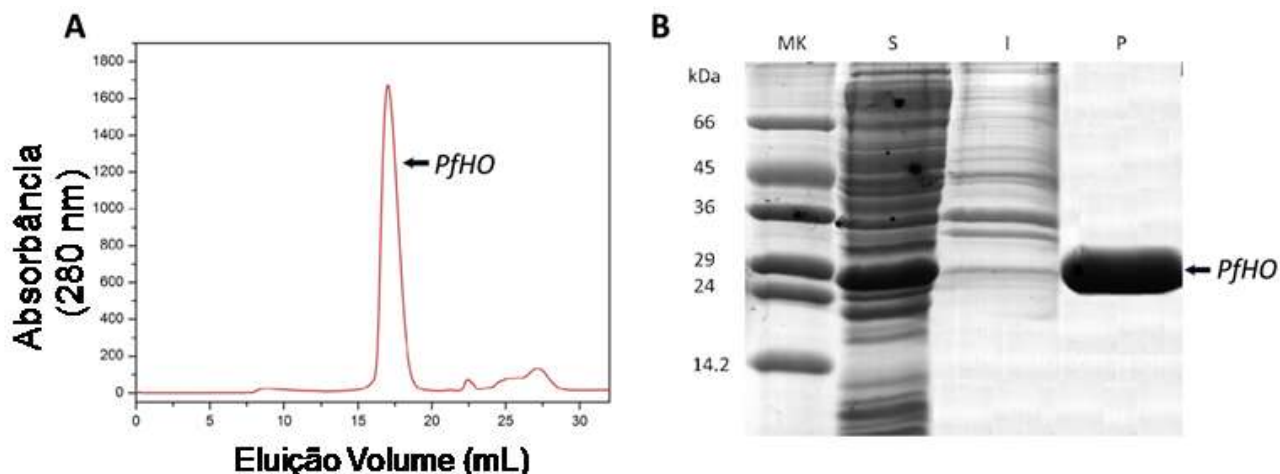
Decidimos testar *in vitro* a capacidade da *PfHO* purificada em converter BV em BR. Com o objetivo de realizar este ensaio *in vitro*, expressamos o gene da *PfHO* sem a região do peptídeo sinal em *Escherichia coli* (ver material e métodos) para obter uma *PfHO* recombinante. Esta clonagem foi realizada pelo Dr Robson Sartorello no Instituto de Biociências da USP e pela Professora Dra Ana Paula U. Araújo no Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

O grau de pureza da *PfHO* recombinante obtida foi inferida após os dois passos de purificação aplicadas na produção da enzima: cromatografia de afinidade para proteínas com cauda de histidina (Ni-NTA superflow) e cromatografia de exclusão molecular (HPLC) (**figura 22**). Ver material e métodos. A expressão e purificação da enzima *PfHO* foi feita com

a colaboração e auxílio do doutorando Fernando V. Maluf e Prof. Dr Rafael Guido no Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Cristalografia, USP.

Após o passo de purificação na cromatografia de exclusão molecular, observamos na **figura 22 B** uma única banda de aproximadamente 29 kDa, o tamanho esperado para *PfHO*, confirmando a expressão e pureza da *PfHO* recombinante usada nos ensaios.

**Figura 22**-Purificação da *P. falciparum* heme oxigenase recombinante.



Em **A**: cromatograma exclusão de molecular (coluna Superdex 200 10/300 GL - GE Healthcare). Fase móvel em tampão Tris (pH 7,4) 50 mM tampão contendo 200 mM de NaCl. Taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Heme oxigenase recombinante (*PfHO*) com cauda 6xHis foi eluída num pico puro indicada pela seta. **B**: Gel de SDS-PAGE 10%. Marcador de peso molecular (canaleta MK). Fração solúvel (canaleta S). Fração insolúvel (canaleta I). Amostra da heme oxigenase após purificação em cromatografia de exclusão molecular (canaleta P).

#### 4.2.1.2 Atividade biliverdina redutase (BVR) da *PfHO* recombinante

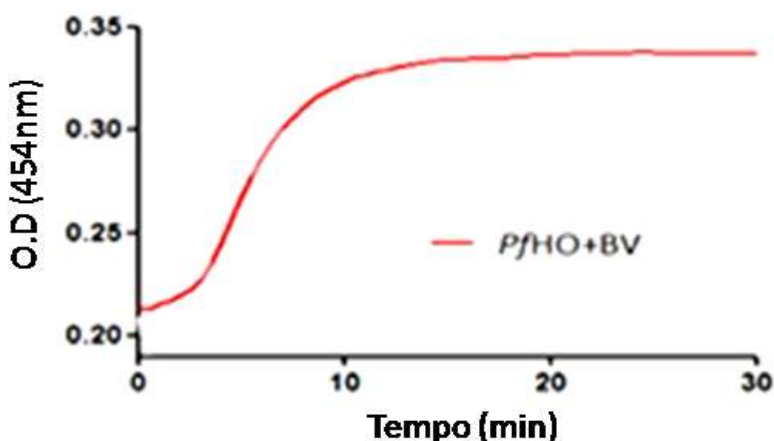
Obtida a enzima *PfHO* recombinante purificada, demos início aos experimentos para testar *in vitro* se *PfHO* recombinante é capaz de converter biliverdina (BV) em bilirrubina (BR).

Para testar a atividade biliverdina redutase (BVR) da *PfHO*, BV foi utilizado como substrato (ver material e métodos) na presença de NADPH (atua como doador de elétron). A glicose-6-fosfato (G6P) e G6P desidrogenase (G6P-DH) foram usadas na reação para restabelecer o NADPH. A reação foi montada na presença de um tampão TRIS-HCl pH:7,4 a 37°C.

A taxa de conversão da BV para BR catalisada pela *PfHO* foi monitorada no espectrofotômetro no comprimento de onda 454 nm (a banda de absorção mais forte da BR). Na **figura 23** vemos a curva cinética que relaciona a OD (454 nm) em relação ao tempo. Na

presença do substrato BV e da enzima *PfHO*, observamos um aumento do valor da OD (454 nm) nos primeiros 10 minutos da reação, sugerindo que *in vitro* a *PfHO* é capaz de catalisar a formação de BR a partir de BV.

**Figura 23**-Atividade biliverdina redutase catalisada pela *PfHO*.

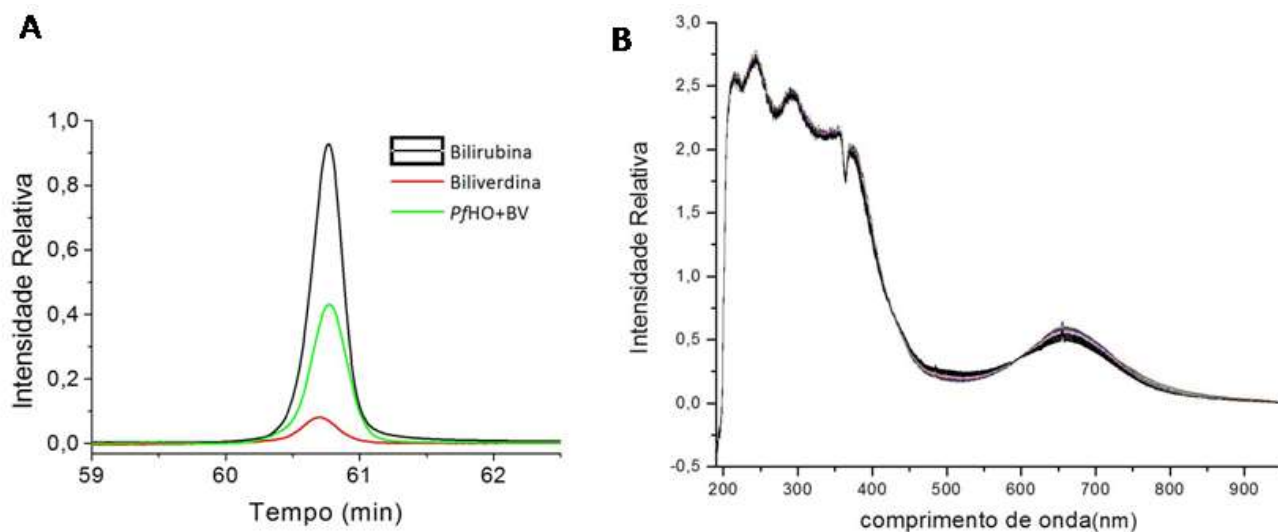


Curva cinética (Densidade Óptica x Tempo em segundo) monitorando a atividade redutase da hemo-oxigenase *PfHO*. A formação da BR é monitorada no comprimento de onda 454 nm. Curva representativa.

Para confirmar BR como o produto final da reação catalisada pela *PfHO*, realizamos uma análise no HPLC-UV (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) co-injetando uma amostra pura de BR com a reação enzimática observada na **figura 23**. A **figura 24 A** (linha verde) confirma a BR como produto da reação BVR catalisada pela *PfHO*. Para certificarmos da importância da *PfHO* na atividade BVR, o mesmo ensaio foi montado na ausência da enzima. Este controle foi aplicado no HPLC-UV (**Figura 24 A**, linha vermelha). A presença da *PfHO* na reação aumentou consideravelmente a presença da BR comparada na reação sem a enzima. Os experimentos com HPLC-UV foram realizadas pela Dra. Vânia B. Bueno orientada pelo Prof. Dr. Luiz H. Catalani no Departamento de Química Fundamental no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Um espectro UV-Vis (200nm a 950nm) também foi medido a cada cinco minutos de reação BVR catalisada pela *PfHO* a fim de monitorar eventual precipitação ou espalhamento de luz durante a reação (**Figura 24 B**). A sobreposição dos espectros não sugere a ocorrência de precipitação de algum dos reagentes da reação BRV catalisada pela *PfHO* durante 30 minutos de reação.

**Figura 24**-Bilirrubina é produto final da reação biliverdina redutase catalisada pela *PfHO* .



Em **A**: Análise no HPLC-UV visível (454 nm) evidenciando a formação de bilirrubina. Linha preta (bilirrubina) é um controle de injeção de bilirrubina. Linha Vermelha (BV) é o controle contendo biliverdina, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicose-6-fosfato e NADPH, na ausência de *PfHO*. Linha verde (*PfHO* + BV) é a solução (BV) na presença de *PfHO*. **B**: Espectros UV-Vis sobrepostos da reação que produz BR a partir BV catalisada pela *PfHO*. O espectro UV-Vis de 200nm a 950nm da reação foi medida a cada 5 minutos durante uma hora a fim de identificar possíveis deslocamentos espectrais

Estes dados demonstram que a enzima *PfHO* recombinante apresenta atividade biliverdina redutase *in vitro* nas condições testadas neste protocolo.

#### 4.2.1.3 Modulando a atividade biliverdina redutase (BVR) da *PfHO* recombinante com metaloprotoporfirinas

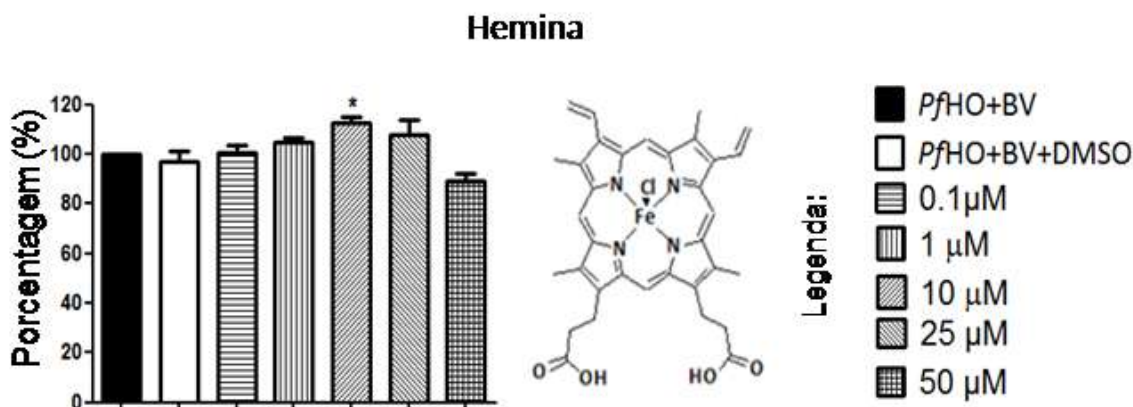
Metaloprotoporfirinas são agentes clássicos na modulação da enzima heme oxigenase em mamíferos (Vreman et al., 1996). Esta propriedade fornece uma ferramenta farmacológica para estudar o efeito da modulação da heme oxigenase *in vitro* (Drummond et al., 1986). Entretanto a modulação da *PfHO* pelas metaloprotoporfirinas nunca foi testada, limitando o conhecimento sobre os mecanismos de ativação e inibição desta enzima. Para explorar esta questão, decidimos testar a capacidade da enzima purificada *PfHO* recombinante em catalisar a conversão da BV para BR na presença das metaloprotoporfirinas: Fe-PPIX, PPIX, Co-PPIX; Zn-PPIX; Cu-PPIX; Mn-PPIX e Ni-PPIX nas concentrações 0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{M}$ . A reação BVR catalisada pela *PfHO* contendo apenas o solvente DMSO, usado para solubilizar as metaloprotoporfirinas, foi usada como controle.



Para calcular a modulação, usamos o programa GraphPad Prism para fazer a regressão linear da curva cinética (OD 454 versus tempo) da reação BVR catalisada pela *PfHO* obtendo o valor do coeficiente angular ( $\alpha$ ) que indica a angulação da reta. O valor do  $\alpha$  da reação BVR na presença da *PfHO* com solvente DMSO ou metaloprotoporfirina foi normalizada em relação ao  $\alpha$  da reação BVR na presença da *PfHO*.

Na **figura 25** mostramos a modulação da hemina na atividade BVR catalisada pela *PfHO*. Hemina (Fe-PPIX) foi a única metaloprotoporfirina que aumentou a atividade *PfHO* recombinante na concentração de 10  $\mu\text{M}$  ( $115 \pm 7\%$ ) e não mostrou qualquer inibição nas outras concentrações testadas.

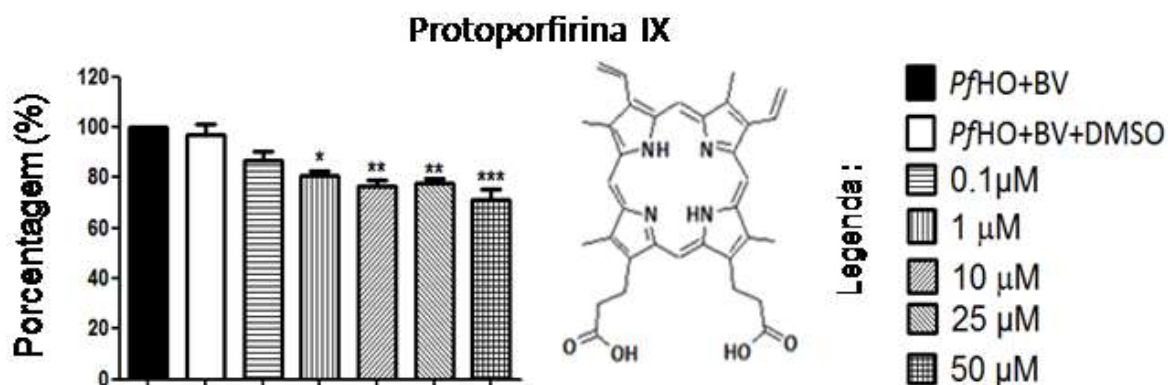
**Figura 25-**Atividade biliverdina redutase catalisada pela *P. falciparum* heme oxigenase na presença de hemina.



O valor do coeficiente angular obtido do gráfico (Densidade ótica vs Tempo) na reação controle sem DMSO ou protoporfirina metaladas (*PfHO* + BV) foi considerado 100%. Percentual da ativação ou inibição da *PfHO* foi comparada com o controle DMSO (*PfHO* + BV + DMSO). O gráfico da atividade redutase da *PfHO* na presença de 0,1, 1, 10, 25 e 50 $\mu\text{M}$  de hemina (Fe-PPIX). No centro a representação estrutural do Fe (III) protoporfirina (hemina). Os dados representam três experimentos diferentes, cada uma contendo triplicata \* P <0,05.

Na **figura 26** mostramos a modulação da protoporfirina (PPIX) na atividade BVR catalisada pela *PfHO*. A protoporfirina XI (PPI-IX) inibiu a reação BVR em concentrações superiores a 1  $\mu\text{M}$  ( $80 \pm 10\%$ ). As inibições observadas em 10  $\mu\text{M}$  ( $76 \pm 7\%$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $77 \pm 6\%$ ) e 50  $\mu\text{M}$  ( $71 \pm 13\%$ ) indicam a participação dos grupos existente na protoporfirina IX na inibição enzimática da *PfHO*.

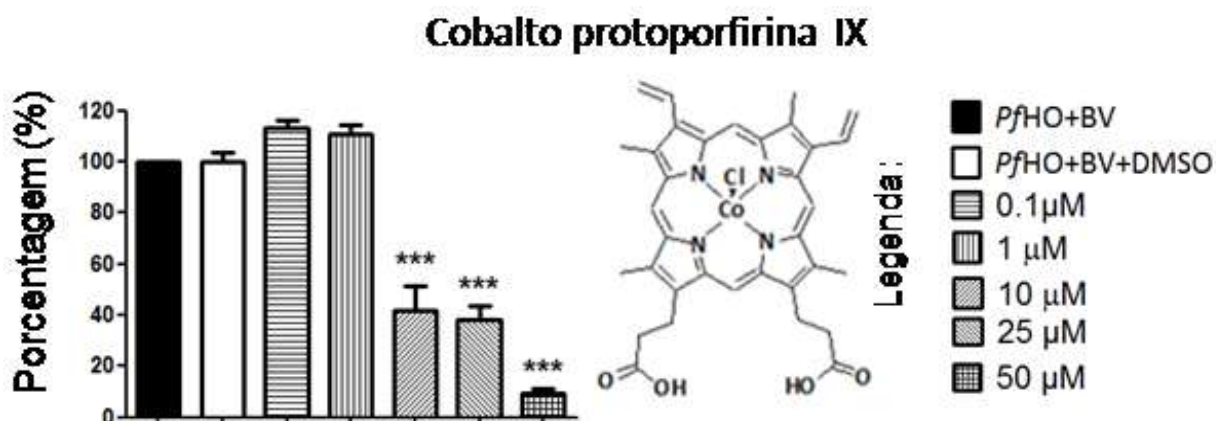
**Figura 26-**Atividade biliverdina redutase catalisada pela *P. falciparum* heme oxigenase na presença de protoporfirina IX.



O valor do coeficiente angular obtido do gráfico (Densidade ótica vs Tempo) na reação controle sem DMSO ou protoporfirina metaladas (*PfHO* + BV) foi considerado 100%. Percentual da ativação ou inibição da *PfHO* foi comparada com o controle DMSO (*PfHO* + BV + DMSO). O gráfico da atividade redutase da *PfHO* na presença de 0,1, 1, 10, 25 e 50μM de PPIX. No centro a representação estrutural protoporfirina IX (PPIX). Os dados representam três experimentos diferentes, cada uma contendo triplicata. \* P <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001.

Na **figura 27** mostramos a modulação do cobalto protoporfirina (Co-PPIX) na atividade BVR catalisada pela *PfHO*. A adição de 10 μM de Co-PPIX foi suficiente para causar uma inibição de  $42 \pm 28\%$  da atividade da enzima e 50 μM desta metaloprotoporfirina completamente abole ( $9 \pm 3\%$ ) a atividade BVR da *PfHO*.

**Figura 27-**Atividade biliverdina redutase catalisada pela *P. falciparum* heme oxigenase na presença de cobalto protoporfirina IX.

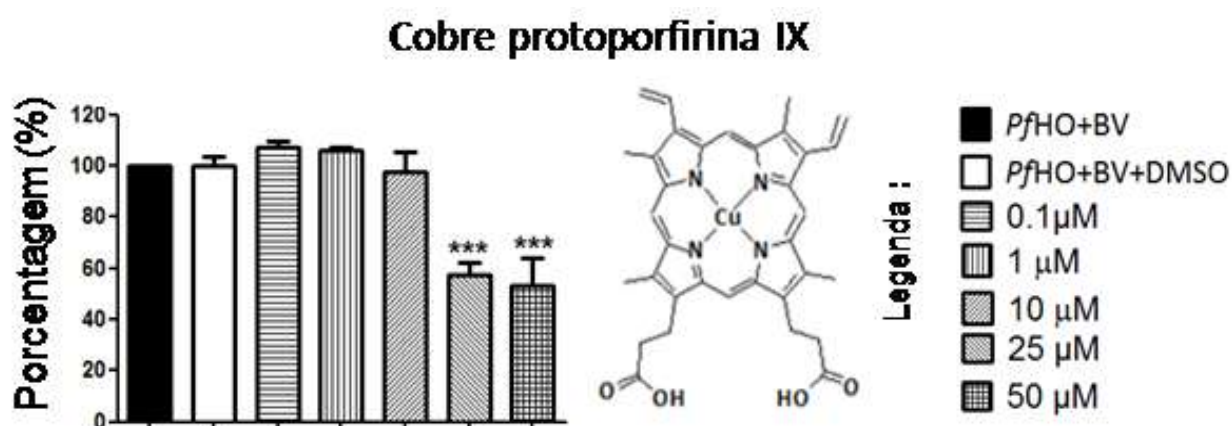


O valor do coeficiente angular obtido do gráfico (Densidade ótica vs Tempo) na reação controle sem DMSO ou protoporfirina metaladas (*PfHO* + BV) foi considerado 100%. Percentual da ativação ou inibição da *PfHO* foi comparada com o controle DMSO (*PfHO* + BV + DMSO). O gráfico da atividade redutase da *PfHO* na presença de 0,1, 1, 10, 25 e 50μM de Co-PPIX. No centro a representação estrutural cobalto protoporfirina IX (Co-PPIX). Os dados representam três experimentos diferentes, cada uma contendo triplicata. \*\*\* p <0,001.

Interessante que a cobalto protoporfirina XI (Co-PPIX) é um indutor da atividade heme oxigenase *in vivo* em diversos tecidos (Maine et al., 1977). Neste aspecto, o Co-PPIX apresenta uma modulação distinta na atividade da *PfHO* comparada com a HO de humanos.

Na **figura 28** mostramos a modulação do cobre protoporfirina (Cu-PPIX) na atividade BVR catalisada pela *PfHO*. Somente as concentrações mais altas de Cu-PPIX causaram uma inibição da atividade da *PfHO*: 25  $\mu\text{M}$  ( $57 \pm 15\%$ ) e 50  $\mu\text{M}$  ( $53 \pm 30\%$ ).

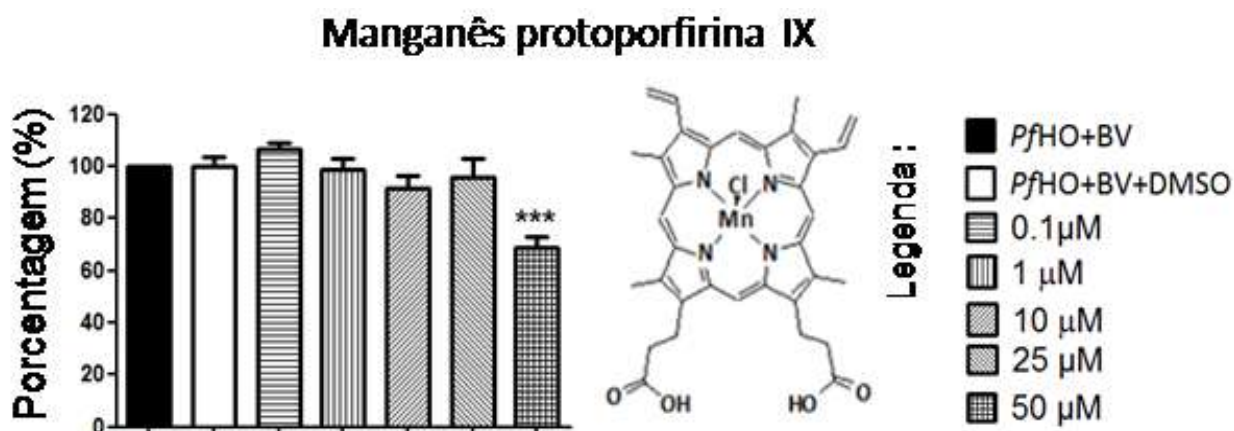
**Figura 28**-Atividade biliverdina redutase catalisada pela *P. falciparum* heme oxigenase na presença de cobre protoporfirina IX.



O valor do coeficiente angular obtido do gráfico (Densidade ótica vs Tempo) na reação controle sem DMSO ou protoporfirina metaladas (*PfHO* + BV) foi considerado 100%. Percentual da ativação ou inibição da *PfHO* foi comparada com o controle DMSO (*PfHO* + BV + DMSO). O gráfico da atividade redutase da *PfHO* na presença de 0,1, 1, 10, 25 e 50 $\mu\text{M}$  de Cu-PPIX. No centro a representação estrutural cobre protoporfirina IX (Cu-PPIX). Os dados representam três experimentos diferentes, cada uma contendo triplicata. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Na **figura 29** mostramos a modulação do manganês protoporfirina (Mn-PPIX) na atividade BVR catalisada pela *PfHO*. A Mn-PPIX só inibiu a atividade da *PfHO* na concentração 50  $\mu\text{M}$  ( $68 \pm 14\%$ ).

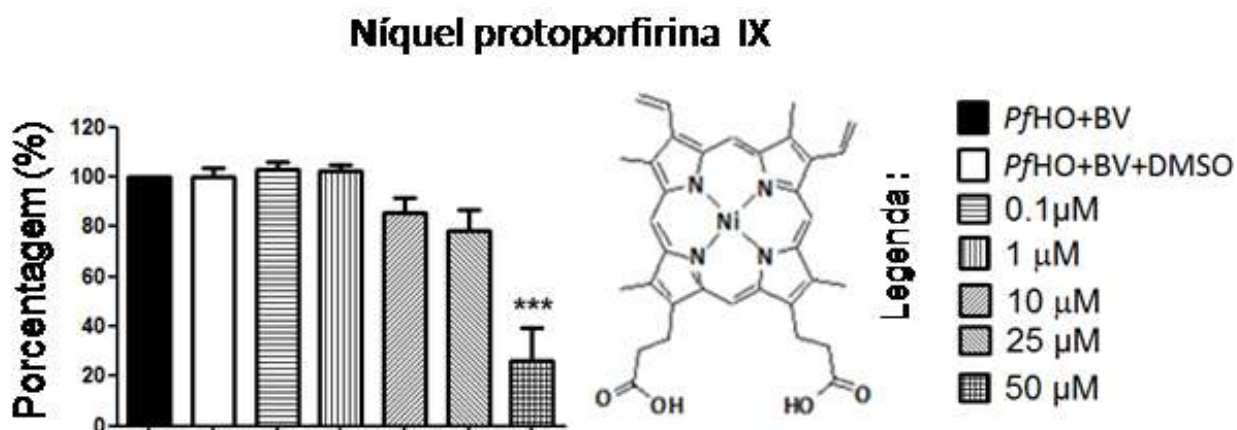
**Figura 29-**Atividade biliverdina redutase catalisada pela *P. falciparum* heme oxigenase na presença de manganês protoporfirina IX.



O valor do coeficiente angular obtido do gráfico (Densidade ótica vs Tempo) na reação controle sem DMSO ou protoporfirina metaladas (PfHO + BV) foi considerado 100%. Percentual da ativação ou inibição da PfHO foi comparada com o controle DMSO (PfHO + BV + DMSO). O gráfico da atividade redutase da PfHO na presença de 0,1, 1, 10, 25 e 50μM de Mn-PPIX. No centro a representação estrutural manganês protoporfirina IX (Mn-PPIX). Os dados representam três experimentos diferentes, cada uma contendo triplicata. \*\*\* p <0,001.

Este padrão de inibição observada com Mn-PPIX foi semelhante ao observado com o níquel protoporfirina (Ni-PPIX) (**figura 30**) onde a concentração 50 μM apresentou uma inibição de 26 ±41%.

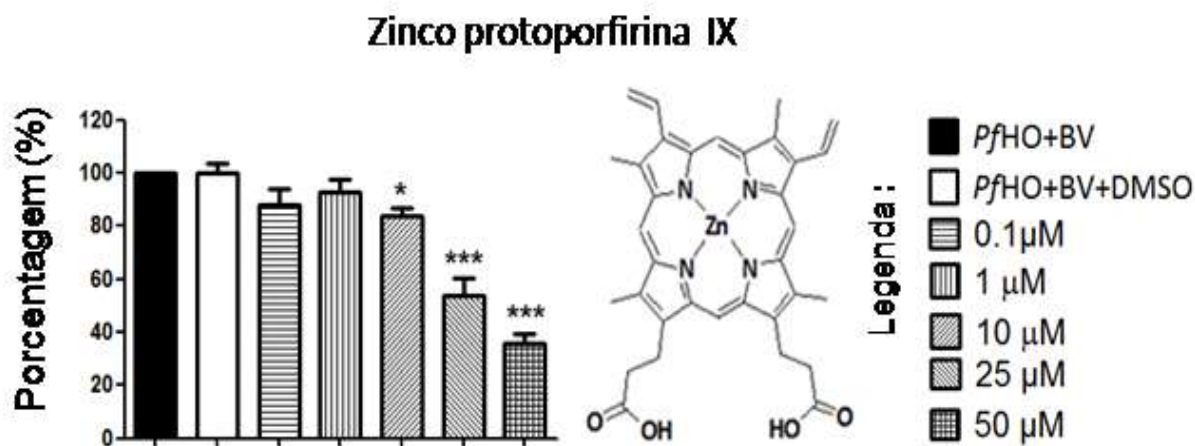
**Figura 30-**Atividade biliverdina redutase catalisada pela *P. falciparum* heme oxigenase na presença de níquel protoporfirina IX.



O valor do coeficiente angular obtido do gráfico (Densidade ótica vs Tempo) na reação controle sem DMSO ou protoporfirina metaladas (PfHO + BV) foi considerado 100%. Percentual da ativação ou inibição da PfHO foi comparada com o controle DMSO (PfHO + BV + DMSO). O gráfico da atividade redutase da PfHO na presença de 0,1, 1, 10, 25 e 50μM de Ni-PPIX. No centro a representação estrutural níquel protoporfirina IX (Ni-PPIX). Os dados representam três experimentos diferentes, cada uma contendo triplicata. \*\*\* p <0,001.

Na **figura 31** mostramos a modulação do zinco protoporfirina (Zn-PPIX) na atividade BVR catalisada pela *PfHO*. A Zn-PPIX inibiu a atividade da *PfHO* a partir da concentração 10  $\mu\text{M}$  ( $83 \pm 9\%$ ). A concentração de 25  $\mu\text{M}$  de Zn-PPIX inibiu  $54 \pm 19\%$  da atividade *PfHO* enquanto que 50  $\mu\text{M}$  inibiu  $35 \pm 10\%$ .

**Figura 31**-Atividade biliverdina redutase catalisada pela *P. falciparum* heme oxigenase na presença de zinco protoporfirina IX.



O valor do coeficiente angular obtido do gráfico (Densidade ótica vs Tempo) na reação controle sem DMSO ou protoporfirina metaladas (*PfHO* + BV) foi considerado 100%. Percentual da ativação ou inibição da *PfHO* foi comparada com o controle DMSO (*PfHO* + BV + DMSO). O gráfico da atividade redutase da *PfHO* na presença de 0,1, 1, 10, 25 e 50 $\mu\text{M}$  de Zi-PPIX. No centro a representação estrutural zinco protoporfirina IX (Zn-PPIX). Os dados representam três experimentos diferentes, cada uma contendo triplicata. \* P <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001.

O solvente DMSO, usado para solubilizar as metaloprotoporfirinas, não alterou a atividade BVR da *PfHO* recombinante, indicando que a modulação da atividade BVR catalisada pela *PfHO* se deve pela presença das metaloprotoporfirinas testadas.

#### 4.2.2 Ação das metaloprotoporfirinas em *P. falciparum*

##### 4.2.2.1 Zn-PPIX inibe a formação de hemozoína em culturas de *P. falciparum*

O zinco protoporfirina XI (Zn-PPIX) é um clássico e eficiente inibidor da enzima heme oxigenase (Labbe et al., 1999). Após demonstrarmos que Zn-PPIX inibe *in vitro* a atividade BVR da *PfHO* (**figura 31**), decidimos testar a capacidade desta metaloprotoporfirina em inibir a formação do cristal de hemozoína em eritrócitos infectados com *P. falciparum*.

A região da hemozoína em eritrócitos infectados com *P. falciparum* foi identificada por microscopia de contraste de fase (ver material e métodos) como pode ser observado na **figura 32 B**. A medição da área da hemozoína foi possível uma vez que este polímero forma um cristal escuro bem característico.

Zn-PPIX na concentração 25  $\mu\text{M}$  foi incubado por duas horas em cultura de *P. falciparum* sincronizadas no estágio de trofozoíto (T). A área da hemozoína destes parasitas foi comparada com o grupo controle que recebeu apenas DMSO (controle negativo), 1  $\mu\text{M}$  de cloroquina (controle positivo) e ao tempo inicial ( $T_0$ , área da hemozoína antes de iniciar a incubação de 2 horas) (**figura 32 A**).

Foi demonstrado que a cloroquina inibe a formação do cristal de hemozoína no *Plasmodium* (Asawamahasakda et al.,1994), esta inibição está possivelmente associada a alcalinização dos compartimentos ácidos onde ocorre a formação da hemozoína (Gazarini et al., 2007) uma vez que a cloroquina é capaz de inibir os canais iônicos (Kumar et al., 2007) importantes no transporte de prótons  $\text{H}^+$  no lúmen do vacúolo ácido. Como esperado, após duas horas de incubação com 1  $\mu\text{M}$  de cloroquina, observamos uma diminuição na área da hemozoína em *P. falciparum* ( $72 \pm 5\%$ ) (**figura 32 A**).

**Figura 32**-Medição da hemozoína em *P. falciparum*.



Em **A**: Gráfico da alteração de tamanho da hemozoína em porcentagem. Os valores do tempo inicial ( $T_0$ ) foram considerados 100%. Dados obtidos em 3 experimentos distintos. \*\* Para  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . **B**: Imagem do confocal evidenciando um eritrócito infectado por *P. falciparum* no estágio de trofozoíto. A seta evidencia o cristal de hemozoína.

A concentração 25 $\mu\text{M}$  de Zn-PPIX foi capaz de reduzir a área média do cristal de hemozoína em apenas duas horas ( $65 \pm 16\%$ ). O solvente DMSO não reduziu a área da hemozoína quando comparado ao grupo  $T_0$ , indicando que os efeitos inibitórios observados na

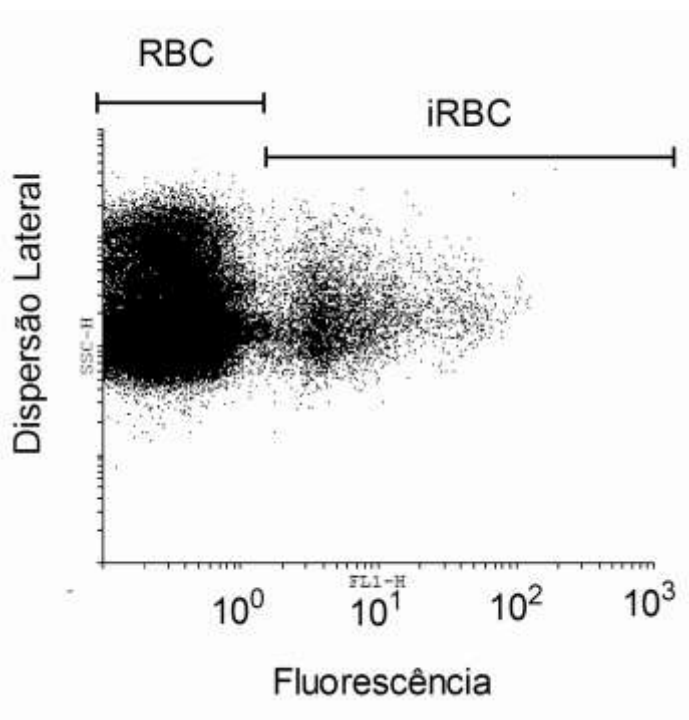
formação da hemozoína com a incubação com Zn-PPIX deve-se exclusivamente a presença da metaloprotoporfirina (**figura 32 B**).

#### 4.2.2.2 Efeito da hemina, protoporfirina e metaloprotoporfirinas na viabilidade de *P. falciparum*

As metaloprotoporfirinas modularam a atividade BVR da enzima PfHO recombinante (**figuras 25 a 31**) e Zn-PPIX foi capaz de reduzir em apenas duas horas a área da hemozoína em *P. falciparum* (**figura 32**). Para verificar se a exposição das metaloprotoporfirinas durante 48 horas alteram a viabilidade em cultura de *P. falciparum* dessincronizado, adicionamos no meio de cultura completo dos parasitas diferentes concentrações (0,1, 1, 10, 25 e 50  $\mu$ M) de hemina, PPIX e metaloprotoporfirinas sintéticas (Co-PPIX; Zn-PPIX; Cu-PPIX; PPIX-Mn e Ni-PPIX).

Ao final da incubação de 48 horas do *P. falciparum* na presença das metaloprotoporfirinas, as células foram fixadas e marcadas com YOYO-1 (marcador de DNA) como descrito no material e métodos. Na presença do YOYO-1, os eritrócitos infectados (contém DNA de origem do parasita) apresentam uma fluorescência distinta dos eritrócitos não infectados. Desta forma a parasitemia é determinada a partir de gráficos de pontos (dispersão lateral versus fluorescência) de  $10^5$  células adquiridos num citómetro de fluxo (**figura 33**).

**Figura 33**-Gráfico de pontos (dispersão versus fluorescência) obtida em um citômetro de fluxo FACS Calibur.



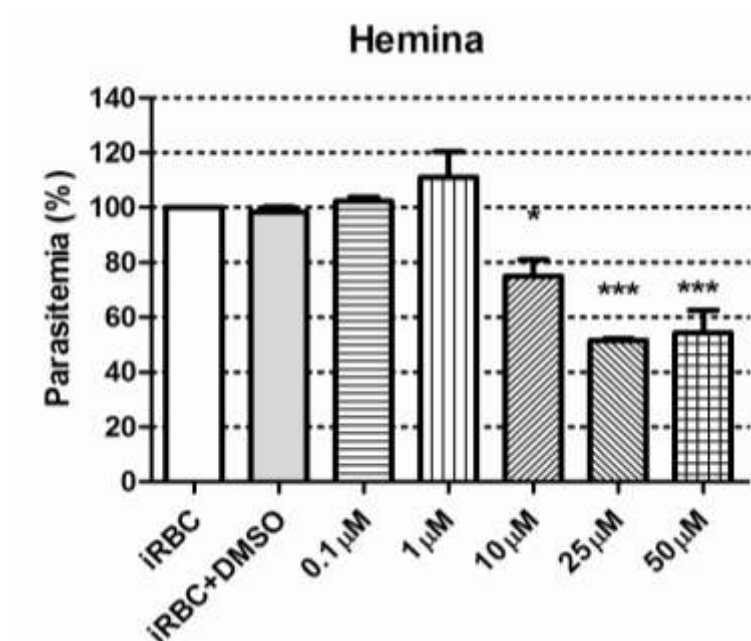
Eritrócitos não infectados (RBC) e infectados com *P. falciparum* (iRBC) marcados com YOYO-1 formam duas populações distintas. Cada ponto (evento) representa uma célula. Amostrado  $10^5$  células em cada amostra.

Na **figura 34** mostramos o efeito da hemina na viabilidade em *P. falciparum* após 48 horas de incubação. Houve um decréscimo na viabilidade da parasitemia a partir da concentração de  $10\mu\text{M}$  ( $75 \pm 10\%$ ). Hemina nas concentrações  $25\mu\text{M}$  ( $51 \pm 1\%$ ) e  $50\mu\text{M}$  ( $54 \pm 14\%$ ) conseguiu matar metade da população de parasitas. Este dado reforça o efeito tóxico da hemina em *P. falciparum*.

Na **figura 35** mostramos o efeito protoporfirina IX (PPIX) na viabilidade em *P. falciparum* após 48 horas de incubação. A PPIX apresentou baixa toxicidade na população de *P. falciparum*, a queda na viabilidade destas células só foi observada na concentração de  $50\mu\text{M}$  ( $74 \pm 9\%$ ). Este dado evidencia a impotência do metal presente na protoporfirina IX no efeito antimalárico das metaloprotoporfirinas.

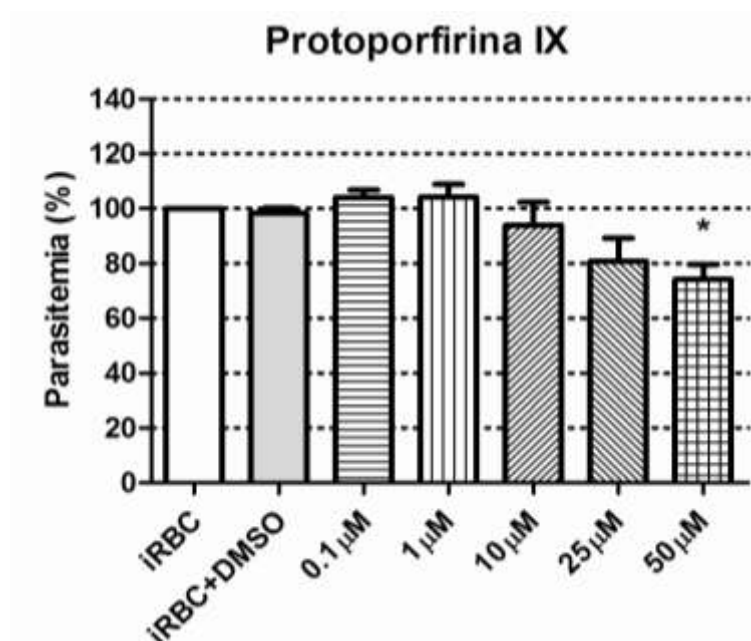


**Figura 34-** Viabilidade dos eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* após 48 horas de incubação, na presença de hemina.



A parasitemia foi determinada a partir do dot plots (dispersão lateral versus fluorescência) de  $10^5$  células em um citômetro de fluxo FACS Calibur. O valor da parasitemia do controle, sem drogas ou solvente (iRBC) foi considerado 100%. Todo o tratamento foi comparado com o controle, contendo apenas solvente (iRBC + DMSO). A: valor da parasitemia na presença de 0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu$ M de Fe-PPIX. Os dados representam 4 experimentos distintos. \* P < 0,05 e \*\*\* p < 0,001.

**Figura 35-** Viabilidade dos eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* após 48 horas de incubação, na presença de protoporfirina IX.

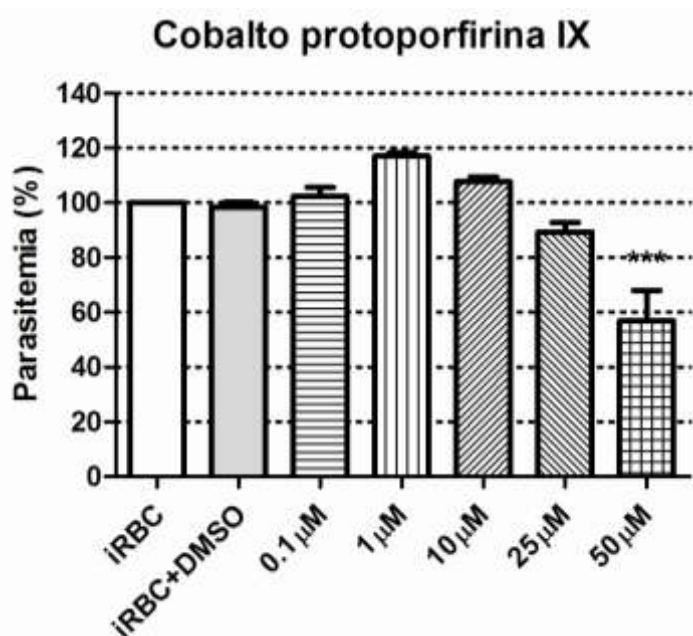


A parasitemia foi determinada a partir do dot plots (dispersão lateral versus fluorescência) de  $10^5$  células em um citômetro de fluxo FACS Calibur. O valor da parasitemia do controle, sem drogas ou solvente (iRBC) foi considerado 100%. Todo o tratamento foi comparado com o controle, contendo apenas

solvente (iRBC + DMSO). Valor da parasitemia na presença de 0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{M}$  de PPIX. Os dados representam 4 experimentos distintos. \*  $P < 0,05$ .

Na **figura 36** mostramos o efeito do cobalto protoporfirina IX (Co-PPIX) na viabilidade em *P. falciparum* após 48 horas de incubação. Co-PPIX só apresentou toxicidade na concentração 50  $\mu\text{M}$  ( $57 \pm 19\%$ ).

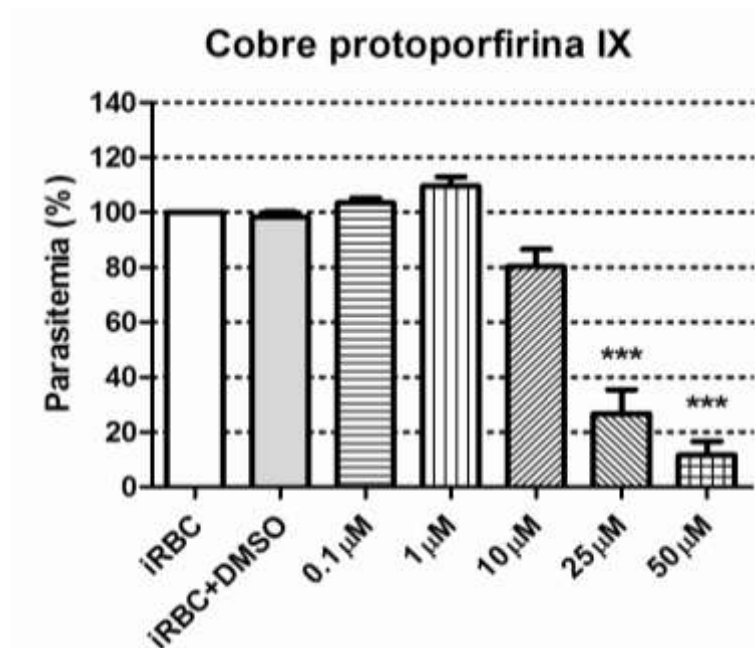
**Figura 36-** Viabilidade dos eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* após 48 horas de incubação, na presença do cobalto protoporfirina IX.



A parasitemia foi determinada a partir do dot plots (dispersão lateral versus fluorescência) de  $10^5$  células em um citômetro de fluxo FACS Calibur. O valor da parasitemia do controle, sem drogas ou solvente (iRBC) foi considerado 100%. Todo o tratamento foi comparado com o controle, contendo apenas solvente (iRBC + DMSO). Valor da parasitemia na presença de 0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Co-PPIX. Os dados representam 4 experimentos distintos. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Na **figura 37** mostramos o efeito do cobre protoporfirina IX (Cu-PPIX) na viabilidade em *P. falciparum* após 48 horas de incubação. Cu-PPIX reduziu drasticamente a viabilidade de *P. falciparum* nas concentrações 25  $\mu\text{M}$  ( $26 \pm 15\%$ ) e 50  $\mu\text{M}$  ( $11 \pm 8\%$ ).

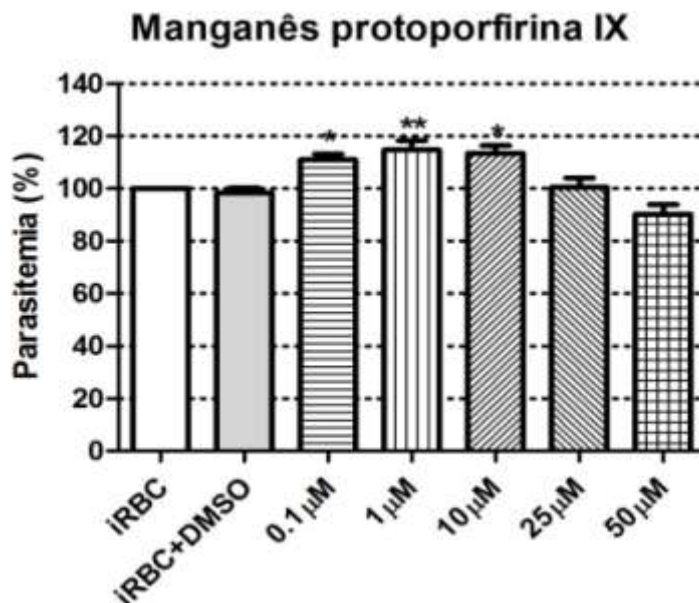
**Figura 37**-Viabilidade dos eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* após 48 horas de incubação, na presença de cobreprotoporfirina IX.



A parasitemia foi determinada a partir do dot plots (dispersão lateral versus fluorescência) de  $10^5$  células em um citômetro de fluxo FACS Calibur. O valor da parasitemia do controle, sem drogas ou solvente (iRBC) foi considerado 100%. Todo o tratamento foi comparado com o controle, contendo apenas solvente (iRBC + DMSO). Valor da parasitemia na presença de 0,1; 1; 10; 25 e 50 µM de Cu-PPIX. Os dados representam 4 experimentos distintos. \*\*\*  $p < 0,001$ .

A Mn-PPIX foi a única porfirina a aumentar a parasitemia nas concentrações de 0.1 µM ( $110 \pm 3\%$ ), 1 µM ( $114 \pm 6\%$ ) e 10 µM ( $113 \pm 5\%$ ) e não foi capaz de comprometer a viabilidade dos parasitas nas concentrações mais altas (**figura 38**). Este dado indica que o tipo de metal na metaloporfirina é um fator importante no potencial antimalárico destes compostos.

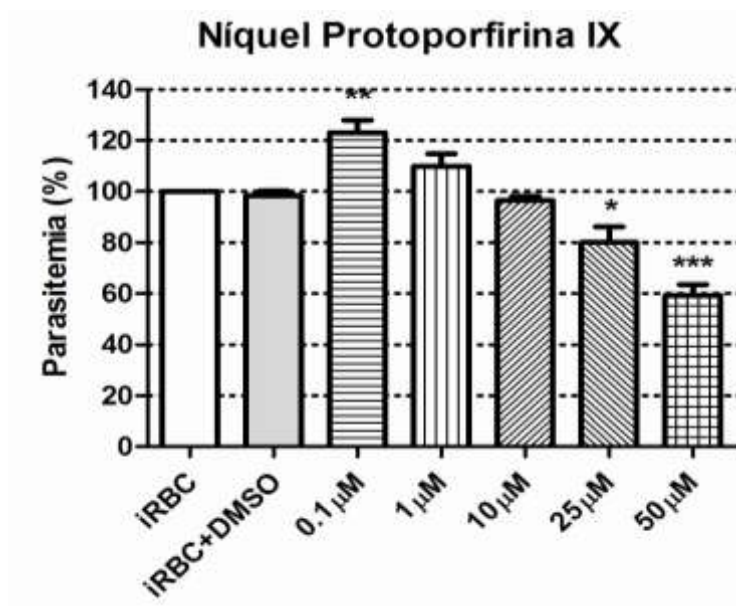
**Figura 38-** Viabilidade dos eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* após 48 horas de incubação, na presença de manganês protoporfirina IX.



A parasitemia foi determinada a partir do dot plots (dispersão lateral versus fluorescência) de  $10^5$  células em um citômetro de fluxo FACS Calibur. O valor da parasitemia do controle, sem drogas ou solvente (iRBC) foi considerado 100%. Todo o tratamento foi comparado com o controle, contendo apenas solvente (iRBC + DMSO). Valor da parasitemia na presença de 0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Mn-PPIX. Os dados representam 4 experimentos distintos. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

O Ni-PPIX também foi capaz de aumentar a parasitemia da cultura de *P. falciparum* após 48 horas de incubação na concentração 0.1  $\mu\text{M}$  ( $123 \pm 8\%$ ) porém, foi capaz de reduzir a parasitemia nas concentrações 25  $\mu\text{M}$  ( $80 \pm 10\%$ ) e 50  $\mu\text{M}$  ( $59 \pm 7\%$ ) (**figura 39**).

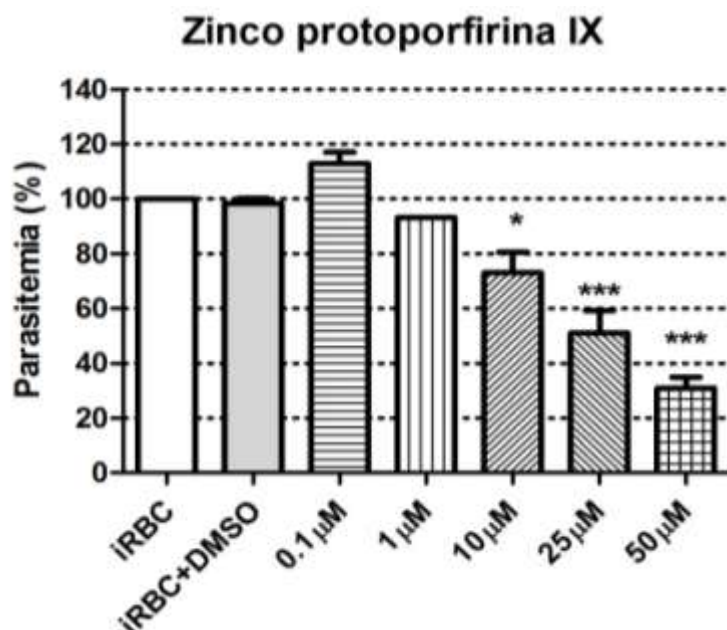
**Figura 39-** Viabilidade dos eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* após 48 horas de incubação, na presença de níquel protoporfirina IX.



A parasitemia foi determinada a partir do dot plots (dispersão lateral versus fluorescência) de  $10^5$  células em um citômetro de fluxo FACS Calibur. O valor da parasitemia do controle, sem drogas ou solvente (iRBC) foi considerado 100%. Todo o tratamento foi comparado com o controle, contendo apenas solvente (iRBC + DMSO). Valor da parasitemia na presença de 0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Ni-PPIX. Os dados representam 4 experimentos distintos. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Zn-PPIX foi capaz de comprometer a viabilidade celular do *P. falciparum* após incubação de 48 horas nas concentrações 10  $\mu\text{M}$  ( $73 \pm 13\%$ ), 25  $\mu\text{M}$  ( $51 \pm 14\%$ ) e 50  $\mu\text{M}$  ( $31 \pm 7\%$ ) (**figura 40**).

**Figura 40-** Viabilidade dos eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* após 48 horas de incubação, na presença de zinco protoporfirina IX.



A parasitemia foi determinada a partir do dot plots (dispersão lateral versus fluorescência) de  $10^5$  células em um citômetro de fluxo FACS Calibur. O valor da parasitemia do controle, sem drogas ou solvente (iRBC) foi considerado 100%. Todo o tratamento foi comparado com o controle, contendo apenas solvente (iRBC + DMSO). Valor da parasitemia na presença de 0,1; 1; 10; 25 e 50 µM de Zn-PPIX. Os dados representam 4 experimentos distintos. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

O solvente DMSO isoladamente não interfere com a viabilidade do parasita ( $98 \pm 3\%$ ). Não foi possível obter o  $IC_{50}$  das metaloprotoporfirinas livres devido a alta concentração necessária para que alguns compostos apresentem um efeito antimalárico. Concentrações de metaloprotoporfirinas acima de 50 µM apresentaram precipitação dos compostos em cultura. Nossos dados confirmam que o potencial antimalárico das metaloprotoporfirinas livres é limitado em culturas de *P. falciparum*.

#### 4.2.2.3 Efeito da hemina, protoporfirina e metaloprotoporfirinas encapsuladas na viabilidade de *P. falciparum*

As metaloporfirinas têm baixa solubilidade em meio aquoso neutro de modo que possam precipitar comprometendo seu transporte em membranas biológicas (Menger et al., 1998). Para aumentar a solubilidade das metaloporfirinas no meio e facilitar a entrada destes compostos através das membranas celulares, as metaloporfirinas foram encapsuladas em

micro e nanocápsulas de polissacarídeos atelocolágeno de algas marinhas, pelo método de coacervação (Menger et al., 1998). As metaloprotoporfirinas foram encapsuladas pela Dra Daiana K. Deda e pelo Prof. Dr Koite Araki no Departamento de Química Fundamental, IQ-USP. O atelocolágeno foi o material escolhido para o encapsulamento uma vez que este composto não apresenta toxicidade em células HeLa (Deda et al., 2009).

Para testar o efeito da exposição das metaloprotoporfirinas encapsuladas durante 48 horas na cultura de *P. falciparum* dessincronizado realizamos incubações com diferentes concentrações (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 nM) com os compostos Fe-PPIX (hemina), PPIX e metaloprotoporfirinas sintéticas (Co-PPIX, Zn-PPIX, Cu-PPIX, Mn-PPIX e Ni-PPIX) e DMSO encapsulado.

Para certificarmos que a formulação das cápsulas não apresenta citotoxicidade nos eritrócitos infectados, incubamos os parasitas durante 48 na presença do solvente DMSO encapsulado (**figura 41**). A presença das cápsulas+DMSO apresentou baixa toxicidade nas concentrações mais altas: 800 nM ( $93 \pm 2\%$ ), 900 nM ( $91 \pm 1\%$ ) e 1000 nM ( $89 \pm 1\%$ ). Nas concentrações abaixo de 800 nM o composto não prejudicou a parasitemia na cultura de *P. falciparum*. A viabilidade dos parasitas na presença das metaloprotoporfirinas encapsuladas foi normalizada em relação ao controle cápsulas+DMSO.

**Figura 41** -Efeito da incubação das cápsulas de atelocolágeno marinho e DMSO após 48 horas em cultura com *P. falciparum*.

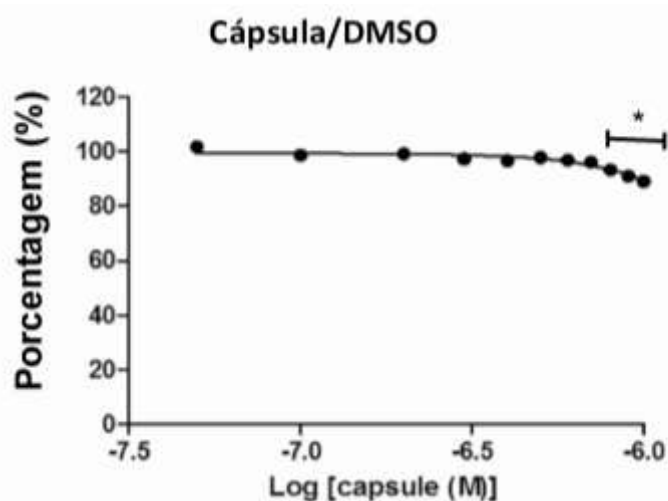


Gráfico de viabilidade dos parasitas na presença das nanocápsulas com solvente DMSO (parasitemia vs. log da concentração). Os gráficos representam a média mais desvio padrão de três experimentos distintos, triplicata cada. \*  $P < 0,05$ .

Os valores de  $IC_{50}$  dos compostos encapsulados Fe-PPIX, PPIX, Co-PPIX, Zn-PPIX, Cu-PPIX, PPIX-Mn e Ni-PPIX obtidos após 48 horas de incubação em cultura de *P. falciparum* estão plotados na **tabela 3**.

**Tabela 3-** Efeito da incubação de metaloprotoporfirinas encapsuladas após 48 horas em cultura com *P. falciparum*. Tabela indica os valores  $IC_{50}$ , intervalo de confiança (95%CI) e  $R^2$  (valor da regressão não linear) de cada composto encapsulado. Dados obtidos de três experimentos distintos, triplicata cada.

<b>Composto encapsulado</b>	<b><math>IC_{50}</math></b>	<b>Intervalo de confiança (95%CI)</b>	<b><math>R^2</math></b>
Fe-PPIX	556 nM	407 a 761 nM	0,93
PPIX	454 nM	276 a 747 nM	0,95
Co-PPIX	456 nM	215 a 967 nM	0,95
Cu-PPIX	632 nM	184 a 2162 nM	0,93
Mn-PPIX	781 nM	143 a 4271 nM	0,93
Ni-PPIX	625 nM	186 a 2093 nM	0,92
Zn-PPIX	330 nM	245 a 445 nM	0,89

Todas as metaloprotoporfirinas encapsuladas apresentaram melhor efeito antimalárico quando comparada a sua formulação livre uma vez que os compostos encapsulados apresentaram um efeito antimalárico em concentrações nanomolares.

Dentre os compostos testados, a Zn-PPIX encapsulada apresentou melhor potencial antimalárico ( $IC_{50}=330$  nM). O Mn-PPIX encapsulado foi o composto com menor potencial antimalárico ( $IC_{50}=781$  nM). O Fe-PPIX apresentou um  $IC_{50}=556$  nM, entretanto é importante ressaltar que o parasita já lida com altas concentrações de hemina durante seu desenvolvimento intraeritrocítico. A protoporfirina sem metal (PPIX) apresentou um  $IC_{50}=454$  nM, indicando um papel importante da protoporfirina IX na citotoxicidade em *P. falciparum*. Considerando apenas o intervalo de confiança (95% CI) que indica o intervalo de concentração onde há 95% de probabilidade de encontrar o valor de  $IC_{50}$ , confirmamos que os compostos Fe-PPIX, PPIX, Co-PPIX e Zn-PPIX de fato apresenta um efeito antimalárico em concentrações nanomolares.

Nossos dados confirmam que o encapsulamento das metaloprotoporfirinas melhora consideravelmente seu efeito antimalárico.



### 4.2.3 Ação da hemina, biliverdina e bilirrubina no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*

#### 4.2.3.1 Efeito do catabolismo da hemina no ciclo celular em *P. falciparum*

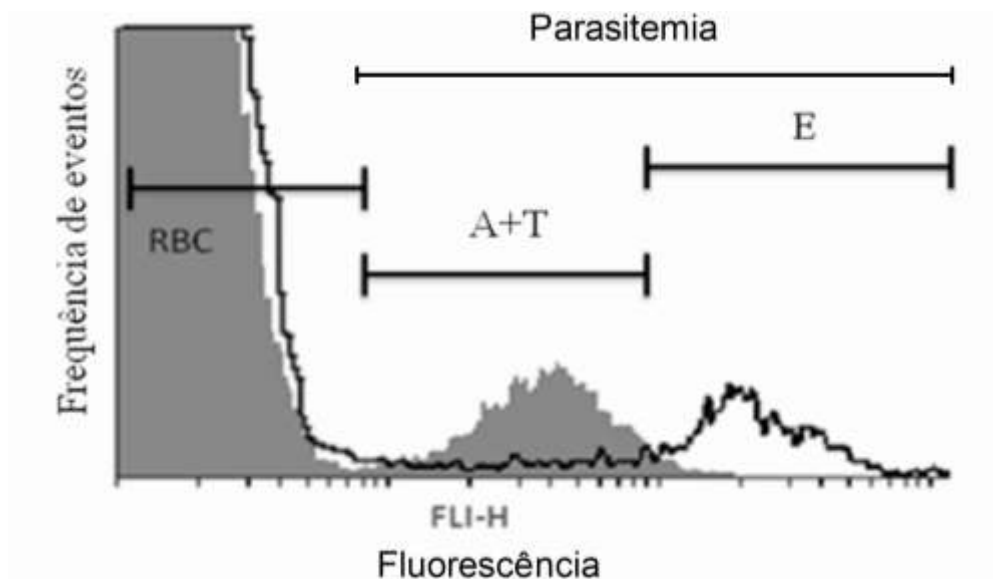
O principal mecanismo de detoxificação da hemina encontrado em *Plasmodium* é sua conversão no cristal de hemozoína ( $\beta$ -hematina) (Sherman et al., 1965). A via alternativa de detoxificação da hemina formando BV e BR catalisada pela PfHO foi proposta pelo Okada (2009), entretanto a PfHO apresenta uma baixa atividade em converter hemina em BR (Sartorello et al., 2010) sugerindo uma função alternativa da detoxificação da hemina.

Diversos trabalhos evidenciam que os produtos do catabolismo da hemina atuam como sinais moduladores nas vias de sinalização em mamíferos (Neuzil et al., 1994). Para abordar se a hemina, BV e BR apresenta esta propriedade em *P. falciparum*, decidimos investigar a modulação do ciclo intraeritrocítico em cultura de *P. falciparum* dessincronizados incubados por 48 horas na presença destes compostos.

Eritrócitos infectados com parasitas dessincronizados foram incubados durante 48 horas na ausência (controle) e na presença de 0,1; 1 e 10  $\mu$ M de hemina, BV e BR.

Para analisar a distribuição dos estágios intraeritrocíticos do *P. falciparum* em A+T (anel e trofozoíto, ambas células mononucleadas) e E (esquizonte, célula multinuclear), as células foram marcadas com YOYO-1 (marcador de DNA) e analisadas em citômetro de fluxo comparando amostras controles de culturas sincronizadas. Esta técnica permite, além de calcular a parasitemia da amostra, diferenciar as duas populações A+T e E uma vez que estas contêm quantidades distintas de DNA (**figura 42**).

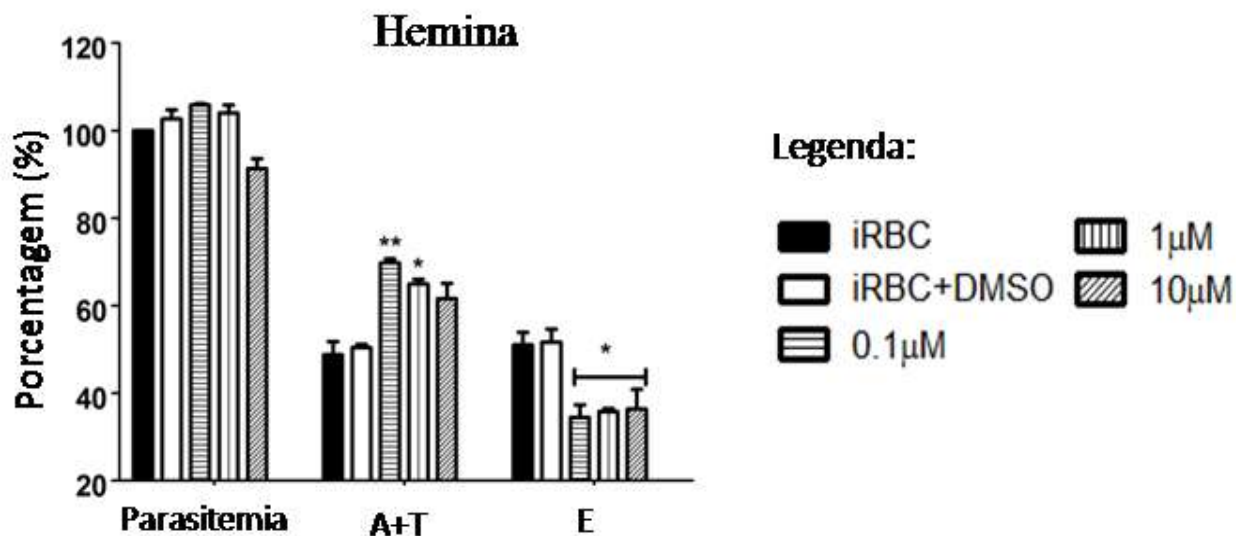
**Figura 42-**Determinação dos estágios intraeritrocíticos em *P. falciparum* em FACS.



Culturas de *P. falciparum* sincronizadas aplicadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur. Cultura contendo estágios de anel e trofozoíto (R + T, área sombreada) e de cultura contendo esquizonte (E, linha preta) formam dois histogramas (frequência de eventos vs fluorescência) distintos na região da fluorescência. RBC (eritrócitos não infectados). Amostrado  $10^5$  células em cada amostra.

Na **figura 43** demonstramos que a adição de hemina é capaz de modular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Na concentração  $0,1 \mu\text{M}$  hemina aumentou a proporção dos estágios de A+T ( $70 \pm 1\%$ ) e diminuiu a proporção de E ( $35 \pm 3\%$ ) comparado ao grupo que recebeu tratamento com DMSO (A+T:  $50 \pm 1\%$  e E:  $52 \pm 5\%$ ). Hemina na concentração  $1 \mu\text{M}$  apresentou efeito similar A+T ( $64 \pm 1\%$ ) e E ( $36 \pm 1\%$ ). A concentração de  $10 \mu\text{M}$  de hemina apresentou tendência a toxicidade (parasitemia:  $91 \pm 1\%$ ) na cultura de *P. falciparum*, isto implica que a modulação do ciclo do parasita nesta concentração se deve a mortalidade dos eritrócitos infectados em cultura.

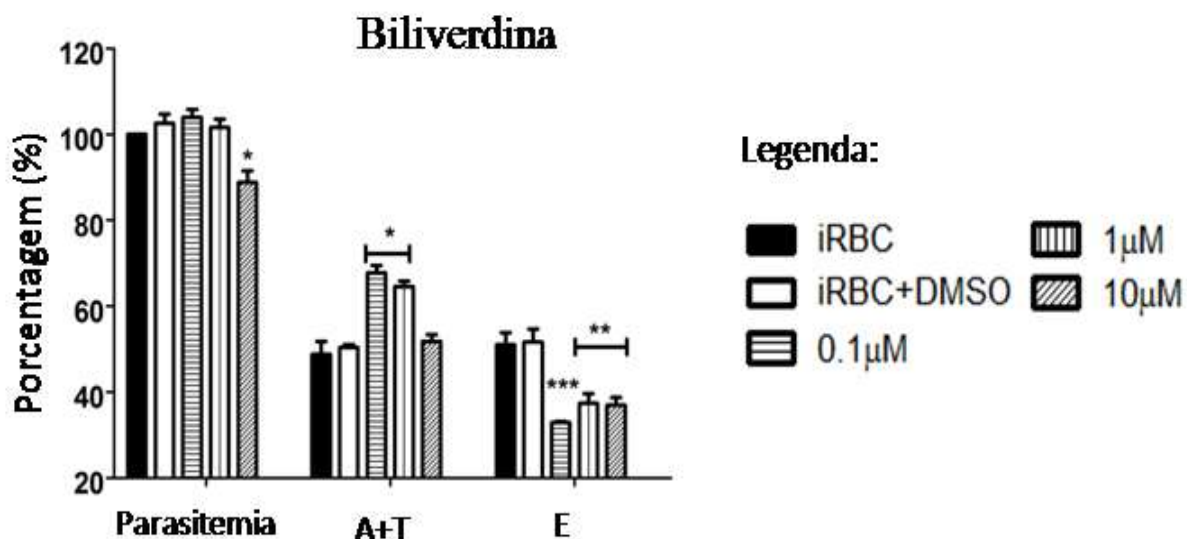
**Figura 43**-Efeito da hemina no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*.



O valor da parasitemia do grupo controle sem drogas ou de solventes (iRBC) foi considerado 100%. Todos os tratamentos foram comparados com o controle contendo apenas solvente (iRBC +DMSO). Estágios de desenvolvimento de *P. falciparum* foram separados em dois grupos: A+T (anel e torfozoíto) e E (esquizonte). Efeito de 0,1; 1 e 10  $\mu\text{M}$  de hemina na cultura de *P. falciparum*. Os gráficos representam média mais desvio padrão de três experimentos independentes. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

A incubação de 48 horas com biliverdina é capaz de modular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (**figura 44**). Biliverdina na concentração 0,1  $\mu\text{M}$  aumentou a proporção dos estágios de A+T ( $68 \pm 1\%$ ) e diminuiu a proporção de E ( $33 \pm 1\%$ ) comparado ao grupo que recebeu tratamento com DMSO (A+T:  $50 \pm 1\%$  e E:  $52 \pm 5\%$ ). Efeito similar foi observado na concentração 1  $\mu\text{M}$ , A+T ( $64 \pm 1\%$ ) e E ( $37 \pm 2\%$ ). A alteração na proporção dos estágios induzida pela BV não alterou a parasitemia. Biliverdina na concentração 10  $\mu\text{M}$  apresentou toxicidade para cultura (parasitemia  $89 \pm 3\%$ ).

**Figura 44**-Efeito da biliverdina no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*.

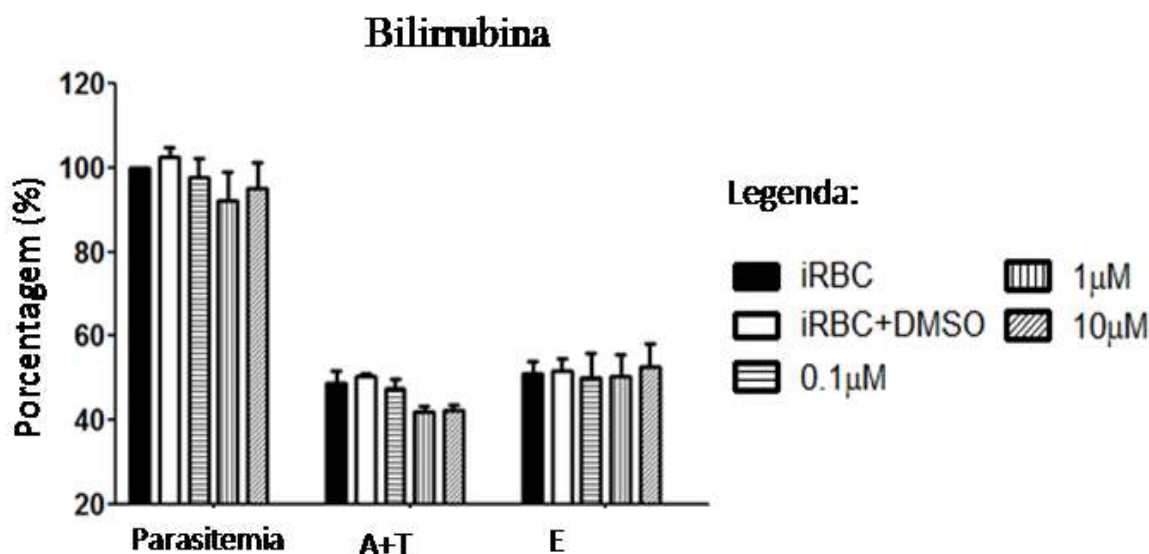


O valor da parasitemia do grupo controle sem drogas ou de solvente (iRBC) foi considerado 100%. Todos os tratamentos foram comparados com o controle contendo apenas solvente (iRBC +DMSO). Estágios de desenvolvimento de *P. falciparum* foram separados em dois grupos: A+T (anel e torfozoíto) e E (esquizonte). Efeito de 0,1; 1 e 10 μM de BV na cultura de *P. falciparum*. Os gráficos representam média mais desvio padrão de três experimentos independentes. \* P<0,05, \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001.

Diferente do observado com a hemina e biliverdina, a bilirrubina não foi capaz de modular os estágios intraeritrocíticos de *P. falciparum* (**figura 45**).

Este é o primeiro trabalho a revelar que a hemina e biliverdina são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico em *P. falciparum*.

**Figura 45**-Efeito da bilirrubina no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*.



O valor da parasitemia do grupo controle sem drogas ou de solventes (iRBC) foi considerado 100%. Todos os tratamentos foram comparados com o controle contendo apenas solvente (iRBC +DMSO). Estágios de desenvolvimento de *P. falciparum* foram separados em dois grupos: A+T (anel e torfozoíto) e E (esquizonte). Efeito de 0,1; 1 e 10 μM de bilirrubina. Os gráficos representam média mais desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 4.2.3.2 Busca por proteínas de *P. falciparum* capazes de se ligar a biliverdina

Demonstrada a capacidade da biliverdina em modular o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (**figura 44**), iniciamos uma investigação para identificar proteínas capazes de se ligarem a biliverdina neste parasita.

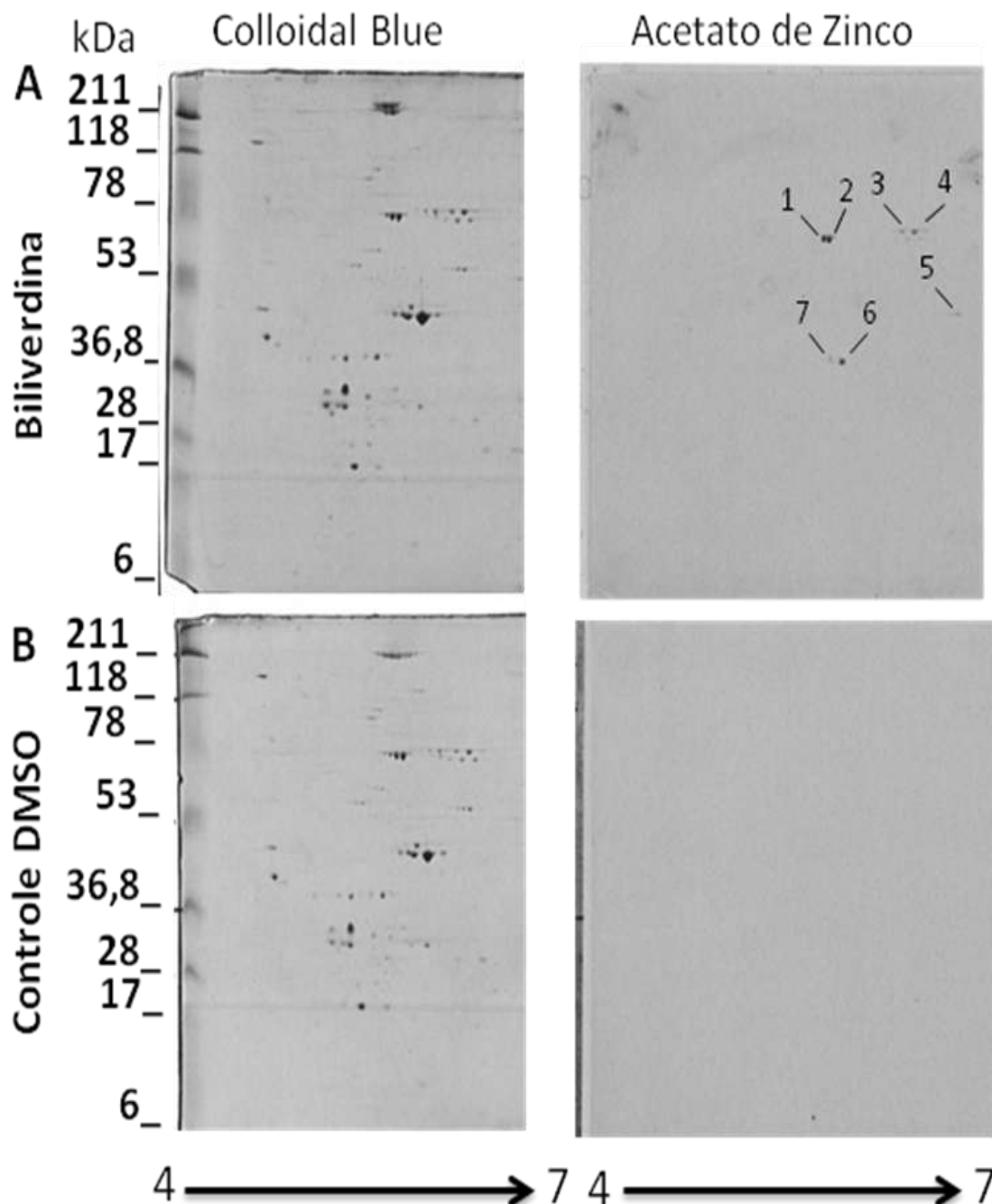
Para a identificação de proteínas que se ligam a biliverdina, adaptamos um protocolo sugerido por Berkelman et al. (1985). Neste protocolo, proteínas que interagem com BV quando expostas a uma solução rica em acetato de zinco apresentam fluorescência quando excitadas com comprimento de onda 450 nm.

Com esta técnica em mãos, usamos extratos de proteína de cultura de *P. falciparum* previamente tratadas com 20 μM de biliverdina por 30 minutos e de culturas tratadas com solvente DMSO (controle negativo). Aplicamos as amostras em um gel bidimensional como descrito no material e métodos.

Completada a isoeletrofocalização (primeira dimensão) e posterior corrida em gel de poliacrilamida (segunda dimensão), os geis foram incubados em solução contendo 1 mM de acetato de zinco por 30 minutos e os pontos fluorescentes nos geis foram captados em um

escaner Storm. Os géis foram corados (Colloidal Blue) para revelação das proteínas e as imagens foram comparadas para localizar a posição das proteínas que fluoresceram (**figura 46**).

**Figura 46**-Ensaio para identificação de proteína-biliverdina em gel bidimensional.



Em **A**: Extrato total de proteínas de *P. falciparum* pré-tratadas com 20  $\mu$ M de BV. Colloidal Blue (esquerda) revelando todas as proteínas. Mesmo gel tratado com acetato de zinco (direita) revelando 7 pontos (indicado pelos traços) positivos no ensaio de fluorescência. **B**: Extrato total de proteínas de *P. falciparum* pré-tratadas com volume de 0,5% de DMSO. Colloidal Blue (esquerda) revelando todas as proteínas. Mesmo gel tratado com Acetato de zinco (direita). Usadas tiras de 13 centímetros DryStrip (pH 4-7) carregados com 600  $\mu$ g de proteínas de *P. falciparum*

Na **figura 46 B** observamos que o gel carregado com as proteínas de *P. falciparum* tratadas com DMSO não apresentou pontos fluorescentes que coincidisse com a região das proteínas.

No gel que recebeu as amostras de proteína de *P. falciparum* pré-tratada com BV, foram observados sete pontos fluorescentes que coincidiram com proteínas (**figura 46 A**).

Os pontos revelados no gel foram removidos e enviados para análise no espectrômetro de massa (Taplin Mass Spectrometry) para identificação (**tabela 4**).

**Tabela 4** – Lista de proteínas identificadas no ensaio com biliverdina/acetato de zinco no gel bidimensional.

(continua)

<b>Número do ponto (spots)</b>	<b>Número de Acesso PlasmodB</b>	<b>Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada</b>	<b>Número total de peptídeos encontrados</b>	<b>Número de Peptídeos exclusivos encontrados</b>
<b>1</b>	Pf3D7_09	Proteína homóloga ao regulador de glicose	136	39
	Pf14_0517	Peptidase, putativa	22	19
	PfI0875w	Proteína “heat shock”	18	5
	Pf3D7_04	Proteína puntativa, não caracterizada	5	5
	Pf11_0245	Subunidade alfa do fator EF-1 de elongação e tradução, putativa	3	3
	Pf08_0054	Proteína “Heat shock” 70kDa	4	3
<b>2</b>	Pf3D7_09	Proteína homóloga ao regulador de glicose	161	49
	Pf14_0517	Peptidase, putativa	18	18
	Pf11_0245	Subunidade alfa do fator EF-1 de elongação e tradução, putativa	7	7
	PfIT_PFD0095c	Proteína exportada de Plasmodium (PHISTb), função desconhecida	8	7
<b>3</b>	Pf08_0054	Proteína “Heat shock” 70kDa	200	64
	Pf3D7_09	Proteína homóloga ao regulador de glicose	24	14
<b>4</b>	Pf08_0054	Proteína “Heat shock” 70kDa	416	91
	Pf3D7_09	Proteína homóloga ao regulador de glicose	11	9



**Tabela 4** – Lista de proteínas identificadas no ensaio com biliverdina/acetato de zinco no gel bidimensional.

(conclusão)				
Número do ponto (spots)	Número de Acesso PlasmodB	Nome de Proteína de <i>P. falciparum</i> Identificada	Número total de peptídeos encontrados	Número de Peptídeos exclusivos encontrados
	PfC0915w	RNA helicase dependente de ATP, putativa	6	5
<b>5</b>	Pf10_0155	Enolase	407	68
	PfL1110c	Subunidade regulatória de proteína quinase dependente de AMPc	3	3
<b>6</b>	PFL2215w	Actina-1	58	12
	MAL8P1.69	Proteína 14-3-3, putativa	7	7
	Pf14_0124	Actina-2	4	3
<b>7</b>	PFL2215w	Actina-1	185	48
	Pf14_0124	Actina-2	16	14
	PfF03535w	Ornitina aminotransferase	8	8
	PFIT_PF14_0655	Helicase	5	5
	PFTI_PFL0185c	Proteína de nucleossomo	4	4
	MAL8P1.69	Proteína 14-3-3, putativa	3	3

Nesta análise não foram consideradas proteínas com menos de 3 peptídeos exclusivos identificados (limite mínimo para validar a presença da proteína em uma amostra). O ensaio revelou a enzima a enolase (número de acesso no Plasmodb: Pf10\_0155), localizada no ponto 5 no gel (**figura 46 A**), como um interessante candidato a uma proteína ligante ao BV.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Papel do IP<sub>3</sub> na transdução de sinal em *P. falciparum*

#### 5.1.1 Mobilização de Ca<sup>2+</sup> na presença do segundo mensageiro IP<sub>3</sub> em *Plasmodium*

##### 5.1.1.1 Probenecide é importante nos ensaios de medição de Ca<sup>2+</sup> em *P. falciparum*

O probenecide, um derivado lipossolúvel do ácido benzóico, é capaz de inibir os transportadores de ânions orgânicos sendo utilizado para evitar a compartimentalização e a extrusão de marcadores fluorescentes de Ca<sup>2+</sup> (Di Virgilio et al., 1990; Gazarini et al., 2003).

Biagini et al. (2003) e Rohrbach et al. (2005) demonstraram que os indicadores fluorescentes de Ca<sup>2+</sup> são acumulados nos compartimentos ácidos em *Plasmodium* comprometendo as medições de Ca<sup>2+</sup> citossólicos no estágio intraeritrocítico. Entretanto, a adição de 40 µM de probenecide utilizado em nosso protocolo foi o suficiente para evitar a compartimentalização do Fluo 4-AM e do caged-IP<sub>3</sub> (**figura 8**).

Sem o uso do probenecide, não foi possível observar a mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida pela fotoliberação do IP<sub>3</sub> e pelo bloqueio a Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) promovida pela taptisgargina (**figura 8 A**). O contínuo decréscimo da linha basal observada na **figura 8 A** indica a constante e gradual remoção do Fluo 4-AM no citoplasma do parasita não tratado com probenecide. Nossos dados corroboram com trabalho de Di Virgilio et al. (1990) e Gazarini et al. (2003), uma vez que o uso do probenecide se faz necessário para detectar mudanças de Ca<sup>2+</sup> citossólico em eritrócitos infectados com *P. falciparum*.

##### 5.1.1.2 *P. falciparum* no estágio trofozoíto em seu ambiente natural é capaz de mobilizar Ca<sup>2+</sup> na presença do IP<sub>3</sub>

A capacidade do parasita *P. falciparum* no estágio de trofozoíto dentro do eritrócito de mobilizar Ca<sup>2+</sup> na presença do segundo mensageiro IP<sub>3</sub> foi testada com uso do caged-IP<sub>3</sub> permeável.

O desenvolvimento do caged-IP<sub>3</sub> permeável a membranas celulares (Dakin et al., 2007) permitiu manipular os níveis de IP<sub>3</sub> citossólico em condições fisiológicas e demonstrou ser uma ferramenta conveniente ao estudo nas formas intraeritrocíticas de *Plasmodium* uma

vez que o caged-IP<sub>3</sub> deve atravessar a membrana do eritrócito, a membrana do vacúolo parasitóforo e a membrana do parasita para enfim chegar e se acumular no citoplasma do *Plasmodium*.

Passos et al. (1998) trabalharam com IP<sub>3</sub> não permeável e por isto precisou isolar e permeabilizar *P. chabaudi* para demonstrar a sensibilidade do parasita ao IP<sub>3</sub>. Este experimento bioquímico foi um importante passo para demonstrar a existência de uma maquinaria capaz de perceber o IP<sub>3</sub> em *Plasmodium*. Na fisiologia celular, a permeabilização da membrana interfere com sua homeostase de Ca<sup>2+</sup>, importante mecanismo que regula o funcionamento do próprio receptor de IP<sub>3</sub> (Taylor et al., 2002). Neste aspecto, nossos dados complementam o trabalho de Passos et al. (1998).

A **figura 9** revela um aumento transiente do Ca<sup>2+</sup> após a fotoliberação do IP<sub>3</sub> em um eritrócito infectado marcado com Fluo 4-AM e caged-IP<sub>3</sub> durante 45 minutos, tempo suficiente para causar a de-esterificação destes marcadores em células de mamífero (Smith et al., 2009).

Outra grande vantagem do uso do caged-IP<sub>3</sub> está no controle da liberação do IP<sub>3</sub> de forma rápida e não invasiva: através do pulso de luz ultravioleta (UV). Entretanto, Christ et al. (2005) demonstraram danos a membrana induzida por luz ultravioleta que culmina no aumento da permeabilidade celular. Uma vez que fotoliberação do IP<sub>3</sub> é induzida por um pulso de luz UV, foi necessário certificar que o Ca<sup>2+</sup> mobilizado observado em nossos resultados não se deve a algum dano ou efeito tóxico induzido pela luz UV. Eritrócitos infectados e não infectados marcados apenas com Fluo 4-AM não apresentaram mobilização de Ca<sup>2+</sup> na presença do pulso UV indicando que o UV não é capaz de induzir Ca<sup>2+</sup> em nosso protocolo. Em eritrócito infectado sem caged-IP<sub>3</sub> submetidos a séries de pulso UV a adição de 5 µM de tapsigargina liberou Ca<sup>2+</sup> indicando que este íon estava passível em ser mobilizado pelo parasita (**figura 10**). Este controle é importante, pois demonstra que energia do pulso UV canalizada com a objetiva de 40 vezes não é suficiente para causar mobilização de Ca<sup>2+</sup> e nem impede do Ca<sup>2+</sup> ser mobilizado posteriormente por outros fármacos como tapsigargina e cloroquina.

Eritrócitos humanos maduros não possuem núcleo e diversas organelas, incluindo retículo endoplasmático (Grasso et al., 1962). Era esperada a incapacidade destas células em mobilizar Ca<sup>2+</sup> tanto na presença de IP<sub>3</sub> e de tapsigargina (**figura 11**). Este dado demonstra que a mobilização de Ca<sup>2+</sup> em eritrócitos infectados induzida por IP<sub>3</sub> observada na **figura 9** teve origem no parasita.

Este é o primeiro trabalho a usar o sistema de fotoliberação do IP<sub>3</sub> no grupo Apicomplexa, por extensão, o primeiro a demonstrar fisiologicamente a capacidade do *P. falciparum* em seu ambiente natural em liberar Ca<sup>2+</sup> induzido por IP<sub>3</sub> sem a necessidade de usar agonistas que estimulem a PLC.

### 5.1.1.3 *Retículo endoplasmático é o principal estoque de Ca<sup>2+</sup> sensível ao IP<sub>3</sub> em P. falciparum*

Trabalhos com *Plasmodium* isolados e permeabilizados sugeriram a existência de dois compartimentos capazes de armazenar Ca<sup>2+</sup>: retículo endoplasmático (ER) e vacúolos ácidos (Passos et al., 1998; Varotti et al., 2003).

Em mamíferos, o retículo endoplasmático é o principal estoque de Ca<sup>2+</sup> sensível ao IP<sub>3</sub> (Streb et al., 1983). Passos et al. (1998) observaram a mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub> em *P. chabaudi* isolados e permeabilizados mesmo após depletar os estoques do retículo endoplasmático, sugerindo que os compartimentos ácidos são sensíveis ao IP<sub>3</sub> neste parasita.

Entretanto, ao depletar os estoques de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático em *P. falciparum* com tapsigargina, não observamos mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub>. Este dado sugere que os compartimentos ácidos de *P. falciparum* não são sensíveis ao IP<sub>3</sub> e confirma que o retículo endoplasmático é a principal compartimento sensível ao IP<sub>3</sub> neste parasita (**figura 12**).

A discrepância quanto aos compartimentos sensíveis ao IP<sub>3</sub> no trabalho de Passos et al. (1998) com este trabalho pode refletir a distância evolutiva (**figura 1**) entre *P. falciparum* e *P. chabaudi* (malaria de roedor) quanto a distribuição dos receptores de IP<sub>3</sub>. É importante ressaltar que neste trabalho a sensibilidade ao IP<sub>3</sub> foi testada em condições mais próximas do fisiológico. Interessante que um único pulso de UV não é capaz de liberar todo o IP<sub>3</sub> do caged-IP<sub>3</sub>, células endoteliais de mamíferos e tubo polínico de *Agapanthus* marcadas com caged-IP<sub>3</sub> respondem a mais de uma rodada de liberação de IP<sub>3</sub> (Monteiro et al., 2005; Rainbow et al., 2009). Em nosso protocolo, usamos a concentração de 2 μM de caged-IP<sub>3</sub>, sendo que apenas uma parte é liberada pelo pulso de UV.

Huang et al. (2012) demonstraram que os compartimentos ácidos do parasita *Trypanosoma brucei* possuem receptor de IP<sub>3</sub> e que estes são capazes de mobilizar Ca<sup>2+</sup> com a fotoliberação do IP<sub>3</sub>. Entretanto, para observar a liberação de Ca<sup>2+</sup> nos compartimentos ácidos os autores precisaram marcar o parasita com 10 μM de caged-IP<sub>3</sub> (cinco vezes mais a

concentração usada em nosso protocolo) e excitar a fotoliberação do IP<sub>3</sub> com seis pulsos de luz UV. Este fato indica que é necessária uma grande concentração de IP<sub>3</sub> para estimular a mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos compartimentos ácidos em *T. brucei*. Em *P. falciparum* marcados com caged-IP<sub>3</sub> não exploramos a mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos compartimentos ácidos com múltiplos estímulos de luz UV e com concentrações maiores de 2 μM de caged-IP<sub>3</sub>. Neste caso, há a possibilidade do *P. falciparum* ter compartimentos ácidos sensíveis ao IP<sub>3</sub>, porém esta mobilização é alcançada em concentrações de IP<sub>3</sub> superiores ao necessário para mobilizar Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático.

#### 5.1.1.4 Sensibilidade ao IP<sub>3</sub> em diferentes estágios de desenvolvimento do *P. falciparum*

Neste trabalho mostramos a sensibilidade de *P. falciparum* ao IP<sub>3</sub> no estágio trofozoíto (aproximadamente 24 horas após a invasão), entretanto o mesmo não foi observado em esquizonte (aproximadamente 36 horas após a invasão)(**figura 13**).

Este dado demonstra que a sensibilidade de *P. falciparum* ao IP<sub>3</sub> não é constante no seu desenvolvimento intraeritrocítico levantando a interessante possibilidade da maquinaria de sinalização PLC/IP<sub>3</sub>R ser regulada de forma diferencial durante o desenvolvimento do parasita.

Quinases dependentes de Ca<sup>2+</sup> e outras proteínas ligantes a este íon são expressas de forma diferencial tanto na fase sexuada quanto na assexuada em *Plasmodium* (Doerig et al., 2008; Koyama et al., 2009; Tsim et al., 1997; Vaid et al., 2006; Vaid et al., 2008).

Diversos trabalhos demonstram a importância do Ca<sup>2+</sup> para a liberação do parasita do eritrócito. Dvorin et al. (2010) demonstraram que esquizontes segmentados usam uma proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup> (PfCDPK5) para se liberar do eritrócito. Outra proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup> (PfPKB) participa do processo de reinvasão pelos merozoítos (Koyama et al., 2009; Vaid et al., 2006). Merozoítos também mobilizam Ca<sup>2+</sup> quando ocorrem mudanças nas concentrações do íon K<sup>+</sup> quando estes saem do eritrócito (Singh et al., 2010). A mobilização de Ca<sup>2+</sup> nos merozoítos assim como a ativação da PfPKB podem ser bloqueadas na presença do U73122 (inibidor da PLC) implicando que nestes estágios o parasita depende da sinalização por IP<sub>3</sub>.

Neste trabalho, foi observada a mobilização de Ca<sup>2+</sup> pelo esquizonte na presença de tapsigargina (**Figura 13**) indicado a integridade do vacúolo parasitóforo (estrutura importante para manter os estoques de Ca<sup>2+</sup> no parasita, Gazarini et al., 2003). É possível que em

esquizontes seja necessária uma concentração de IP<sub>3</sub> maior para mobilizar Ca<sup>2+</sup> do RE comparado ao trofozoíto, neste caso a concentração de receptores de IP<sub>3</sub> localizada no RE não seria uniforme durante o ciclo intraeritrocítico.

Devido à limitações técnicas relacionadas à objetiva do microscópio e a forma como esta concentra a energia do pulso UV, ficamos limitado ao uso de uma objetiva 40x. Neste aumento não conseguimos observar de forma satisfatória os parasitas no estágio de anel e na forma de merozoítos.

### **5.1.2A via de sinalização da melatonina inclui a geração do IP<sub>3</sub> em *P. falciparum***

#### *5.1.2.1 Melatonina mobiliza Ca<sup>2+</sup> através da via dependente de IP<sub>3</sub> em *P. falciparum**

Neste trabalho mostramos que a melatonina induz um aumento transiente de Ca<sup>2+</sup> similar ao padrão observado da resposta de indução de Ca<sup>2+</sup> induzida pelo segundo mensageiro IP<sub>3</sub> (**figura 14** e **figura 9**, respectivamente) sugerindo a ativação da via que culmina na produção de IP<sub>3</sub>. Entretanto, com o uso do mio-inositol radioativo, obtivemos a primeira evidência direta de que a melatonina aumenta os níveis de inositol fosfato (IP<sub>3</sub>/IP<sub>4</sub>) intracelular no parasita da malária (**figura 15**).

Elabbadi et al. (1994) demonstraram um aumento dos níveis de inositol fosfato em *P. falciparum* marcados com [H<sup>3</sup>]-mio-inositol com o uso da ionomicina (ionóforo de Ca<sup>2+</sup>), razão pela qual escolhemos esta droga como um controle positivo (**figura 15**).

Em células de mamífero é possível separar o IP<sub>3</sub> dos outros inositois fosfatos (IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub> e IP<sub>4</sub>) (Thomas et al., 1984), entretanto devido a um baixo número de eritrócitos infectados (parasitemia em torno de 10%) e o fato do parasita ocupar apenas uma fração do volume do eritrócito, não foi possível obter sinal forte o suficiente para medir separadamente os inositois fosfatos. Outro fator que limita a marcação de *P. falciparum* com [H<sup>3</sup>]-mio-inositol e enfraquece o sinal na medição dos inositois fosfatos é a presença de mio-inositol não marcado no plasma (Fisher et al., 2002). Para contornar o problema do baixo sinal, usamos a coluna de troca iônica para eluir os isômeros de IP<sub>3</sub> e IP<sub>4</sub> juntos. A principal via de formação do IP<sub>4</sub> é através da fosforilação do IP<sub>3</sub> (Irvine et al., 1986), assim avaliar o IP<sub>3</sub> e IP<sub>4</sub> juntos reflete os níveis do segundo mensageiro IP<sub>3</sub> produzido na célula. O pré-tratamento das células com cloreto de lítio (LiCl) foi necessário para evitar a desfosforilação dos inositois fosfatos (Elabbadi et al., 1994; Irvine et al., 1985; Thomas et al., 1984).

As concentrações de melatonina abaixo de 100  $\mu\text{M}$  não causaram um aumento significativo do  $\text{IP}_3/\text{IP}_4$ . Incubações de 48 horas com melatonina em concentrações abaixo de 1  $\mu\text{M}$  são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico em *P. falciparum* (Beraldo et al., 2005; Hotta et al., 2000; Schuck et al., 2011). Entretanto o estímulo induzido pela melatonina neste trabalho foi de apenas 20 minutos. Embora a melatonina seja relativamente hidrofóbica e capaz de atravessar as membranas do eritrócito, não podemos ter certeza da concentração de melatonina que de fato chega ao parasita durante 20 minutos de estímulo. Assim, uma concentração mais alta de melatonina seja necessária para alcançar a liberação máxima de inositol fosfato neste curto espaço de tempo.

Hotta et al. (2000) reportaram que o hormônio melatonina induz mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  em *P. chabaudi* e *P. falciparum* sendo que esta resposta é abolida na presença do U73122 (inibidor de fosfolipase C). Importante ressaltar que neste trabalho conseguimos mostrar a relação melatonina/ativação da PLC sem a necessidade de drogas inibitórias, evitando efeitos inespecíficos potencialmente produzidos por estes fármacos.

Em mamíferos os receptores de melatonina podem se associar à proteína G que provoca a ativação da PLC e geração de  $\text{IP}_3$  (Brydon et al., 1999; Lai et al., 2002; Steffens et al., 2003), esta via de sinalização ativada pela melatonina já foi demonstrada em melanócitos de *Xenopus* (Mullins et al., 1997) e dinoflagelados (grupo-irmão dos Apicomplexas) (Tsim et al., 1997). A ausência de uma proteína G identificada no genoma de *Plasmodium* sugere que a identidade do receptor de melatonina em *P. falciparum* seja distinta do hospedeiro humano. Uma forte evidência que sugere a existência de uma proteína G em *P. falciparum* é o fato do inibidor luzindol inibe a resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina (Hotta et al., 2000). Luzindol é um antagonista clássico para o receptor de melatonina (Dubocovich, 1988).

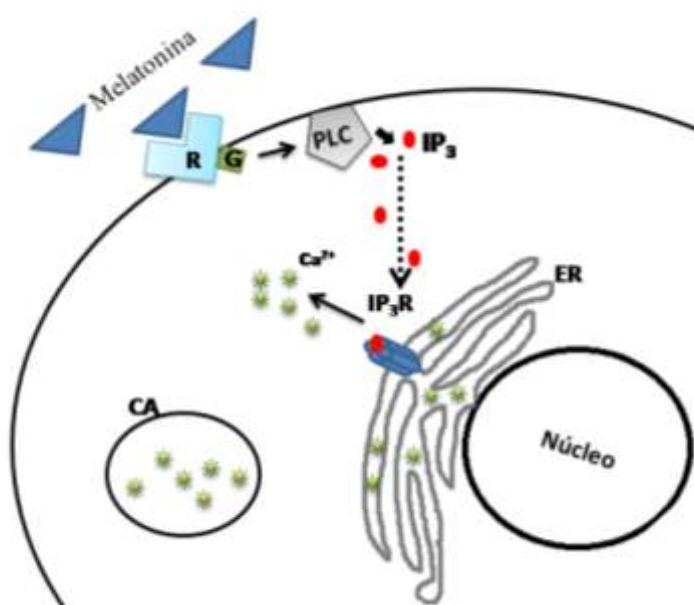
A maior parte dos eritrócitos infectados com *P. falciparum* não conseguiu mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de  $\text{IP}_3$  após mobilização deste íon induzida pela melatonina (**figura 16**) indicando uma saturação dos receptores de  $\text{IP}_3$  desencadeada pela melatonina. Interessante ressaltar que entre a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina e a liberação do  $\text{IP}_3$  teve um intervalo maior que 60 segundos. Este dado revela que os receptores de  $\text{IP}_3$  em *P. falciparum* levam um tempo longo para recuperar a sensibilidade ao  $\text{IP}_3$ . A adição de mais  $\text{IP}_3$  durante a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela melatonina não alterou o aspecto transiente da resposta (**figura 17 B**). Este dado revela que a melatonina é um agonista capaz de saturar os receptores de  $\text{IP}_3$  em *P. falciparum*. Infelizmente, sem o conhecimento da proteína que atua



como receptor de IP<sub>3</sub> em *Plasmodium* é difícil inferir a sensibilidade deste receptor ao IP<sub>3</sub>, sua modulação e densidade no retículo endoplasmático.

Considerando a literatura e os dados deste trabalho, defendemos a hipótese de que a melatonina em *P. falciparum* ativa a PLC via proteína G para gerar o segundo mensageiro IP<sub>3</sub> que culmina na liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático (**figura 47**)

**Figura 47**-Esquema da via de sinalização estimulada pela melatonina em eritrócitos infectados com *P. falciparum* no estágio trofozoíto.



R: receptor de melatonina. G: proteína G. PLC: fosfolipase C. IP<sub>3</sub>R: receptor de IP<sub>3</sub>. ER: retículo endoplasmático. CA: Compartimento ácido.

Fonte: Baseado Alves et al. (2010); Beraldo et al. (2005); Hotta et al. (2000).

### 5.1.3 Uso do modulador IP<sub>3</sub>-esponja e do sensor de IP<sub>3</sub> IRIS em *Plasmodium falciparum*

#### 5.1.3.1 IP<sub>3</sub>-esponja e IRIS expresso epissomalmente em *P. falciparum* no vetor pARL

IP<sub>3</sub> esponja, um peptídeo de 380 aminoácidos derivado do sítio de ligação do receptor de IP<sub>3</sub> do tipo I de camundongos (Uchiyama et al., 2002) possui a capacidade de se ligar ao IP<sub>3</sub> sem exercer qualquer atividade fisiológica, atuando assim como um tampão de IP<sub>3</sub> celular. Usui-Aoki et al. (2005), com a expressão do IP<sub>3</sub> esponja nas células gustativas em drosófilas, conseguiram dessensibilizar a percepção do sabor doce em drosófilas confirmando que via de

sinalização para percepção do sabor doce neste inseto depende da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{IP}_3$ .

O sensor de  $\text{IP}_3$  denominado IRIS é derivado do mesmo sítio de ligação do qual o  $\text{IP}_3$  esponja é formado, entretanto não se liga com a mesma afinidade que o  $\text{IP}_3$  esponja sendo usado como um sensor de  $\text{IP}_3$  celular graças à inserção de duas proteínas fluorescente (Venus e ECFP) (Matsu-ra et al.,2006).

Neste trabalho tentamos expressar epissomalmente em *P. falciparum* o  $\text{IP}_3$  esponja e o IRIS com o uso de um vetor de expressão constitutiva pARL (Struck et al., 2005) (**figuras 18 e 19**, respectivamente). Entretanto não obtivemos parasitas expressando  $\text{IP}_3$  esponja e IRIS. Usando o mesmo protocolo de transfecção, parasitas transfectados com o vetor pARL contendo apenas GFP foram observados após três semanas de seleção(**figura 20**). Estes dados sugerem que a expressão epissomal do  $\text{IP}_3$  esponja e IRIS, regulada pela região promotora do transportador resistente a cloroquina (um promotor constitutivo) impedem a viabilidade celular de *P. falciparum*.

Enmoto et al. (2012) demonstraram que a inibição da via de sinalização do  $\text{IP}_3$  através do uso do inibidor do  $\text{IP}_3\text{R}$  (2-APB) compromete a viabilidade celular do *P. falciparum* em apenas 40 horas. Neste trabalho, Enmoto et al. (2012) acompanharam a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  espontânea em eritrócitos infectados com anéis e trofozoítos, entretanto a adição de  $100 \mu\text{M}$  2-APB em cultura bloqueou a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  nestas células comprometendo o desenvolvimento intraeritrocítico em *P. falciparum*. Este dado demonstra que a via de sinalização dependente de  $\text{IP}_3$  é importante para a viabilidade deste parasita. Interessante ressaltar que 2-APB foi capaz de comprometer a viabilidade celular de cepas resistentes a cloroquina, indicando o potencial antimalárico na inibição do  $\text{IP}_3\text{R}$ .

Para obter uma transfecção epissomal em *P. falciparum* é necessária uma constante seleção por pelo menos 21 dias (Fidock et al.,1998). Se considerarmos que o  $\text{IP}_3$  esponja e o IRIS, ambos capazes de se ligar ao  $\text{IP}_3$  celular, deva interferir com a sinalização dependente de  $\text{IP}_3$ , 21 dias (cerca de 10 ciclos completos da fase intraeritrocítica de *P. falciparum*) na presença destas proteínas deve ser tempo suficiente para impedir a viabilidade celular comprometendo o sucesso da transfecção.

Raabe et al. (2011) conseguiram expressar em *P. berghei* uma sonda capaz de se ligar tanto ao fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) quanto ao  $\text{IP}_3$ . Esta sonda reconhece o domínio PH (Pleckstrin) da PLC $\delta$ 1 humana (Violin et al., 2003) e não impede que o  $\text{IP}_3$  se ligue ao receptor e atue como segundo mensageiro, evitando assim qualquer efeito tóxico

causado pela remoção do IP<sub>3</sub> celular. Neste trabalho, gametócitos expressando a sonda fluorescente apresentam a fluorescência na membrana (onde se localiza a PIP<sub>2</sub>). Porém quando estas células foram excitadas com ácido xanturênico (pequeno composto presente no trato intestinal do mosquito capaz de estimular a gametogênese em *Plasmodium* através da mobilização de Ca<sup>2+</sup>) foi observado um deslocamento da fluorescência da membrana para o citoplasma destas células, indicando a formação do IP<sub>3</sub>. Este trabalho é também uma evidência de que a PLCδ em *Plasmodium* atua na via de sinalização PLC/IP<sub>3</sub>.

Uma interessante estratégia para obter com sucesso parasitas expressando proteínas que se ligam ao IP<sub>3</sub> como o IRIS e IP<sub>3</sub> esponja é o uso de vetores que permitam um sistema de expressão induzível em *Plasmodium*.

#### **5.1.4 Busca pelo receptor de IP<sub>3</sub> em *P. falciparum***

##### *5.1.4.1 Coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> e busca por bioinformática*

A capacidade do *P. falciparum* em mobilizar Ca<sup>2+</sup> na presença do IP<sub>3</sub> demonstrada neste trabalho revela a existência de uma proteína que atua como receptor de IP<sub>3</sub> neste parasita.

Hirata et al. (1990) desenvolveram uma coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> e demonstrou que esta coluna era capaz de purificar enzimas que desfosforilam IP<sub>3</sub> de extrato de proteína obtido de cérebros de ratos. Basicamente, esta coluna consiste em um IP<sub>3</sub> associado a um grupo químico capaz de se ligar de uma forma estável a uma coluna de sefarose.

Kishigami et al. (2001) utilizaram uma coluna similar e conseguiu purificar e identificar uma fosfolipase C (PLC) do extrato de proteínas de células do olho de polvo. Entretanto, com o surgimento e acesso aos dados dos sequenciamentos dos genomas, passou ser mais prático e barato encontrar proteínas que participam da via de sinalização dependente de IP<sub>3</sub> através de técnicas de bioinformática (por exemplo, o BLAST), usando a sequências de DNA e proteínas já caracterizadas em outros grupos.

Seguindo esta abordagem, Prole et al. (2011) usaram as regiões conservadas dos receptores de IP<sub>3</sub> e receptor e de rianodina (RyR) em mamíferos no genoma de *P. falciparum*. Porém este grupo não encontrou nenhum gene candidato para receptor de IP<sub>3</sub> nos parasitas do grupo dos Apicomplexa (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Babesia*). Apesar das crescentes

evidências de que o *Plasmodium* usa IP<sub>3</sub> como segundo mensageiro, os domínios conservados do IP<sub>3</sub>R em animais não são encontrados no genoma de *Plasmodium*, indicando que no Apicomplexa estes receptores sejam mais similares com as plantas (Nagamune et al., 2006).

As plantas terrestres de fato se encontram em uma situação similar a de *Plasmodium* quanto à caracterização do receptor de IP<sub>3</sub>. Há evidência de que receptores de IP<sub>3</sub> e/ou rianodina participam na sinalização de Ca<sup>2+</sup> dependente estimulada por ácido abscísico em células guardas (Meimoun et al., 2009). Monteiro et al. (2005) demonstram a capacidade das células do tubo polínico de *Agapanthus* de mobilizar Ca<sup>2+</sup> induzida pela fotoliberação do IP<sub>3</sub>. Lin et al. (2004), usando a técnica de microarray, tentaram identificar genes relacionados a via de sinalização por inositol, entretanto os candidatos apontados pela técnica não atuam como IP<sub>3</sub>R em plantas. O uso do BLAST tendo como sonda a região de ligação do receptor de IP<sub>3</sub> em camundongos não revelou nenhum candidato em nenhum genoma em *Arabidopsis* e genoma de arroz (Krinke et al., 2007).

Mesmo o uso dos algoritmos derivados do modelo oculto de Markov (Eddy, 1998), uma técnica mais sensível em detectar homologias em proteínas remotas, não encontrou candidatos ao receptor de IP<sub>3</sub> em plantas (Krinke et al., 2007).

Uma vez que as ferramentas de bioinformática ainda não apontaram candidatos para receptor de IP<sub>3</sub> em *Plasmodium*, usamos uma coluna de cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub>. (Ver material e métodos) baseado no protocolo de Hirata et al. (1990).

Com o uso da cromatografia de afinidade ao IP<sub>3</sub> conseguimos resgatar no extrato de fígado de camundongos o receptor de IP<sub>3</sub> do tipo I e III (**Tabela 1**). Embora um número alto de proteínas de fígado de camundongo (ao todo 1549) tenha se mantido na coluna mesmo após as lavagens, nossa técnica conseguiu resgatar estes dois receptores em quantidades bem acima do limite de sensibilidade do espectrômetro de massa. O limite seguro para indicar a presença de uma proteína na amostra é a detecção de pelo menos 3 peptídeos exclusivos desta proteína. O receptor de IP<sub>3</sub> tipo I apresentou 14 peptídeos exclusivos enquanto o receptor do tipo II apresentou 10. Uma fosfolipase C $\delta$  foi resgatada da coluna (3 peptídeos exclusivos).

Este resultado demonstra a capacidade da coluna em se ligar a um receptor de IP<sub>3</sub> mesmo na presença de diversas proteínas capazes de degradar o IP<sub>3</sub> no extrato. Usando o mesmo protocolo, tentamos encontrar proteínas candidatas ao receptor de IP<sub>3</sub> em *P. falciparum*.

Diferentemente do camundongo, em que as proteínas da via de sinalização dependente de  $IP_3$  são bem conhecidas e caracterizadas, foi necessário adicionar um controle negativo (uma coluna contendo somente sefarose-estreptavidina) para identificar as proteínas de *P. falciparum* que se ligam a matriz de sefarose. Excluindo as proteínas de *P. falciparum* do controle negativo com as proteínas da coluna contendo  $IP_3$  que recebeu extrato de proteína de *P. falciparum*, obtivemos 206 proteínas. Entretanto, como as propriedades do receptor de  $IP_3$  em Apicomplexa e em plantas são desconhecidas, o único critério estrutural utilizado neste trabalho para selecionar um candidato ao receptor de  $IP_3$  foi a presença de ao menos um domínio transmembrânico.

Todos os receptores de  $IP_3$  já caracterizados apresentam ao menos um domínio transmembrânico que permite o receptor se acoplar a uma membrana. Usando esta triagem nas 206 proteínas exclusivas da coluna contendo  $IP_3$  com extrato de *P. falciparum*, chegamos ao número de 51 potenciais candidatos ao  $IP_3R$  (**tabela 2**).

É possível que o receptor de em *Plasmodium* seja formado por um complexo de diferentes proteínas e que sua funcionalidade como receptor só seja obtida com a correta interação entre elas. Isto explicaria em parte, do por que as técnicas de bioinformática ainda não conseguiram resgatar um candidato usando como modelo o receptor de  $IP_3$  atualmente conhecidos que são formadas da interação de um único tipo de proteína. Neste caso, é possível que uma ou mais das proteínas candidatas indicadas neste trabalho faça parte deste complexo.

Como qualquer busca a uma proteína desconhecida, cada etapa de seleção usada em nosso protocolo envolve um risco de excluir a proteína que de fato atua como receptor de  $IP_3$ . Se a proteína que atua como receptor de  $IP_3$  em *Plasmodium* for capaz de se ligar a sefarose, a exclusão das proteínas em comum do controle negativo com a do grupo Pf(+) (**figura 19**) irá remover o candidato ao  $IP_3R$  da análise. Neste caso, uma abordagem que levasse em consideração a abundância das proteínas entre estes grupos seria uma forma mais segura de analisar os dados, ao custo de obter uma lista maior de candidatos. Se o  $IP_3R$  em *Plasmodium* for uma proteína pouco abundante, há a possibilidade de que mesmo com o enriquecimento deste receptor com a coluna, este não atinja a sensibilidade do equipamento de identificar a proteína. Importante ressaltar que o uso de uma coluna de cromatografia por afinidade ao  $IP_3$  para obter candidatos ao receptor de  $IP_3$  em Apicomplexa nunca foi relatado na literatura.

Se por um lado a diferenças entre os  $IP_3R$  entre os animais e *Plasmodium* dificulta a identificação desta proteína no parasita da malária, por outro aumenta o interesse como alvo

farmacológico. Nossos dados demonstram a importância desta proteína na transdução de sinais ativada pela melatonina e a importância deste receptor na viabilidade celular. Há um longo caminho para identificação e caracterização de um IP<sub>3</sub>R em *Plasmodium*. Esta é uma peça ainda desconhecida na sinalização de importantes grupos como o Apicomplexa.

## 5.2 Papel da heme oxigenase em *P. falciparum*

### 5.2.1 Atividade Biliverdina Redutase (BVR) da PfHO

A degradação da hemoglobina é a principal fonte de aminoácidos durante o desenvolvimento intraeritrocítico do *Plasmodium* (Langreth, 1976), entretanto neste processo libera a hemina, uma molécula com efeitos tóxicos (Van der Zee et al., 1996). O sequestro da hemina para formar um polímero de hemozoína ( $\beta$ -hematina) é o mecanismo de detoxificação mais importante nas espécies de *Plasmodium* (Sherman et al., 1965).

A descoberta e caracterização da enzima heme oxigenase em *P. falciparum* (Okada, 2009) levantou a possibilidade do parasita em usar a via de detoxificação da hemina que culmina na formação de BV e BR (**figura 7**). Neste trabalho, Okada (2009) demonstrou que a heme oxigenase de *P. falciparum* (PfHO) é capaz de se ligar a hemina e convertê-la em BR na presença de um quelante de ferro (ferrodoxina e deferoxamina). Okada trabalhou com a enzima editada sem o peptídeo sinal que sinaliza o transporte da proteína para o apicoplasto. Sartorello et al. (2010) também demonstraram a atividade heme oxigenase da PfHO em se ligar ao hemina e convertê-la em bilirubina. Neste trabalho, usaram a enzima com o peptídeo sinal. O peptídeo sinal da PfHO (formado por 18 aminoácidos) sinaliza a exportação da proteína no apicoplasto do parasita além de ajudar no transporte da proteína (Okada, 2009). Independente da presença do peptídeo sinal, a capacidade da PfHO de converter hemina em BR foi demonstrada.

Porém, a capacidade do parasita de usar a via de detoxificação da hemina formando BV e BR não é um consenso na literatura. Kumar et al. (2008) demonstraram que BV e BR causam um estresse oxidativo em *P. falciparum* em concentrações a partir de 5  $\mu$ M comprometendo a viabilidade celular do parasita. Neste caso, a ausência de uma enzima com atividade HO e biliverdina redutase (BVR) em *P. falciparum* poderia ser uma estratégia para se defender dos efeitos tóxicos do catabolismo da hemina. Sigala et al. (2012) não detectaram

indícios da atividade HO em *P. falciparum*, neste trabalho os autores usaram uma sonda capaz de fluorescer ao ligar a BV. Com esta técnica, este grupo não detectou um aumento aparente de fluorescência no estágio intraeritrocítico de *P. falciparum*. Com o uso de um HPLC, Sigala et al. (2012) não detectaram diferença nas concentrações de BV e BR de eritrócitos infectados e não infectados com *P. falciparum* e finalmente, trabalhando com a PfHO recombinante (sem peptídeo sinal) purificada não conseguiu repetir o ensaio *in vitro* que indicava a atividade HO da PfHO proposto por Okada (2009) e Sartorello et al. (2010).

Em nosso trabalho, decidimos usar a versão da PfHO editada (sem peptídeo sinal) o que aumenta a solubilidade da proteína melhorando assim o rendimento durante os passos de expressão e purificação. Confirmada o sucesso da expressão e pureza da PfHO editada e recombinante (**figura 22**) testamos a atividade biliverdina redutase da PfHO. Em mamíferos, a conversão da hemina em BV (heme oxigenase) e BV em BR (biliverdina redutase) é catalisada por distintas proteínas.

Nosso protocolo foi bem sucedido em induzir a atividade BVR da PfHO. Durante a reação observamos um aumento da absorbância em 454 (indicando a formação da BR) e confirmamos a presença da BR como produto da reação com uso do espectrômetro de massa (**figura 23 e 24**, respectivamente). Entretanto há diferenças na metodologia usada por Sigala et al. (2012) e este trabalho. A primeira se refere à temperatura, Sigala et al. (2012) montaram a reação em temperatura ambiente enquanto em nosso protocolo a reação ocorreu sempre a 37 °C, mimetizando assim uma condição mais próxima da temperatura encontrada no parasita dentro do eritrócito humano. A segunda diferença está no pH do tampão usado, o grupo de Sigala et al. (2012) trabalharam com pH 8.0 enquanto nosso protocolo usamos um pH 7.4. Okada (2009) testou a atividade da PfHO em temperatura ambiente em pH 7.5 enquanto que Sartorello et al. (2010) testaram a atividade a 37°C em pH 8.8. É difícil comparar a atividade enzimática *in vitro* de uma proteína em protocolos distintos. Se no trabalho do Sigala et al. (2012) não foi observada atividade enzimática da PfHO, este dado evidencia que alterações na temperatura e pH do meio podem influenciar a capacidade da PfHO de converter hemina em BR.

Quando explorada a afinidade da PfHO de se ligar com a hemina, Sartorello et al. (2010) reportaram um  $K_D = 4 \pm 2 \mu\text{M}$ ; Sigala et al. (2012) reportaram um  $K_D = 9 \mu\text{M}$  enquanto que Okada (2009) reportou um  $K_D = 6,25 \mu\text{M}$ . Todos estes trabalhos revelam uma modesta capacidade da PfHO em se ligar com a hemina comparada a heme oxigenase (HO) de humanos ( $0.84 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ) (Wilks et al., 1996) sugerindo uma baixa eficiência em remover

hemina no meio celular. Mesmo com a existência da *PfHO*, fica claro que principal fonte de detoxificação do *Plasmodium* continua sendo a via de formação da hemozoína (Sherman et al., 1965).

Este fato levanta a questão sobre a função da *PfHO* em *Plasmodium*. Se a *PfHO* tem uma capacidade limitada de remover a hemina do meio, os produtos de degradação da hemina (BV e BR) formados pela *PfHO* deve ter uma função em baixas concentrações. A biliverdina é uma molécula versátil, precursor importante de vários pigmentos em animais (Terry et al., 2002) e plantas (Beale, 1991) além de precursoras de toxinas em bactérias patogênicas (Schmitt et al., 1993).

A infecção dos hepatócitos por esporozoítos de *P. berghei* e *P. yoelii* estimula a atividade da HO-1 do hospedeiro. A ativação da HO aumenta a concentração de BV em hepatócitos infectados gerando um aumento na parasitemia (Ephiphanio et al., 2008). Este trabalho sugere que a BV seja um sinal importante durante desenvolvimento do *Plasmodium*.

### **5.2.2 Metaloprotoporfirinas são capazes de modular a atividade biliverdina redutase (BVR) da *PfHO* recombinante**

Heme oxigenases são agentes comuns na supressão da toxicidade da hemina e diversas metaloprotoporfirinas sintéticas tem sido utilizadas como ferramentas farmacológicas para a modulação da atividade da HO *in vivo* e *in vitro* (Kinobe et al., 2008).

Demonstramos que as metaloprotoporfirina Fe-PPIX, Co-PPIX, Cu-PPIX, Mn-PPIX, Ni-PPIX e Zn-PPIX além da protoporfirina sem metal (PPIX) são capazes de modular a atividade BVR da *PfHO* (**figuras 25 a 31**).

Hemina (Fe-PPIX) foi a única protoporfirina que modulou positivamente a atividade *PfHO* na concentração 10  $\mu\text{M}$  e não mostrou qualquer inibição nas outras concentrações testadas (**figura 25**). Este fato era esperado uma vez que *P. falciparum* precisa lidar naturalmente com este composto durante seu desenvolvimento intraeritrocítico.

A protoporfirina sem metal (PPI-IX) inibiu a reação em concentrações superiores a 1  $\mu\text{M}$  (**figura 26**). Este fato demonstra que deve ter sítios de interação específicos para as espécies de PPIX responsáveis pela inibição da *PfHO* que não dependem do íon metálico presente nas metaloprotoporfirinas.

Co-PPIX é capaz de inibir a atividade BRV da *PfHO* em concentrações a partir de 10  $\mu\text{M}$  (**figura 27**). Interessante que a Co-PPIX é um ativador clássico da atividade HO além de



induzir a expressão do gene HO-1 em mamíferos (Smith et al., 1993). Este fato revela uma modulação distinta entre a HO de mamíferos e *Plasmodium*. A Zn-PPIX também é capaz de modular negativamente a PfHO em concentrações a partir de 10  $\mu$ M (**figura 31**). A Zn-PPIX é um dos principais inibidores da atividade HO em mamíferos (Drummond et al., 1979).

Cu-PPIX, Mn-PPIX e Ni-PPIX também apresentaram inibição da atividade BVR da PfHO nas concentrações mais altas (**figuras 28 , 29 e 30**, respectivamente). A inibição por diferentes metaloprotoporfirinas sugere que o íon metálico coordenado no anel de porfirina não parece desempenhar um papel importante no mecanismo de inibição. Porém no caso da hemina, as características redox da Fe-PPIX, em conjunto com as suas propriedades de coordenação axiais são provavelmente responsáveis pelo processo de ativação da PfHO.

Sem a presença da ferredoxina não é possível estimular a atividade HO da PfHO (Okada, 2009), entretanto ainda não foi reportado o cristal da proteína PfHO sendo difícil inferir se a atividade HO e BVR da PfHO ocorrem em sítios ativos distintos. Caso a PfHO tenha um único sítio ativo, a modulação da atividade HO e BVR deve apresentar um padrão semelhante na presença das metaloprotoporfirinas.

### 5.3 Ação das metaloprotoporfirinas em *P. falciparum*

#### 5.3.1 Zn-PPIX inibe a formação de hemozoína em culturas de *P. falciparum*

Neste trabalho demonstramos que Zn-PPIX inibe a atividade BVR da PfHO. Quanto a via de detoxificação da hemina pela formação da hemozoína. Martiney et. al 1996, demonstraram que diferentes metaloprotoporfirinas, entre elas a Zn-PPIX, são capazes de inibir a formação do cristal de hemozina *in vitro* em *P. falciparum*.

Nossos resultados demonstram claramente a redução significativa da área do cristal da hemozoína em parasitas tratados com Zn-PPIX e cloroquina por duas horas (**Figura 23**). Observar o cristal de hemozoína em células vivas em microscopia confocal na presença destes compostos é uma forma mais dinâmica e que leva em consideração o metabolismo celular comparado ao ensaio em *in vitro* proposto por Martiney et al., 1996.

Este trabalho revela que Zn-PPIX é capaz de inibir a da formação do polímero de hemozoína além de inibição a atividade BVR da PfHO. Esta metaloprotoporfirina age tanto na via principal de detoxificação da hemina (formação da hemozoína) quanto alternativa sugerida por Okada 2009 (formação BV/BR).

### 5.3.2 Efeito da hemina, protoporfirina e metaloprotoporfirinas na viabilidade de *P. falciparum*

Após estudos que comprovaram que metaloprotoporfirinas são capazes de inibir a hemozoína (Basilico et al., 1997; Martiney et al., 1996; Monti et al., 1999), houve grande interesse em testar a viabilidade dos parasitas da malária na presença destes compostos (Begum et al., 2003).

Begum et al. (2003) exploraram diversas metaloprotoporfirinas e o IC<sub>50</sub> obtidas em 3 dias de incubação com *P. falciparum* oscilaram desde 15 µM para prata protoporfirina IX (Ag-PPIX) até 190 µM para cromo protoporfirina IX (Cr-PPIX).

Neste trabalho, testamos Fe-PPIX, PPIX, Co-PPIX, Zn-PPIX, Cu-PPIX, Mn-PPIX e Ni-PPIX (**figuras 34 a 40**) em concentrações máximas de 50 µM durante 48 horas de incubação. A partir de 50 µM observamos a precipitação dos compostos com o protocolo usado neste trabalho. Porém, ao fixar uma concentração máxima de 50 µM durante a incubação, não foi possível obter o IC<sub>50</sub> destes compostos.

Embora as metaloprotoporfirinas sejam potentes inibidores da hemozoína, eles tem uma limitada ação antimalárica, a principal explicação para este fato está na baixa solubilidade destes compostos em solventes orgânicos (Borovkov et al., 1998), propriedade que diminui a capacidade de atravessar membranas.

A baixa capacidade de atravessar membranas explicaria a razão pela qual a maioria das metaloprotoporfirinas testadas neste trabalho apresentaram efeito antimalárico em concentrações mais altas. Para os compostos chegarem ao lúmen dos compartimentos ácidos (local onde ocorre a formação da hemozoína) o composto precisa atravessar a membrana do eritrócito, do vacúolo parasitóforo, membrana celular do parasita e finalmente a membrana dos compartimentos ácidos. Isto implica que apenas uma pequena porção dos compostos chegam até o parasita.

Sartorello et al. (2010) observaram a captação de Zn-PPIX em diferentes estágios do ciclo intraeritrocítico ao incubar *P. falciparum* com 10 µM desta protoporfirina. A entrada deste composto no parasita se deve provavelmente ao intenso transporte de vesículas para transportar nutrientes do meio extracelular para o parasita..

Interessante ressaltar que os polímeros e micelas podem ser usadas para aumentar a permeabilidade celular das metaloprotoporfirinas (Ding et al., 2011; Engelmann et al., 2007).

### 5.3.30 encapsulamento das metaloprotoporfirinas otimiza o potencial antimalárico contra *P. falciparum*

A baixa solubilidade em meio aquoso associada a uma baixa capacidade de atravessar membranas biológicas (Borovkov et al., 1998; Menger et al., 1998) compromete o uso das metaloprotoporfirinas como estratégia terapêutica e estudos *in vivo*. O encapsulamento das metaloprotoporfirinas com o polissacarídeo atenocolágeno de algas marinhas aumentou a capacidade destes compostos de penetrarem nas células de mamífero sem causar toxicidade (Deda et al., 2009).

Com o encapsulamento todas as metaloprotoporfirinas apresentaram um IC<sub>50</sub> na faixa de concentração nanomolar (**tabela 3**). Comparando com os dados do Begum et al. (2003) que obtiveram o IC<sub>50</sub> de diversas metaloprotoporfirinas livres, verificamos que enquanto o IC<sub>50</sub> da PPIX livre é de 240 µM o mesmo composto encapsulado apresentou IC<sub>50</sub> de 454 nM (redução maior que 500 vezes na concentração). Co-PPIX livre apresentou IC<sub>50</sub> de 77 µM enquanto que a versão encapsulada este valor foi reduzido para 456 nM. O IC<sub>50</sub> da hemina livre foi superior a 200 µM enquanto que o valor da encapsulada foi de 556 nM. O Mn-PPIX livre apresentou valor de IC<sub>50</sub> de 35 µM enquanto que a encapsulada obteve um IC<sub>50</sub> de 781 nM. Importante ressaltar que os valores de IC<sub>50</sub> obtidos no trabalho de Begum et al. (2003) foram calculados após 3 dias de incubação enquanto que em nosso protocolo a incubação foi de apenas dois dias. Nossos resultados revelaram que a Zn-PPIX encapsulada foi o composto que apresentou melhor potencial antimalárico (IC<sub>50</sub>= 330 nM). O encapsulamento se mostrou uma estratégia eficiente em reduzir a concentração necessária para prejudicar a viabilidade celular em *P. falciparum*. Este dado comprova que a principal limitação para o uso das metaloprotoporfirinas se deve de fato a sua baixa permeabilidade a membranas biológicas.

Importante ressaltar que o efeito antimalárico apresentado pelos compostos encapsulados não se deve a uma toxicidade do polissacarídeo usado ou qualquer outro composto presente na formulação da cápsula uma vez que nanocapsulas contendo apenas solvente DMSO não prejudicou a viabilidade do *P. falciparum* em concentrações abaixo de 800 nM durante as 48 horas de incubação (**figura 41**).

Este trabalho levanta a possibilidade de resgatar o interesse em usar metaloprotoporfirinas como estratégia terapêutica contra o *Plasmodium*. Metaloprotoporfirinas já são usadas para outras finalidades terapêuticas como anti-virais (Ding et al., 1992) e agentes bactericidas (Stojiljkovic et al., 1999).

## 5.4 Ação da hemina, biliverdina e bilirrubina no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*

### 5.4.1 Hemina e biliverdina modulamo ciclo celular de *P. falciparum*

No passado, a BV e BR eram consideradas apenas produtos de degradação tóxicos hemina (Maines et al., 2003). Porém há evidências de que a hemina, BV e BR são importantes agentes capazes de regular genes (Phelan et al., 1998), respostas oxidativas (Sinal et al., 1997) e sinais na via de transdução celular em diversos modelos biológicos (Neuzil et al., 1994).

Para explorar se os produtos de degradação da hemina tem alguma ação no ciclo intraeritrocítico, incubamos eritrócitos infectados com parasita dessincronizado durante 48 horas na presença de 0,1; 1 e 10  $\mu\text{M}$  de hemina, BV e BR (**figuras 43 a 45**).

Este é o primeiro trabalho a reportar que hemina e BV são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico em *P. falciparum*.

Corroborando os dados de Kumar et al., 2008, biliverdina apresenta um efeito tóxico em concentração acima de 5  $\mu\text{M}$  (**figura 44**). Entretanto, demonstramos que BV é capaz de modular o ciclo do parasita em concentrações abaixo da faixa micromolar, concentração que não implica na perda da viabilidade celular em *P. falciparum*. Neste aspecto a concentração de BV não pode ser muito alta (concentração micromolar) ao ponto de causar danos oxidativos (Kumar et al., 2008) mas deve ser suficiente para poder modular o ciclo do *Plasmodium* (concentrações nanomolares).

Tanto a hemina quanto a BV são capazes de aumentar a proporção dos estágios jovens (anel e trofozoíto) e diminuir a proporção dos estágios mais maduros (esquizontes) (**figuras 43 e 44**, respectivamente). Entretanto, não foi observado alteração na parasitemia. O aumento dos estágios jovens induzidas pela hemina e BV pode ser uma resposta importante do *Plasmodium* em lidar com os efeitos tóxicos destes agentes uma vez que os estágios mais jovens apresentam uma captação de hemoglobina maior (Abu Bakar et al., 2010; Elliott et al., 2008), lidando naturalmente com concentrações maiores de hemina e seus metabólitos.

A concentração de BR, um composto lipossolúvel, nos tecidos de um humano saudável está na faixa de 20 a 50 nM (Doré et al., 2009) enquanto que a BV, um composto que tem uma capacidade mais limitada em atravessar membranas comparada a BR, está em uma concentração entre 100 a 250 nM no plasma humano (Baranano et al., 2002). Estes dados sugerem que *P. falciparum* tem contato com concentrações nanomolares destes compostos durante seu desenvolvimento no copo humano. A ativação da HO-1 do hospedeiro associada a

atividade heme oxigenase da *PfHO* deve garantir concentração de BV suficiente para modular o desenvolvimento no hospedeiro vertebrado.

#### 5.4.2 Busca do receptor de BV em *P. falciparum*

Ao adaptar o protocolo de Berkerlman et al. (1985), um protocolo que identifica proteínas ligadas a BV através de fluorescência estimulada por luz violeta na presença de acetato de zinco, investigamos quais proteínas de *P. falciparum* são capazes de se associar com a BV.

A escolha de um gel bidimensional permitiu separar melhor as proteínas evitando a presença de proteínas sem interesse com tamanho molecular semelhante aos candidatos que apresentam fluorescência.

Nosso trabalho identificou a enolase como um interessante candidato (**figura 46 e tabela 4**). Com 68 peptídeos exclusivos identificados, a enolase foi a proteína mais abundante no ponto 5 do gel da **figura 46 A**. Interessante ressaltar que não fomos capazes de identificar a *PfHO* entre os pontos fluorescentes, este dado pode indicar uma baixa concentração da *PfHO* nos extratos de proteína de *P. falciparum* e/ou a baixa afinidade desta proteína em se ligar a BV. Sigala et al. (2012) também não conseguiram ver fluorescência usando uma sonda que se liga a BV em *P. falciparum*. Provavelmente a sensibilidade da técnica de fluorescência por acetato de zinco usada neste trabalho e da sonda usada por Sigala et al. (2012) não deve apresentar suficiente sensibilidade em revelar a interação entre *PfHO* e BV.

A enolase é a oitava enzima da via glicolítica, uma metaloenzima responsável pela conversão do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (revisado de Pancholi, 2001). Em alguns organismos a enolase é capaz de desempenhar múltiplas funções (Ghosh et al., 2011).

A enolase de *P. falciparum* (*Pfeno*) pode ser encontrada no citossol, na membrana celular e no núcleo (Bhowmick et al., 2009; Das et al., 2011), sugerindo múltiplas funções para esta proteína. Ghosh et al. (2011) reportaram que a enolase exportada na superfície do oocineto desempenha papel importante para a ativação do plasminogênio em plasmina (uma serina protease capaz de degradar as redes de fibrina do hospedeiro) o que permite a invasão do *Plasmodium* no trato intestinal do mosquito. Outros organismos patogênicos também usam a enolase para ativar a plasmina. As espécies de *Leishmania* exportam a enolase para membrana celular (Quiñones et al., 2007) e a interação entre enolase e plasminogênio está relacionado a virulência deste parasita (Maldonado et al., 2006). Bactérias (*Streptococcus*

*pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*), fungo (*Candida albicans*) e helmintos (*Onchocerca volvulus*) também usam enolase para ativar a plasmina (revisado de Ghosh et al., 2011).

A presença da *Pfeno* no vacúolo parasitóforo, região onde ocorre a degradação da hemoglobina (e conseqüente formação da hemina) e na membrana celular de eritrócitos infectados (Ghosh et al., 2011) pode desempenhar a função de um sensor das concentrações intracelulares e extracelulares de BV, respectivamente.

Ainda não foi reportada a capacidade da enolase em se associar a BV, entretanto a modelagem da *Pfeno* inferida pelo programa MODELLER (versão 9.10) (Eswar et al., 2006) foi submetida a uma análise de ligação com BV no programa SiteHound. Esta análise revelou haver um sítio de ligação entre a enolase de *P. falciparum* e a molécula de BV. Estes estudos estão sendo conduzido pelo Prof. Dr Rafael Guido no Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Cristalografia, USP.

## 6 CONCLUSÕES

No trabalho envolvendo o papel do  $IP_3$  na transdução de sinal em *P. falciparum*, demonstramos que trofozoítos não permeabilizados dentro do eritrócito (ambiente natural) são capazes de mobilizar  $Ca^{2+}$  na presença do segundo mensageiro  $IP_3$  através de um compartimento sensível a tapsgargina.

A sensibilidade do *P. falciparum* ao  $IP_3$  não é constante durante o ciclo intraeritrocítico uma vez que esquizontes não segmentados não são capazes de mobilizar  $Ca^{2+}$  na presença deste mensageiro.

O hormônio melatonina é capaz de estimular diretamente  $IP_3/IP_4$  citossólicos e induz  $Ca^{2+}$  através da via PLC/ $IP_3$ R em *P. falciparum*.

O uso de sensores como IRIS e de proteína que tamponam o  $IP_3$  celular como  $IP_3$  esponja expressos de forma constitutiva provavelmente afetam a viabilidade celular do *P. falciparum*.

O uso de coluna de cromatografia de afinidade ao  $IP_3$  apresentou 51 proteínas candidatas ao receptor de  $IP_3$  em *P. falciparum*.

No trabalho envolvendo a função da heme oxigenase de *P. falciparum* (*PfHO*) confirmamos a atividade biliverdina redutase (BVR) *in vitro* nesta enzima.

A atividade BVR da *PfHO* é modulada negativamente por diversas melatoprotoporfirinas (Zn-PPIX, Ni-PPIX, Mn-PPIX, Cu-PPIX, Co-PPIX) e protoporfirina sem metal (PPIX) *in vitro*. Zn-PPIX é capaz de, em duas horas, reduzir consideravelmente a área da hemozoína em eritrócitos infectados por em *P. falciparum*.

O encapsulamento das metaloprotoporfirina aumenta consideravelmente o potencial antimalárico destes compostos.

Hemina e biliverdina são capazes de modular o ciclo intraeritrocítico do *P. falciparum*. O ensaio de ligação proteína-BV evidenciou a enolase de *P. falciparum* como um potencial sensor de BV.

**REFERÊNCIAS\***

- Abu Bakar N, Klonis N, Hanssen E, Chan C, Tilley L. Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Cell Sci*. 2010 Feb 1;123(Pt 3):441-50.
- Aft RL, Mueller GC. Hemin-mediated DNA strand scission. *J Biol Chem*. 1983 Oct 10;258(19):12069-72.
- Allan D. Inositol lipids and membrane function in erythrocytes. *Cell Calcium*. 1982 Oct;3(4-5):451-65.
- Alves E, Bartlett PJ, Garcia CR, Thomas AP. Melatonin and IP3-induced Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. *J Biol Chem*. 2011 Feb 18;286(7):5905-12.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):220-4.
- Arnold JD, Berger AE, Martin DC. Chemical agents effective in mediating control of growth and division synchrony of *plasmodium berghei* in pinealectomized mice. *Journal of Parasitology*. 1969;55(3):617-625.
- Asawamahasakda W, Ittarat I, Chang CC, McElroy P, Meshnick SR. Effects of antimalarials and protease inhibitors on plasmodial hemozoin production. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Oct;67(2):183-91.
- Bagnaresi P, Alves E, da Silva HB, Epiphanyo S, Mota MM, Garcia CR. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int J Gen Med*. 2009;2:47-55.
- Bannister L, Mitchell G. The ins, outs and roundabouts of malaria. *Trends Parasitol*. 2003 May;19(5):209-13.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16093-8.
- Basilico N, Monti D, Olliaro P, Taramelli D. Non-iron porphyrins inhibit beta-haematin (malaria pigment) polymerisation. *FEBS Lett*. 1997 Jun 9;409(2):297-9.

---

\*De acordo com:

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



Battersby AR, Fookes CJ, Matcham GW, McDonald E. Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle. *Nature*. 1980 May 1;285(5759):17-21.

Baylis HA, Vazquez-Manrique RP. Genetic analysis of IP3 and calcium signalling pathways in *C. elegans*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2012 Aug;1820(8):1253-68.

Baylis HA, Vazquez-Manrique RP. Genetic analysis of IP3 and calcium signalling pathways in *C. elegans*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2012 Aug;1820(8):1253-68.

Begum K, Kim HS, Kumar V, Stojiljkovic I, Wataya Y. In vitro antimalarial activity of metalloporphyrins against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*. 2003 Jun;90(3):221-4.

Bendrat K, Berger BJ, Cerami A. Haem polymerization in malaria. *Nature*. 1995 Nov 9;378(6553):138-9.

Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol*. 2005 Aug 15;170(4):551-7.

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

Berkelman TR, Lagarias JC. Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1986 Jul;156(1):194-201.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003 Jul;4(7):517-29.

Berridge MJ, Dawson RM, Downes CP, Heslop JP, Irvine RF. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J*. 1983 May 15;212(2):473-82.

Berridge MJ, Lipke H. Changes in calcium-transport across calliphora salivary-glands induced by 5-Hydroxytryptamine and cyclic-nucleotides. *Journal of Experimental Biology*. 1979;78(Feb):137-48.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 2009 Jun;1793(6):933-40.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993 Jan 28;361(6410):315-25.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;494:39-51.

Bhowmick IP, Kumar N, Sharma S, Coppens I, Jarori GK. *Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. *Malar J*. 2009;8:179.

Biagini GA, Bray PG, Spiller DG, White MR, Ward SA. The digestive food vacuole of the malaria parasite is a dynamic intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  store. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25;278(30):27910-5.

Borovkov VV, Lintuluoto JM, Inoue Y. Convenient method for efficient iron and manganese ion insertion into various porphyrins under mild conditions. *Synlett*. 1999 Jan(1):61-2.

Boyd GH. Induced variations in the asexual cycle of *Plasmodium cathemerium*. *American Journal of Hygiene*. 1929 Jan;9(1):181-7.

Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, et al. Dual signaling of human Mella melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol*. 1999 Dec;13(12):2025-38.

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

Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Perteu M, Silva JC, et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):512-9.

Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):564-94.

Cassone VM, Natesan AK. Time and time again: The phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *Journal of Biological Rhythms*. 1997 Dec;12(6):489-97.

Chini EN, De Toledo FG. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new intracellular second messenger? *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Jun;282(6):C1191-8.

Choi CY, Cerda JF, Chu HA, Babcock GT, Marletta MA. Spectroscopic characterization of the heme-binding sites in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2. *Biochemistry*. 1999 Dec 21;38(51):16916-24.

Christ K, Ruttinger HH, Hopfner M, Rothe U, Bendas G. The detection of UV-induced membrane damages by a combination of two biosensor techniques. *Photochem Photobiol*. 2005 Nov-Dec;81(6):1417-23.

Cole KA, Ziegler J, Evans CA, Wright DW. Metalloporphyrins inhibit beta-hematin (hemozoin) formation. *J Inorg Biochem*. 2000 Jan 30;78(2):109-15.

Crabb BS, Rug M, Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, Maier AG, et al. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol*. 2004;270:263-76.

Cullen PJ, Chung SK, Chang YT, Dawson AP, Irvine RF. Specificity of the purified inositol (1,3,4,5) tetrakisphosphate-binding protein from porcine platelets. *FEBS Lett*. 1995 Jan 30;358(3):240-2.

Dakin K, Li WH. Cell membrane permeable esters of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate. *Cell Calcium*. 2007 Sep;42(3):291-301.

Das S, Shevade S, LaCount DJ, Jarori GK. Plasmodium falciparum enolase complements yeast enolase functions and associates with the parasite food vacuole. *Mol Biochem Parasitol*. 2011 Sep;179(1):8-17.

Deda DK, Uchoa AF, Carita E, Baptista MS, Toma HE, Araki K. A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment. *Int J Pharm*. 2009 Jul 6;376(1-2):76-83.

Ding H, Sumer BD, Kessinger CW, Dong Y, Huang G, Boothman DA, et al. Nanoscopic micelle delivery improves the photophysical properties and efficacy of photodynamic therapy of protoporphyrin IX. *J Control Release*. 2011 May 10;151(3):271-7.

Ding L, Balzarini J, Schols D, Meunier B, de Clercq E. Anti-human immunodeficiency virus effects of cationic metalloporphyrin-ellipticine complexes. *Biochem Pharmacol*. 1992 Oct 20;44(8):1675-9.

Divirgilio F, Steinberg TH, Swanson JA, Silverstein SC. Fura-2 Secretion and Sequestration in Macrophages - a Blocker of Organic Anion Transport Reveals That These Processes Occur Via a Membrane-Transport System for Organic-Anions. *Journal of Immunology*. 1988 Feb 1;140(3):915-20.

Docherty JC, Brown SB. Haem degradation in human haemoglobin in vitro. Separation of the contribution of the alpha- and beta-subunits. *Biochem J*. 1984 Sep 1;222(2):401-6.

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

Doerig CD. Signal transduction in malaria parasites. *Parasitol Today*. 1997 Aug;13(8):307-13.

Dore S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, et al. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2445-50.

Dorin D, Semblat JP, Pouillet P, Alano P, Goldring JPD, Whittle C, et al. PfPK7, an atypical MEK-related protein kinase, reflects the absence of classical three-component MAPK pathways in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Molecular Microbiology*. 2005 Jan;55(1):184-96.

Dorn A, Stoffel R, Matile H, Bubendorf A, Ridley RG. Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature*. 1995 Mar 16;374(6519):269-71.

Drummond GS, Kappas A. Manganese and zinc blockade of enzyme induction: studies with microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Oct;76(10):5331-5.

Drummond GS, Kappas A. Potent heme-degrading action of antimony and antimony-containing parasiticidal agents. *J Exp Med*. 1981 Feb 1;153(2):245-56.

Drummond GS, Kappas A. Sn-Protoporphyrin Inhibition of Fetal and Neonatal Brain Heme Oxygenase - Trans-Placental Passage of the Metalloporphyrin and Prenatal Suppression of Hyperbilirubinemia in the Newborn Animal. *Journal of Clinical Investigation*. 1986 Mar;77(3):971-6.

Dubocovich ML. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988 Sep;246(3):902-10.

Dvorin JD, Martyn DC, Patel SD, Grimley JS, Collins CR, Hopp CS, et al. A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science*. 2010 May 14;328(5980):910-2.

Eddy SR. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*. 1998;14(9):755-63.

Egan TJ, Combrinck JM, Egan J, Hearne GR, Marques HM, Ntenti S, et al. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J*. 2002 Jul 15;365(Pt 2):343-7.

Elabbadi N, Ancelin ML, Vial HJ. Characterization of phosphatidylinositol synthase and evidence of a polyphosphoinositide cycle in *Plasmodium*-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Feb;63(2):179-92.

Elliott DA, McIntosh MT, Hosgood HD, 3rd, Chen S, Zhang G, Baevova P, et al. Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2463-8.

Engelmann FM, Rocha SV, Toma HE, Araki K, Baptista MS. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. *Int J Pharm*. 2007 Feb 1;329(1-2):12-8.

Enomoto M, Kawazu S, Kawai S, Furuyama W, Ikegami T, Watanabe J, et al. Blockage of spontaneous  $Ca^{2+}$  oscillation causes cell death in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 2012;7(7):e39499.

Epiphanyo S, Mikolajczak SA, Goncalves LA, Pamplona A, Portugal S, Albuquerque S, et al. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. *Cell Host Microbe*. 2008 May 15;3(5):331-8.

Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2006 Oct;Chapter 5:Unit 5 6.

Fang J, Marchesini N, Moreno SN. A *Toxoplasma gondii* phosphoinositide phospholipase C (TgPI-PLC) with high affinity for phosphatidylinositol. *Biochem J*. 2006 Mar 1;394(Pt 2):417-25.

Farias SL, Gazarini ML, Melo RL, Hirata IY, Juliano MA, Juliano L, et al. Cysteine-protease activity elicited by  $Ca^{2+}$  stimulus in *Plasmodium*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 May;141(1):71-9.

Fidock DA, Nomura T, Wellems TE. Cycloguanil and its parent compound proguanil demonstrate distinct activities against *Plasmodium falciparum* malaria parasites transformed with human dihydrofolate reductase. *Mol Pharmacol*. 1998 Dec;54(6):1140-7.

Fisher SK, Novak JE, Agranoff BW. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem*. 2002 Aug;82(4):736-54.

Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. Inositol trisphosphate receptor  $Ca^{2+}$  release channels. *Physiol Rev*. 2007 Apr;87(2):593-658.

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

Garcia CR, Dluzewski AR, Catalani LH, Burtling R, Hoyland J, Mason WT. Calcium homeostasis in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol*. 1996 Dec;71(4):409-13.

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

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):498-511.

Gazarini ML, Garcia CR. Interruption of the blood-stage cycle of the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*, by protein tyrosine kinase inhibitors. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Nov;36(11):1465-9.

Gazarini ML, Sigolo CA, Markus RP, Thomas AP, Garcia CR. Antimalarial drugs disrupt ion homeostasis in malarial parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(3):329-34.

Gazarini ML, Thomas AP, Pozzan T, Garcia CR. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol*. 2003 Apr 14;161(1):103-10.

Gerold P, Dieckmann-Schuppert A, Schwarz RT. Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J Biol Chem*. 1994 Jan 28;269(4):2597-606.

Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:85-90.

Goldberg DP. Corrolazines: new frontiers in high-valent metalloporphyrinoid stability and reactivity. *Acc Chem Res*. 2007 Jul;40(7):626-34.

Goldie P, Roth EF, Jr., Oppenheim J, Vanderberg JP. Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hemozoin. *Am J Trop Med Hyg*. 1990 Dec;43(6):584-96.

Gorka AP, Alumasa JN, Sherlach KS, Jacobs LM, Nickley KB, Brower JP, et al. Cytostatic versus cytotoxic activities of chloroquine analogues and inhibition of hemozoin crystal growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):356-64.

- Grabowsky M. The billion-dollar malaria moment. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1051-2.
- Graca-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, Sorgine MH, et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006 Apr;36(4):322-35.
- Grasso R, Franco Raffo H. Cytochemical and morphological studies in erythroblasts of human placenta. *Arch Histol Norm Patol*. 1965 Jun 1;9(1):104-12.
- Guinovart C, Navia MM, Tanner M, Alonso PL. Malaria: burden of disease. *Current Molecular Medicine*. 2006 Mar;6(2):137-40.
- Haldar K, Henderson CL, Cross GA. Identification of the parasite transferrin receptor of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and its acylation via 1,2-diacyl-sn-glycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Nov;83(22):8565-9.
- Hawking F. The clock of the malaria parasite. *Sci Am*. 1970 Jun;222(6):123-31.
- Hermosura MC, Takeuchi H, Fleig A, Riley AM, Potter BV, Hirata M, et al. InsP4 facilitates store-operated calcium influx by inhibition of InsP3 5-phosphatase. *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):735-40.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79.
- Heslop JP, Irvine RF, Tashjian AH, Berridge MJ. Inositol tetrakisphosphate and pentakisphosphate in Gh4 cells. *Journal of Experimental Biology*. 1985 Nov;119:395-401.
- Hirata M, Watanabe Y, Ishimatsu T, Yanaga F, Koga T, Ozaki S. Inositol 1,4,5-trisphosphate affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Apr 16;168(1):379-86.
- Hirata M, Watanabe Y, Yoshida M, Koga T, Ozaki S. Roles for Hydroxyl-Groups of D-Myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphate in the Recognition by Its Receptor and Metabolic Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 1993 Sep 15;268(26):19260-6.
- Hokin MR, Hokin LE. Enzyme secretion and the incorporation of P-82 into phospholipides of pancreas slices. *Journal of Biological Chemistry*. 1953;203(2):967-77.
- Holder AA, Lockyer MJ, Odink KG, Sandhu JS, Riveros-Moreno V, Nicholls SC, et al. Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature*. 1985 Sep 19-25;317(6034):270-3.
- Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, Varotti FP, Lopes C, Markus RP, et al. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol*. 2000 Jul;2(7):466-8.
- Huang G, Bartlett PJ, Thomas AP, Moreno SN, Docampo R. Acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei* have an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor that is required for growth and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 29;110(5):1887-92.

Hughes AR, Putney JW. Inositol phosphate formation and its relationship to calcium signaling. *Environmental Health Perspectives*. 1990 Mar;84:141-7.

Irvine RF, Anggard EE, Letcher AJ, Downes CP. Metabolism of Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Inositol 1,3,4-Trisphosphate in Rat Parotid-Glands. *Biochemical Journal*. 1985;229(2):505-11.

Irvine RF, Letcher AJ, Heslop JP, Berridge MJ. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway--demonstration of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase activity in animal tissues. *Nature*. 1986 Apr 17-23;320(6063):631-4.

Irvine RF, McNulty TJ, Schell MJ. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger--a special role in neurones? *Chem Phys Lipids*. 1999 Apr;98(1-2):49-57.

Irvine RF. Inositide evolution - towards turtle domination? *Journal of Physiology-London*. 2005 Jul 15;566(2):295-300.

Jani D, Nagarkatti R, Beatty W, Angel R, Slebodnick C, Andersen J, et al. HDP-a novel heme detoxification protein from the malaria parasite. *PLoS Pathog*. 2008 Apr;4(4):e1000053.

Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrang P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*. 2008 Jul;154(6):1182-95.

Joseph SK, Brownell S, Khan MT. Calcium regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 2005 Dec;38(6):539-46.

Kappe SHI, Vaughan AM, Boddey JA, Cowman AF. That Was Then But This Is Now: Malaria Research in the Time of an Eradication Agenda. *Science*. 2010 May 14;328(5980):862-6.

Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 9;338(1):558-67.

Kinobe RT, Dercho RA, Nakatsu K. Inhibitors of the heme oxygenase - carbon monoxide system: on the doorstep of the clinic? *Can J Physiol Pharmacol*. 2008 Sep;86(9):577-99.

Kishigami A, Ogasawara T, Watanabe Y, Hirata M, Maeda T, Hayashi F, et al. Inositol-1,4,5-trisphosphate-binding proteins controlling the phototransduction cascade of invertebrate visual cells. *J Exp Biol*. 2001 Feb;204(Pt 3):487-93.

Koga Y, Morii H. Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007 Mar;71(1):97-120.

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

Krinke O, Novotna Z, Valentova O, Martinec J. Inositol trisphosphate receptor in higher plants: is it real? *J Exp Bot*. 2007;58(3):361-76.

Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985;79(1):1-11.

- Kumar S, Guha M, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyay U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: a mechanistic update. *Life Sci.* 2007 Feb 6;80(9):813-28.
- Kumar S, Guha M, Choubey V, Maity P, Srivastava K, Puri SK, et al. Bilirubin inhibits *Plasmodium falciparum* growth through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2008 Feb 15;44(4):602-13.
- Kutty RK, Daniel RF, Ryan DE, Levin W, Maines MD. Rat liver cytochrome P-450b, P-420b, and P-420c are degraded to biliverdin by heme oxygenase. *Arch Biochem Biophys.* 1988 Feb 1;260(2):638-44.
- Labbe RF, Vreman HJ, Stevenson DK. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clinical Chemistry.* 1999 Dec;45(12):2060-72.
- Lai FP, Mody SM, Yung LY, Kam JY, Pang CS, Pang SF, et al. Molecular determinants for the differential coupling of Galpha(16) to the melatonin MT1, MT2 and *Xenopus* Mel1c receptors. *J Neurochem.* 2002 Mar;80(5):736-45.
- Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* 1979 Jun;65(3):418-20.
- Langreth SG. Feeding mechanisms in extracellular *Babesia microti* and *Plasmodium lophurae*. *J Protozool.* 1976 May;23(2):215-23.
- Leeper FJ. The Biosynthesis of Porphyrins, Chlorophylls, and Vitamin-B12. *Natural Product Reports.* 1989 Apr;6(2):171-203.
- Lew VL, Tiffert T. Is invasion efficiency in malaria controlled by pre-invasion events? *Trends in Parasitology.* 2007 Oct;23(10):481-4.
- Leykauf K, Treeck M, Gilson PR, Nebl T, Bräulke T, Cowman AF, 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.* 2010;6(6):e1000941.
- Li WH, Schultz C, Llopis J, Tsien RY. Membrane-permeant esters of inositol polyphosphates, chemical syntheses and biological applications. *Tetrahedron.* 1997 Sep 1;53(35):12017-40.
- Lima WR, Moraes M, Alves E, Azevedo MF, Passos DO, Garcia CR. The Pfnf-YB transcription factor is a downstream target of melatonin and cAMP signalling in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Pineal Res.* 2013 Mar;54(2):145-53.
- Lin WH, Ye R, Ma H, Xu ZH, Xue HW. DNA chip-based expression profile analysis indicates involvement of the phosphatidylinositol signaling pathway in multiple plant responses to hormone and abiotic treatments. *Cell Research.* 2004 Feb;14(1):34-45.
- Mackrill JJ. Ryanodine receptor calcium release channels: an evolutionary perspective. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:159-82.



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

Maines MD, Kappas A. Regulation of heme pathway enzymes and cellular glutathione content by metals that do not chelate with tetrapyrroles: blockade of metal effects by thiols. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 May;74(5):1875-8.

Maines MD. Bile pigments: newcomers to the cell signaling arena. *Toxicol Sci*. 2003 Jan;71(1):9-10.

Maldonado J, Marina C, Puig J, Maizo Z, Avilan L. A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Exp Mol Pathol*. 2006 Jun;80(3):289-94.

Martin SK, Jett M, Schneider I. Correlation of phosphoinositide hydrolysis with exflagellation in the malaria microgametocyte. *J Parasitol*. 1994 Jun;80(3):371-8.

Martiney JA, Cerami A, Slater AF. Inhibition of hemozoin formation in *Plasmodium falciparum* trophozoite extracts by heme analogs: possible implication in the resistance to malaria conferred by the beta-thalassemia trait. *Mol Med*. 1996 Mar;2(2):236-46.

Matsu-ura T, Michikawa T, Inoue T, Miyawaki A, Yoshida M, Mikoshiba K. Cytosolic inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *J Cell Biol*. 2006 Jun 5;173(5):755-65.

McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12568-74.

Meimoun P, Vidal G, Bohrer AS, Lehner A, Tran D, Briand J, et al. Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav*. 2009 Sep;4(9):830-5.

Menger FM, Sykes BM. Anatomy of a coacervate. *Langmuir*. 1998 Jul 21;14(15):4131-7.

Merckx A, Nivez MP, Bouyer G, Alano P, Langsley G, Deitsch K, et al. *Plasmodium falciparum* regulatory subunit of cAMP-dependent PKA and anion channel conductance. *PLoS Pathog*. 2008 Feb 8;4(2):e19.

Michell RH. Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):151-61.

Michell RH. Inositol phospholipids and cell-surface receptor function. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1975;415(1):81-147.

Mikoshiba K. IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem*. 2007 Sep;102(5):1426-46.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):673-9.

- Monteiro D, Liu Q, Lisboa S, Scherer GE, Quader H, Malho R. Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of  $[Ca^{2+}]_c$  and membrane secretion. *J Exp Bot*. 2005 Jun;56(416):1665-74.
- Monti D, Vodopivec B, Basilico N, Olliaro P, Taramelli D. A novel endogenous antimalarial: Fe(II)-protoporphyrin IX alpha (heme) inhibits hemozoin polymerization to beta-hemozoin (malaria pigment) and kills malaria parasites. *Biochemistry*. 1999 Jul 13;38(28):8858-63.
- Moore LR, Fujioka H, Williams PS, Chalmers JJ, Grimberg B, Zimmerman PA, et al. Hemoglobin degradation in malaria-infected erythrocytes determined from live cell magnetophoresis. *FASEB J*. 2006 Apr;20(6):747-9.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JCR, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001 Jan 5;291(5501):141-4.
- Mullins UL, Fernandes PB, Eison AS. Melatonin agonists induce phosphoinositide hydrolysis in *Xenopus laevis* melanophores. *Cell Signal*. 1997 Feb;9(2):169-73.
- Nagamune K, Sibley LD. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol Biol Evol*. 2006 Aug;23(8):1613-27.
- Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1994 Jun 17;269(24):16712-9.
- O'Donnell AJ, Schneider P, McWatters HG, Reece SE. Fitness costs of disrupting circadian rhythms in malaria parasites. *Proc Biol Sci*. 2011 Aug 22;278(1717):2429-36.
- Okada K. The novel heme oxygenase-like protein from Plasmodium falciparum converts heme to bilirubin IXalpha in the apicoplast. *FEBS Lett*. 2009 Jan 22;583(2):313-9.
- Olszewski KL, Morrisey JM, Wilinski D, Burns JM, Vaidya AB, Rabinowitz JD, et al. Host-parasite interactions revealed by Plasmodium falciparum metabolomics. *Cell Host Microbe*. 2009 Feb 19;5(2):191-9.
- Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):307-10.
- Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Jun;58(7):902-20.
- Pandey AV, Babbarwal VK, Okoyeh JN, Joshi RM, Puri SK, Singh RL, et al. Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 5;308(4):736-43.

- Papalexis V, Siomos MA, Campanale N, Guo X, Kocak G, Foley M, et al. Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 Jun;115(1):77-86.
- Passos AP, Garcia CR. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca<sup>2+</sup> release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Apr 7;245(1):155-60.
- Patel S, Joseph SK, Thomas AP. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*. 1999 Mar;25(3):247-64.
- Pattni K, Banting G. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> metabolism and the family of IP<sub>3</sub>-3Kinases. *Cell Signal*. 2004 Jun;16(6):643-54.
- Phelan D, Winter GM, Rogers WJ, Lam JC, Denison MS. Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Sep 1;357(1):155-63.
- Prole DL, Taylor CW. Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. *PLoS One*. 2011;6(10):e26218.
- Quinones W, Pena P, Domingo-Sananes M, Caceres A, Michels PA, Avilan L, et al. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. *Exp Parasitol*. 2007 Jul;116(3):241-51.
- Raabe AC, Wengelnik K, Billker O, Vial HJ. Multiple roles for *Plasmodium berghei* phosphoinositide-specific phospholipase C in regulating gametocyte activation and differentiation. *Cell Microbiol*. 2011 Jul;13(7):955-66.
- Rainbow RD, Macmillan D, McCarron JG. The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store arrangement in vascular smooth muscle. *Cell Calcium*. 2009 Nov-Dec;46(5-6):313-22.
- Rathore D, McCutchan TF, Sullivan M, Kumar S. Antimalarial drugs: current status and new developments. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 Jul;14(7):871-83.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*. 1991 May;12(2):151-80.
- Rhie G, Beale SI. Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-supported nadph-independent heme oxygenase and phycobillin-forming activities from *Cyanidium caldarium*. *J Biol Chem*. 1992 Aug 15;267(23):16088-93.
- Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, Aminake MN, et al. The origin of malignant malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Sep 1;106(35):14902-7.
- Riglar DT, Rogers KL, Hanssen E, Turnbull L, Bullen HE, Charnaud SC, et al. Spatial association with PTEX complexes defines regions for effector export into *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Nat Commun*. 2013;4:1415.

Rohrbach P, Friedrich O, Hentschel J, Plattner H, Fink RH, Lanzer M. Quantitative calcium measurements in subcellular compartments of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Biol Chem*. 2005 Jul 29;280(30):27960-9.

Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*. 2009;11:e16.

Ruiz FA, Marchesini N, Seufferheld M, Govindjee, Docampo R. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):46196-203.

Rupp I, Sologub L, Williamson KC, Scheuermayer M, Reininger L, Doerig C, et al. Malaria parasites form filamentous cell-to-cell connections during reproduction in the mosquito midgut. *Cell Res*. 2011 Apr;21(4):683-96.

Russell PF. *Malariology - A Comprehensive Survey of All Aspects of This Group of Diseases from a Global Standpoint*, vol 1-2. American Journal of Public Health and the Nations Health. 1950 Jun;40(6):755-6.

Sartorello R, Budu A, Bagnaresi P, Fernandes CA, Sato PM, Bueno VB, et al. In vivo uptake of a haem analogue Zn protoporphyrin IX by the human malaria parasite *P. falciparum*-infected red blood cells. *Cell Biol Int*. 2010 Aug 1;34(8):859-65.

Sato S, Clough B, Coates L, Wilson RJ. Enzymes for heme biosynthesis are found in both the mitochondrion and plastid of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protist*. 2004 Mar;155(1):117-25.

Schacter BA, Nelson EB, Marver HS, Masters BS. Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J Biol Chem*. 1972 Jun 10;247(11):3601-7.

Schmitt MP. Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J Bacteriol*. 1997 Feb;179(3):838-45.

Schmitt TH, Frezzatti WA, Jr., Schreier S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Nov 15;307(1):96-103.

Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*. 1993 Jan 1;177(1):145-53.

Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, Tachado SD. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol*. 1996 Mar 1;156(5):1886-96.

Schuck DC, Ribeiro RY, Nery AA, Ulrich H, Garcia CR. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds. *Cytometry A*. 2011 Nov;79(11):959-64.

Sherman IW. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and reduced glutathione in malaria-infected erythrocytes (*Plasmodium lophurae* and *P. berghei*). *J Protozool*. 1965 Aug;12(3):394-6.

Sigala PA, Crowley JR, Hsieh S, Henderson JP, Goldberg DE. Direct tests of enzymatic heme degradation by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2012 Nov 2;287(45):37793-807.

Sinal CJ, Bend JR. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of *cyp1a1* by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol Pharmacol*. 1997 Oct;52(4):590-9.

Singh AP, Ozwara H, Kocken CH, Puri SK, Thomas AW, Chitnis CE. Targeted deletion of *Plasmodium knowlesi* Duffy binding protein confirms its role in junction formation during invasion. *Mol Microbiol*. 2005 Mar;55(6):1925-34.

Slater AF, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*. 1992 Jan 9;355(6356):167-9.

Smith IF, Wiltgen SM, Parker I. Localization of puff sites adjacent to the plasma membrane: functional and spatial characterization of  $Ca^{2+}$  signaling in SH-SY5Y cells utilizing membrane-permeant caged IP<sub>3</sub>. *Cell Calcium*. 2009 Jan;45(1):65-76.

Smith IF, Wiltgen SM, Shuai J, Parker I.  $Ca^{2+}$  puffs originate from preestablished stable clusters of inositol trisphosphate receptors. *Sci Signal*. 2009;2(98):ra77.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):214-7.

Steffens F, Zhou XB, Sausbier U, Sailer C, Motejlek K, Ruth P, et al. Melatonin receptor signaling in pregnant and nonpregnant rat uterine myocytes as probed by large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel activity. *Mol Endocrinol*. 2003 Oct;17(10):2103-15.

Stojiljkovic I, Kumar V, Srinivasan N. Non-iron metalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria. *Mol Microbiol*. 1999 Jan;31(2):429-42.

Stork CJ, Li YV. Zinc release from thapsigargin/IP<sub>3</sub>-sensitive stores in cultured cortical neurons. *J Mol Signal*. 2010;5:5.

Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of  $Ca^{2+}$  from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 1983 Nov 3-9;306(5938):67-9.

Struck NS, Dias SD, Langer C, Marti M, Pearce JA, Cowman AF, et al. Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP. *Journal of Cell Science*. 2005 Dec 1;118(23):5603-13.

Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol.* 2002 Dec 4;32(13):1645-53.

Surolia N, Padmanaban G. de novo biosynthesis of heme offers a new chemotherapeutic target in the human malarial parasite. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Sep 16;187(2):744-50.

Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, et al. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol.* 1996 Mar 1;156(5):1897-907.

Taliaferro WIH, Taliaferro JG. Superinfection and protective experiments with Plasmodium brasilianum in monkeys. *American Journal of Hygiene.* 1934 Jul;20(1):60-72.

Taylor CW, Genazzani AA, Morris SA. Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium.* 1999 Dec;26(6):237-51.

Taylor CW, Laude AJ. IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium.* 2002 Nov-Dec;32(5-6):321-34.

Terry MJ, Linley PJ, Kohchi T. Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans.* 2002 Aug;30(4):604-9.

Thomas AP, Alexander J, Williamson JR. Relationship between Inositol Polyphosphate Production and the Increase of Cytosolic Free Ca<sup>2+</sup> Induced by Vasopressin in Isolated Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 1984;259(9):5574-84.

Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 2005 Sep;39(2):99-104.

Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976 Aug 20;193(4254):673-5.

Tsim ST, Wong JT, Wong YH. Calcium ion dependency and the role of inositol phosphates in melatonin-induced encystment of dinoflagellates. *J Cell Sci.* 1997 Jun;110 ( Pt 12):1387-93.

Uchiyama T, Yoshikawa F, Hishida A, Furuichi T, Mikoshiba K. A novel recombinant hyperaffinity inositol 1,4,5-trisphosphate (IP(3)) absorbent traps IP(3), resulting in specific inhibition of IP(3)-mediated calcium signaling. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8106-13.

Usui-Aoki K, Matsumoto K, Koganezawa M, Kohatsu S, Isono K, Matsubayashi H, et al. Targeted expression of Ip3 sponge and Ip3 dsRNA impairs sugar taste sensation in Drosophila. *J Neurogenet.* 2005 Jul-Dec;19(3-4):123-41.

Vaid A, Ranjan R, Smythe WA, Hoppe HC, Sharma P. PfPI3K, a phosphatidylinositol-3 kinase from Plasmodium falciparum, is exported to the host erythrocyte and is involved in hemoglobin trafficking. *Blood.* 2010 Mar 25;115(12):2500-7.

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*. 2006 Sep 15;281(37):27126-33.

Vaid A, Thomas DC, Sharma P. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5589-97.

van Deenen LL, de Gier J, Demel RA, de Kruyff B, Blok MC, van der Neut-Kok EC, et al. Lipid-lipid and lipid-protein interaction in model systems and membranes. *Ann N Y Acad Sci*. 1975 Dec 30;264:124-41.

Van der Zee J, Barr DP, Mason RP. ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(2):199-206.

Van Petegem F. Ryanodine receptors: structure and function. *J Biol Chem*. 2012 Sep 14;287(38):31624-32.

Vanecek J. Cellular mechanism of melatonin action in neonatal rat pituitary. *Neuroendocrinology*. 1995 Jan;61(1):27-30.

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

Vial HJ, Ancelin ML, Philippot JR, Thuet MJ. Biosynthesis and dynamics of lipids in *Plasmodium*-infected mature mammalian erythrocytes. *Blood Cells*. 1990;16(2-3):531-55; discussion 56-61.

Violin JD, Zhang J, Tsien RY, Newton AC. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol*. 2003 Jun 9;161(5):899-909.

Vreman HJ, Cipkala DA, Stevenson DK. Characterization of porphyrin heme oxygenase inhibitors. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1996 Mar;74(3):278-85.

Wang J, de Montellano PR. The binding sites on human heme oxygenase-1 for cytochrome p450 reductase and biliverdin reductase. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):20069-76.

Wengelnik K, Vial HJ. Characterisation of the phosphatidylinositol synthase gene of *Plasmodium* species. *Res Microbiol*. 2007 Jan-Feb;158(1):51-9.

Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Sun J, Loehr TM. Heme oxygenase (HO-1): His-132 stabilizes a distal water ligand and assists catalysis. *Biochemistry*. 1996 Jan 23;35(3):930-6.

Woodcock EA, Lambert KA, Du XJ. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> during myocardial ischemia and its relationship to the development of arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol*. 1996 Oct;28(10):2129-38.

Worrall E, Basu S, Hanson K. Is malaria a disease of poverty? A review of the literature. *Tropical Medicine & International Health*. 2005 Oct;10(10):1047-59.

Wu Y, Sifri CD, Lei HH, Su XZ, Wellems TE. Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Feb 14;92(4):973-7.

## APÊNDICE

Publicação: Melatonin and IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells.





# Melatonin and IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> Release from Intracellular Stores in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* within Infected Red Blood Cells\*

Received for publication, September 24, 2010, and in revised form, December 10, 2010. Published, JBC Papers in Press, December 13, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.188474

Eduardo Alves<sup>‡§1</sup>, Paula J. Bartlett<sup>‡</sup>, Celia R. S. Garcia<sup>¶2</sup>, and Andrew P. Thomas<sup>‡3</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Pharmacology and Physiology, UMDNJ, New Jersey Medical School, Newark, New Jersey 07103 and the <sup>§</sup>Departamento de Parasitologia and <sup>¶</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil CEP 05508-900

IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling controls a myriad of cellular processes in higher eukaryotes and similar signaling pathways are evolutionarily conserved in *Plasmodium*, the intracellular parasite that causes malaria. We have reported that isolated, permeabilized *Plasmodium chabaudi*, releases Ca<sup>2+</sup> upon addition of exogenous IP<sub>3</sub>. In the present study, we investigated whether the IP<sub>3</sub> signaling pathway operates in intact *Plasmodium falciparum*, the major disease-causing human malaria parasite. *P. falciparum*-infected red blood cells (RBCs) in the trophozoite stage were simultaneously loaded with the Ca<sup>2+</sup> indicator Fluo-4/AM and caged-IP<sub>3</sub>. Photolytic release of IP<sub>3</sub> elicited a transient Ca<sup>2+</sup> increase in the cytosol of the intact parasite within the RBC. The intracellular Ca<sup>2+</sup> pools of the parasite were selectively discharged, using thapsigargin to deplete endoplasmic reticulum (ER) Ca<sup>2+</sup> and the antimalarial chloroquine to deplete Ca<sup>2+</sup> from acidocalcisomes. These data show that the ER is the major IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> store. Previous work has shown that the human host hormone melatonin regulates *P. falciparum* cell cycle via a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway. In the present study, we demonstrate that melatonin increases inositol-polyphosphate production in intact intraerythrocytic parasite. Moreover, the Ca<sup>2+</sup> responses to melatonin and uncaging of IP<sub>3</sub> were mutually exclusive in infected RBCs. Taken together these data provide evidence that melatonin activates PLC to generate IP<sub>3</sub> and open ER-localized IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in *P. falciparum*. This receptor signaling pathway is likely to be involved in the regulation and synchronization of parasite cell cycle progression.

Malaria, caused by the obligate *Plasmodium* parasite, infects over 300 million people annually and resistance to current antimalarial drugs is an increasing problem (1–5). The intraerythrocytic phase of *Plasmodium falciparum*, the most lethal human malaria parasite, is the primary cause of malaria morbidity and mortality. Therefore, arrest of the red blood

cell (RBC)<sup>4</sup> stage of *Plasmodium* life cycle is a clear pharmaceutical target. The RBC cycle of *P. falciparum* occurs over a period of 48 h (the life cycles of other *Plasmodium* species are also multiples of 24 h) and consists of three stages of parasite development known as ring, trophozoite, and schizont. Proliferation occurs by lysis of the RBC to release merozoites, which are the product of the end of shizogony. This is followed by rapid reinvasion of uninfected RBCs to complete the cycle (6–9). The ability to overcome host defenses relies upon the synchrony of merozoite release into the blood stream, usually at a specific time of day (10, 11). Therefore, key to *P. falciparum* survival is synchronous maturation within the RBC. Clear evidence supports a role of host circadian rhythm in this process, mediated by melatonin and/or related host hormones (12–15).

Parasites like most eukaryotes, utilize second messenger signaling cascades involving Ca<sup>2+</sup> and cAMP to coordinate cell function (6, 14, 16–20). The Ca<sup>2+</sup> signaling toolkit in vertebrates is now well characterized (21, 22) and genetic (18, 23, 24) and pharmacological studies (14, 25) are increasing our knowledge of the signaling proteins that are evolutionarily conserved from Apicomplexa (the *Plasmodium* phylum). To date, key components of the classical Ca<sup>2+</sup> release cascade have been described in Apicomplexans; including sequences of four putative heptahelical receptors (26), G-proteins, implied by the sensitivity of gametogenesis to cholera and pertussis toxins (27) and sequences of PLC-like isoenzymes (23, 28). Furthermore, Ca<sup>2+</sup> pumps such as SERCA and a plethora of Ca<sup>2+</sup>-regulated proteins have been identified (18, 29–33). A clear indication of the importance of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and Ca<sup>2+</sup> regulated signaling events in these organisms. However, a canonical IP<sub>3</sub> receptor transcript has yet to be identified in the genome of any Apicomplexan. Nevertheless, pharmacological data clearly demonstrate *P. falciparum* and the rodent malaria parasite *P. chabaudi* maintain intracellular Ca<sup>2+</sup> stores (14, 16, 34) and IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release has been demonstrated in isolated, permeabilized *P. chabaudi* (35). Importantly, evidence for the generation of the precursor of IP<sub>3</sub>-dependent signaling, PIP<sub>2</sub>, has also been shown in *P. knowlesi* and *P. falciparum* (36, 37). To date, in Apicom-

\* This work was supported, in whole or in part, by the Thomas P. Infusino Endowment (to A. P. T.), National Institutes of Health Grant DK082954, Fapesp (07/52924-0), Malaria Pronex, and INCT-INBqMed.

<sup>1</sup> Recipient of a Fapesp Fellowship.

<sup>2</sup> A CNPQ fellow. To whom correspondence may be addressed. E-mail: cgarcia@usp.br.

<sup>3</sup> To whom correspondence may be addressed. E-mail: thomasap@umdnj.edu.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: RBC, red blood cell; IP<sub>3</sub>, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>; ER, endoplasmic reticulum; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase; Chlor, chloroquine; Thaps, thapsigargin.

## Melatonin and IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Malaria Parasites

plexins a PLC-like enzyme has been cloned only from *Toxoplasma gondii* and interestingly the activity of this enzyme was greater with phosphatidylinositol rather than PIP<sub>2</sub> as a substrate (28). Nevertheless, IP<sub>3</sub> and DAG increases have been reported during *P. falciparum* gametocyte exflagellation involved in the sexual cycle and transmission to the mosquito vector (38) and Elabbadi *et al.*, (36) reported ionomycin-induced elevations in IP<sub>3</sub> in the asexual RBC stage of the life cycle, indicating an enzyme capable of PIP<sub>2</sub> hydrolysis is present in *P. falciparum*.

It is now well established that the host hormone melatonin (12), and its precursors *N*-acetylserotonin, tryptamine, serotonin, and *N*(1)-acetyl-*N*(2)-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) affect the intraerythrocytic *P. falciparum* cell cycle (13, 14, 39). These molecules were able to induce Ca<sup>2+</sup> release from cultured *P. falciparum* and *P. chabaudi* and importantly these responses were blocked by PLC inhibition and melatonin receptor antagonism (14). Similarly, the ability of melatonin and other tryptophan derivatives to synchronize *P. falciparum* cultures were also blocked by inhibition of PLC and melatonin receptors (13, 14, 40). Whereas, in the intraerythrocytic stages of *P. berghei* and *P. yoelii*, two rodent parasites that show asynchronous development (not linked to circadian rhythm) *in vivo*, melatonin does not modulate their cell cycle or elicit an elevation in intracellular Ca<sup>2+</sup> (41).

There is clear evidence that *P. falciparum* and other *Plasmodium* obligate parasites contain the molecular machinery for IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release (14, 35, 38). In the present study, we demonstrate unequivocally that intact *P. falciparum*, within their natural erythrocyte host cell, release Ca<sup>2+</sup> in response to IP<sub>3</sub>. Furthermore, we provide clear evidence that melatonin acts in *P. falciparum* to activate PLC and induce concurrent elevations in IP<sub>3</sub>. This key process in *P. falciparum* survival depends on IP<sub>3</sub> receptor function during the trophozoite stage of the intraerythrocytic life cycle. Considering the likely vast genetic divergence between mammalian and *Plasmodium* IP<sub>3</sub> receptors, this protein is a strong candidate for novel therapeutic intervention.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

***P. falciparum* Culture**—*P. falciparum* (D37) parasites were maintained in culture as described (42). Briefly, *P. falciparum* were cultured in RPMI media supplemented with 50 mg/liter hypoxanthine; 40 mg/liter gentamycin; 435 mg/liter NaHCO<sub>3</sub>; 5% A or O human red blood cells and 10% A or O human blood serum in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>; 3% O<sub>2</sub>; 92% N<sub>2</sub> at 37 °C. Media was changed every 24 h and RBCs replaced every 48 h. Parasitemia and the development stage of synchronized cultures were determined by Giemsa-stained smears.

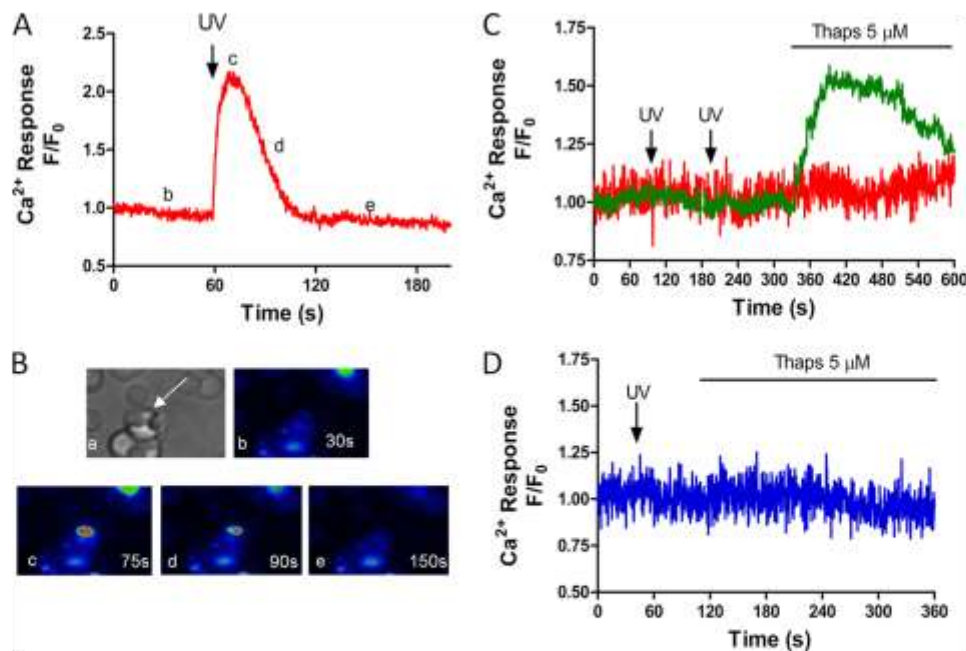
**Photorelease of Caged-IP<sub>3</sub> and Ca<sup>2+</sup> Imaging**—*P. falciparum* infected erythrocytes were washed in HEPES-buffered saline solution (HBSS) (in mM: 25 HEPES, 121 NaCl, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 0.04 probenecid, and 0.25% (w/v) fatty acid-free BSA, pH 7.4) and co-loaded, in suspension, with caged-IP<sub>3</sub> (2 mM; siChem) and Fluo4-AM (5 mM; Invitrogen, 37 °C) for 45 min. Cells were washed with HBSS and seeded onto borosilicate glass coverslips coated with poly-L-lysine and incubated for 15

min at room temperature to enable cell adherence. Cells were washed and mounted on the stage of an Axiovert2000 (Zeiss) spinning disc confocal microscope. Fluo4-AM fluorescence images (Argon laser excitation 488 nm, emission 510 nm) were acquired at 2 Hz with a cooled charge-coupled device (CCD) camera using the data acquisition software Piper Control™ (Stanford Photonics). Photo release of caged-IP<sub>3</sub> was achieved by light pulses (1 ns duration with a wavelength of 337 nm and 1.45 mJ of energy) from a nitrogen charged UV flash lamp (Photon Technology International) guided through the objective (C-Achromatx40/1.2). Data analysis was performed using ImageJ (NIH).

**Measurement of [<sup>3</sup>H]Inositol Polyphosphates**—The parasites were synchronized with sorbitol treatment (43) and cultured to a parasitemia of 5%. At late trophozoite stage the culture was resuspended in RPMI medium complemented with 5% human serum containing 2.5 Ci/ml [<sup>3</sup>H-*myo*]inositol (Perkin Elmer). Labeling continued until young trophozoite phase and 10% parasitemia. The infected erythrocyte culture was then washed in HBSS and preincubated in for 20 min with 10 mM LiCl<sub>2</sub> to block inositol monophosphate hydrolysis prior to addition of melatonin or other test agents. The incubation was terminated by addition of ice-cold trichloroacetic acid, the water soluble [<sup>3</sup>H]inositol containing components were then extracted by addition of tri-*n*-octylamine:1,1,2-trichloroethane (1:1 ratio) and [<sup>3</sup>H]inositol phosphates were separated by ion exchange chromatography (44) using Dowex resin in the formate form. Lower order inositols and glycerophospholipids were removed by elution with 40 ml 0.4 M ammonium formate/0.1 M formic acid. IP<sub>3</sub> and higher order inositols were then eluted with 10 ml of 1.2 M ammonium formate/0.1 M formic acid. Ultima-Flo (Perkin Elmer) was added to the eluate and DPM determined using liquid scintillation counting. Data are expressed as a fold increase over non-infected red blood cell controls loaded with 2.5 Ci/ml [<sup>3</sup>H-*myo*]inositol in parallel.

### RESULTS

**Photorelease of Caged IP<sub>3</sub> Induces Ca<sup>2+</sup> Mobilization in Intact *P. falciparum***—In this study, IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release has been examined in intact *P. falciparum* within the host erythrocyte using flash photolysis of cell permeant caged-IP<sub>3</sub>. The development of this cell permeant form of caged-IP<sub>3</sub> (45) provides a sophisticated tool to manipulate cytosolic IP<sub>3</sub> levels under physiological conditions, and is particularly well suited to the intraerythrocytic malaria parasite because this is intractable to other methods to modify cytosolic IP<sub>3</sub> levels. Infected erythrocytes were co-loaded with both the cell permeant caged-IP<sub>3</sub> and Fluo4-AM for 45 min, a period sufficient to enable de-esterification of these molecules in mammalian systems (46). UV flash photolysis of caged-IP<sub>3</sub> under these conditions elicited a rapid and transient increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> in RBCs infected with *P. falciparum* (Fig. 1A, representative trace of 81 cells from 15 independent experiments and Fig. 1B confocal images with Ca<sup>2+</sup> changes shown in pseudocolor). A number of controls were performed to confirm that photorelease of caged IP<sub>3</sub> is acting specifically on receptors in *P. falciparum* within RBCs. Firstly, we as-

Melatonin and IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Malaria Parasites

**FIGURE 1. Flash photolysis of caged-IP<sub>3</sub> induces calcium release in *P. falciparum*-infected RBC.** *A* and *B*, *P. falciparum*-infected RBCs were loaded in HBSS with Fluo4-AM (5  $\mu$ M) and caged-IP<sub>3</sub> (2  $\mu$ M) for 45 min, then allowed to adhere to poly-L-lysine-coated coverslips. Changes in intracellular  $Ca^{2+}$  were monitored at 2 Hz using a spinning disc confocal microscope coupled to a CCD camera. Flash photolysis of caged-IP<sub>3</sub> was achieved with a nitrogen-charged UV laser. *A*, representative trace of UV-induced Ca<sup>2+</sup> increase in intact *P. falciparum* (UV flash indicated by arrow at 60 s). *B*, confocal images of the cell in *Panel A* to show: (*a*) transmitted light image depicting *P. falciparum* within RBC (arrow); (*b–e*) changes in Ca<sup>2+</sup> are shown in pseudocolor (blue lowest and red highest [Ca<sup>2+</sup>]) at (*b*) baseline (*t* = 30 s) (*c*) peak Ca<sup>2+</sup> transient (*t* = 75 s), (*d*) half-peak height (*t* = 90 s), and (*e*) return to baseline (*t* = 150 s). Data are representative of 81 cells from 15 experiments. *C*, representative traces of infected (green) and uninfected (red) RBC loaded with Fluo4-AM in the absence of caged-IP<sub>3</sub> (UV flashes at 75 and 180 s). *D*, representative trace of uninfected RBC in the presence of caged-IP<sub>3</sub> (UV flash at 40 s). Thapsigargin (5  $\mu$ M, *Thaps*) was added as indicated.

sessed the effect of IP<sub>3</sub> photolysis on uninfected erythrocytes. Our data demonstrate RBCs are insensitive to UV laser pulses in both the absence Fig. 1C and presence Fig. 1D of caged-IP<sub>3</sub>.

This result was not unexpected as mammalian RBCs lack endoplasmic reticulum. However, these results confirm that these cells are devoid of any IP<sub>3</sub> sensitive Ca<sup>2+</sup> store and, therefore, do not contribute to the Ca<sup>2+</sup> response shown in Fig. 1, *A* and *B*. Importantly, we also demonstrate UV laser excitation is without effect on *P. falciparum*-infected RBC in the absence of caged-IP<sub>3</sub> (Fig. 1C). These data also confirm that our protocol to photolyze the chemical cage on IP<sub>3</sub> does not result in a Ca<sup>2+</sup> response mediated by any cytotoxic effect of UV excitation in infected erythrocytes.

All experiments were performed in the presence of 40  $\mu$ M probenecid, a nonspecific inhibitor of organic anion transport (47, 48) to block cellular loss and compartmentalization of the Ca<sup>2+</sup> indicator. Previous studies have shown that Ca<sup>2+</sup> indicator dyes accumulate in the parasite acidic food vacuole (49, 50), complicating measurements of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in the intraerythrocytic parasite. Consistent with this, in the absence of probenecid we observed no Ca<sup>2+</sup> response to photolysis of caged-IP<sub>3</sub> and little or no response to SERCA blockade with thapsigargin in *P. falciparum*-infected RBCs (Fig. 2A) compared with responses in the presence of probenecid (Fig. 2B). Thus in *P. falciparum* in the absence of probenecid, anion transporters appear to allow Fluo-4AM accumulation in intracellular compartments.

**Investigation of IP<sub>3</sub>-sensitive Stores in *P. falciparum***—Previous studies in isolated permeabilized malaria parasites have

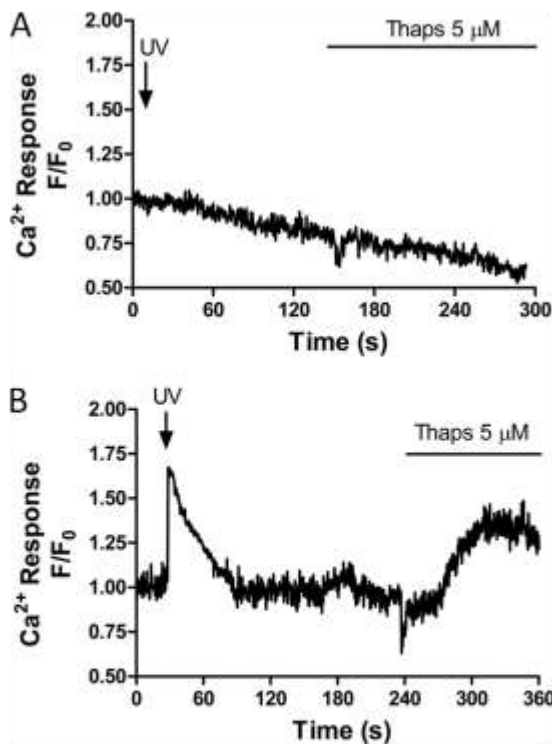
revealed the presence of both ER and acidic vacuole Ca<sup>2+</sup> stores within *P. chabaudi* and *P. falciparum* (16, 35). To establish the sensitivity of these organelles to IP<sub>3</sub> in intact *P. fal-*

*ciparum*, the ability of caged-IP<sub>3</sub> to elicit Ca<sup>2+</sup> release after depletion of each compartment was characterized in intraerythrocytic parasites. Depletion of the acidic pool with chloroquine (10  $\mu$ M) did not affect the ability of the *P. falciparum* to respond to photolysis of IP<sub>3</sub> (Fig. 3B, representative trace of 11 cells from three independent experiments). However, depletion of ER Ca<sup>2+</sup> with thapsigargin (5  $\mu$ M) abolished IP<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> release (Fig. 3A, representative trace of 12 cells from three experiments). These data suggest that in *P. falciparum* the ER is the major IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> store.

**Melatonin Activates PLC to Increase Inositol Polyphosphates in Intact *P. falciparum***—We have previously demonstrated that the host hormone melatonin, and its metabolites, elicit Ca<sup>2+</sup> increases in intact *P. chabaudi* (12)- and *P. falciparum* (13)-infected RBCs. Fig. 4, *A* and *B* show the melatonin-induced Ca<sup>2+</sup> signals with high temporal and spatial resolution. To test the hypothesis that hormone-induced Ca<sup>2+</sup> release proceeds via a canonical PLC/IP<sub>3</sub> receptor pathway in *Plasmodia*, we examined the effect of melatonin on polyphosphoinositide levels. Sorbitol treatment was used to synchronize the cultures so that all of the parasites were at the same stage (43), and a parasitemia of 5% infected RBCs was obtained prior to [<sup>3</sup>H-myoinositol] labeling. It has been reported that *de novo* synthesis of polyphosphoinositides (the lipid precursors for IP<sub>3</sub>) is greatest during mature parasite development (trophozoite and schizont) and high during invasion

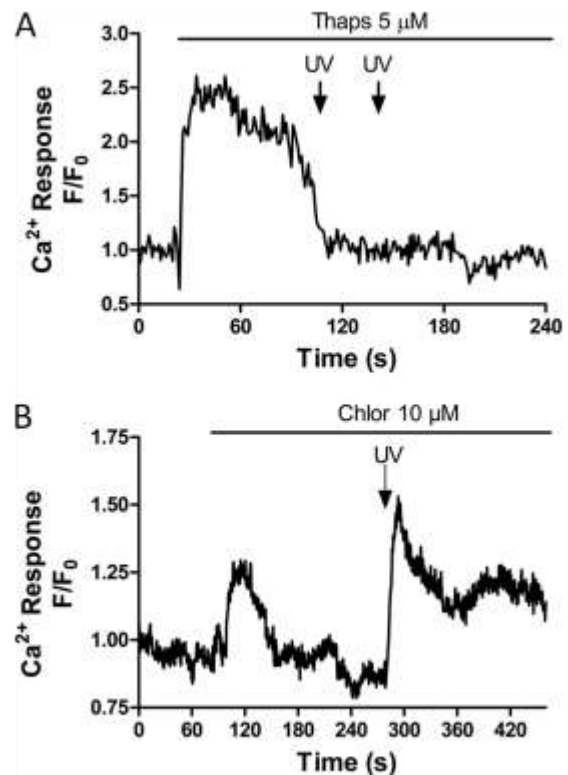


## Melatonin and $IP_3$ -induced $Ca^{2+}$ Release in Malaria Parasites



**FIGURE 2. Anion transport inhibition is required to detect changes in parasite cytosolic  $Ca^{2+}$ .** *P. falciparum*-infected RBCs were loaded with Fluo4-AM and caged- $IP_3$  in the presence or absence of the anion transport inhibitor probenecid (40  $\mu$ M) prior to activation with caged- $IP_3$  and thapsigargin (5  $\mu$ M). Shown are representative traces of changes in intracellular  $Ca^{2+}$  in the absence (A; representative of 36 cells from 11 independent experiments) and presence of probenecid (B; 17 cells from three experiments), respectively.

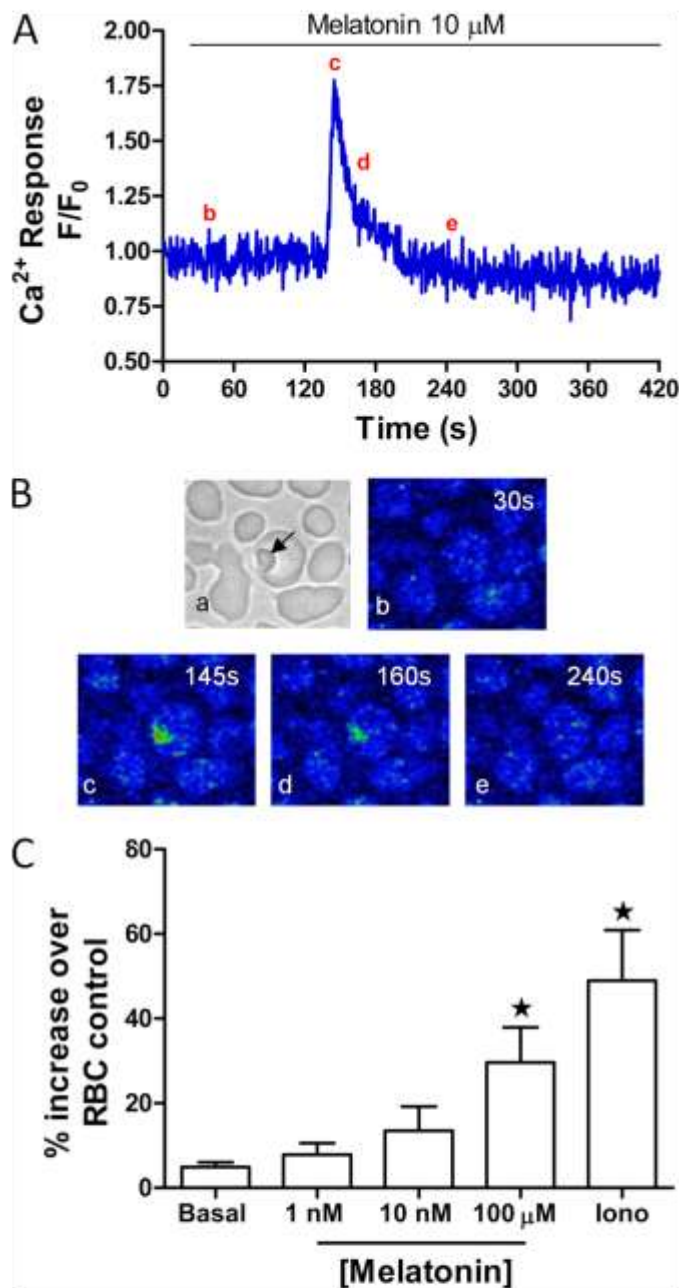
and early ring stages of the RBC lifecycle (36, 51). Therefore, in our experiments [ $^3H$ -myo]inositol loading commenced at the late trophozoite stage and the parasites were allowed to go through one RBC invasion cycle to ensure maximum incorporation into the lipid pool. We have found that the  $Ca^{2+}$  responses to melatonin occur predominantly at the trophozoite stage. Therefore, incubations with melatonin were performed after 36 h incubation with [ $^3H$ -myo]inositol at the early trophozoite phase, which was confirmed with Giemsa-stained smears. At this point, the parasitemia was typically about 10%. Mature erythrocytes turnover membrane lipids slowly and are devoid of the machinery for *de novo* inositol lipid synthesis, and thus incorporation of [ $^3H$ -myo]inositol into the RBC lipids is minimal in comparison to *P. falciparum* (37). Consistent with the work of Elabbadi *et al.*, (36), ionomycin (2  $\mu$ M) was capable of eliciting a robust increase in inositol polyphosphates of 49–20% compared with a basal level of 5–2% in untreated infected RBCs (Fig 4C) (data from three independent experiments performed in triplicate and expressed as percentage increase over non-infected RBC control). In the same series of experiments, melatonin (100  $\mu$ M) elicited an increase of 30–14% in inositol polyphosphate generation (Fig 4C). Increases of inositol polyphosphate formation at lower levels of melatonin followed the same trend but did not rise to significance when compared with the control cells without added melatonin (basal).



**FIGURE 3.  $IP_3$ -dependent  $Ca^{2+}$  release arises from the thapsigargin-sensitive store.** Endoplasmic reticulum and acidic compartment  $Ca^{2+}$  stores were discharged independently with thapsigargin (5  $\mu$ M) or chloroquine (10  $\mu$ M, Chlor) before photolysis of caged- $IP_3$ . A, representative trace (12 cells from three experiments) to show thapsigargin depletes all  $IP_3$ -sensitive  $Ca^{2+}$  stores in *P. falciparum* and B, representative trace (11 cells from three experiments) to show chloroquine releases  $Ca^{2+}$  but does not deplete the  $IP_3$ -sensitive  $Ca^{2+}$  store.

**Melatonin Pretreatment Prevents  $IP_3$ -induced  $Ca^{2+}$  Release in Intact *P. falciparum***—To establish whether melatonin and caged- $IP_3$  release  $Ca^{2+}$  from the same intracellular store, we assessed the ability of *P. falciparum* to respond to photolysis of caged- $IP_3$  after challenging the cells with a maximal dose of melatonin (10  $\mu$ M). In any given microscope field, a melatonin-induced  $Ca^{2+}$  increase was observed in approximately half of the infected erythrocytes (44–14% in five independent experiments, 54 total cells examined), and almost all of those cells that did not respond to melatonin released  $Ca^{2+}$  upon photolysis of  $IP_3$  (50–15%). Fig 5A, shows representative traces of melatonin and  $IP_3$ -sensitive *P. falciparum* from the same coverslip. Interestingly, very few cells were capable of eliciting sequential  $Ca^{2+}$  transients to both melatonin (10  $\mu$ M) and photolysis of caged- $IP_3$ . Only 2 out of the 54 cells (7–4%) generated  $Ca^{2+}$  transients to both stimuli (Fig 4B). These data showing apparent overlap of the melatonin- and  $IP_3$ -sensitive  $Ca^{2+}$  intracellular stores are summarized in Fig 5C. Furthermore, photorelease of caged- $IP_3$  during a melatonin-dependent rise in intracellular  $Ca^{2+}$  did not potentiate the  $Ca^{2+}$  response (Fig 5D, representative of 4 cells from three independent experiments). Thus, these data provide clear evidence that melatonin releases  $Ca^{2+}$  from the ER  $IP_3$ -sensitive  $Ca^{2+}$  store in *P. falciparum*.

## Melatonin and IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Malaria Parasites



**FIGURE 4. Melatonin-induced inositol polyphosphate production in *P. falciparum* cultures.** *A*, representative trace of melatonin (10 nM)-induced Ca<sup>2+</sup> increase in infected RBC. *B*, confocal images of Ca<sup>2+</sup> changes in the cell shown in panel *A* (representative of 12 cells from three independent experiments); *B* shows confocal images to show: (*a*) transmitted light image depicting *P. falciparum* within RBC (arrow); (*b–e*) changes in Ca<sup>2+</sup> shown in pseudocolor (blue lowest and red highest [Ca<sup>2+</sup>]) at (*b*) baseline (*t* = 30 s) (*c*) peak Ca<sup>2+</sup> transient (*t* = 145 s), (*d*) half-peak height (*t* = 160 s) and (*e*) return to baseline (*t* = 240 s). *C*, melatonin-induced increases in inositol polyphosphate formation were measured in infected RBC cultures as described under “Experimental Procedures.” Prior to melatonin stimulation (1 nM, 10 nM, 100 nM, 20 min) cells were washed three times with HBSS then incubated for 20 min with LiCl<sub>4</sub> (10 nM). Data are presented as mean ± SE from three independent experiments performed in triplicate (\*, *p* < 0.05) compared with background [H<sup>3</sup>]inositol levels in non-infected RBC loaded in parallel.

*P. falciparum* Are Insensitive to IP<sub>3</sub> at the Schizont Stage of the Intraerythrocytic Cell Cycle—The above data all describe responses in *P. falciparum* at the trophozoite stage of the erythrocyte life cycle. Since we postulate that the IP<sub>3</sub>-depen-

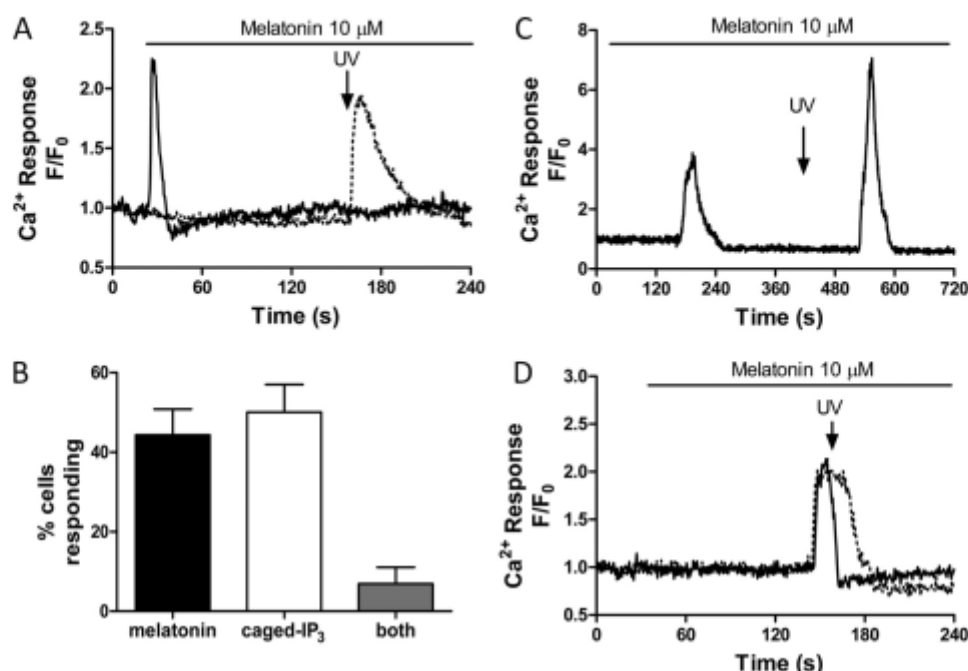
dent signaling cascade plays a vital role in the cell cycle progression, UV photolysis of caged-IP<sub>3</sub> was investigated at the schizont stage. Interestingly the ability of IP<sub>3</sub> to mobilize Ca<sup>2+</sup> in RBC infected by *P. falciparum* was not observed during the schizont stage (Fig. 5*A*, representative trace of 12 cells from 4 experiments). Importantly, Ca<sup>2+</sup> release was observed upon the addition of thapsigargin confirming the integrity of the intracellular Ca<sup>2+</sup> store under these conditions. Moreover, we have shown previously that Ca<sup>2+</sup> in the parasitophorous vacuole is necessary for the maintenance of Ca<sup>2+</sup> stores in the intraerythrocytic parasite (48) (and see “Discussion”), so these data suggest that mature schizonts rather than merozoites were being stimulated. Similarly, melatonin was not able to induce elevations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels when applied to parasites in the schizont phase (data not shown) or ring stage (13). These findings provide evidence for differential sensitivity to IP<sub>3</sub> and melatonin as *P. falciparum* parasites pass through the different intraerythrocytic developmental stages.

### DISCUSSION

Recent studies have begun to identify components of intracellular signaling cascades in *Plasmodium*. However it remains unclear when and how these signaling molecules act to trigger *Plasmodium* maturation, division, differentiation, and reinvasion during the asexual stage that takes place within red blood cells (30). As discussed in the Introduction, there is substantial evidence that *Plasmodia* and in particular, *P. falciparum* possess the molecular machinery for IP<sub>3</sub>-dependent signaling (12, 14, 16, 18, 48). Indeed, this pathway is integral to the maturation and survival within the host of this obligate parasite. In the present study, we utilized cell permeant caged-IP<sub>3</sub> to demonstrate unequivocally that IP<sub>3</sub>-induces Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores within intact *P. falciparum*. Moreover, our experiments were carried out with parasites developing inside the host red blood cell, demonstrating that Ca<sup>2+</sup> mobilization in response to IP<sub>3</sub> occurs in the normal physiological environment. It should also be noted that native (uninfected) red blood cells do not have intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, and consistent with this uncaging of IP<sub>3</sub> did not elicit any change in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in these host cells.

One potential question is how does the malaria parasite maintain intracellular Ca<sup>2+</sup> stores for signaling while it is sequestered within the RBC cytoplasm? The parasitophorous vacuole is formed by invagination of the RBC plasma membrane during parasite invasion, and is believed to include a number of ion pumps that would serve to transportions, including Ca<sup>2+</sup>, from the host erythrocyte cytoplasm into the lumen of the vacuole. The vacuole may also communicate directly with the extracellular medium surrounding the RBC through a parasitophorous duct that is permeable to small molecules and ions (52). Thus, the parasitophorous vacuole plays a key role in providing a relatively Ca<sup>2+</sup>-rich environment to the intraerythrocytic parasite for use in Ca<sup>2+</sup> signaling. In a previous study (48), we have measured the Ca<sup>2+</sup> concentration in the vacuole using Ca<sup>2+</sup> indicator dyes sequestered into this compartment during merozoite invasion of the RBC. The measured free Ca<sup>2+</sup> concentration in the

### Melatonin and $IP_3$ -induced $Ca^{2+}$ Release in Malaria Parasites



**FIGURE 5.  $Ins1,4,5P_3$ -induced  $Ca^{2+}$  increases are abolished after melatonin stimulation.** Infected RBCs co-loaded with Fln4-AM and caged- $IP_3$  were challenged with melatonin ( $10 \mu M$ ) prior to flash photolysis of caged- $IP_3$ . *A*, representative trace of cells from the same coverslip responding to melatonin (solid line) or  $IP_3$  uncaging (dotted line). Similar results were obtained in 5 separate experiments, with 54 total cells analyzed. *B*, representative trace of cells (2 out of 54) which released  $Ca^{2+}$  to both stimuli. *C*, percentage of cells responding to melatonin ( $10 \mu M$ ), photolysis of caged- $IP_3$  or both (data are the mean  $\pm$  S.E. from five experiments). *D*, representative traces of cells in which flash photolysis of caged- $IP_3$  was performed during the melatonin-induced  $Ca^{2+}$  transient, showing no further  $Ca^{2+}$  release with the uncaging of  $IP_3$  (representative of 4 cells from three independent experiments).

vacuole was  $40 \mu M$ , which is low relative to plasma free  $Ca^{2+}$ , but is apparently sufficient to sustain the filling of intracellular  $Ca^{2+}$  stores within the parasite and hence maintain cytosolic  $Ca^{2+}$  signaling in the intraerythrocytic *Plasmodia* (48). Experiments with isolated parasites have shown a transient cytosolic  $Ca^{2+}$  response in the absence of external  $Ca^{2+}$  that has a second phase of increase following  $Ca^{2+}$  readdition, suggesting a potential role of capacitive calcium entry (14).

Pharmacological effectors of the known intracellular  $Ca^{2+}$  stores in malaria parasites were used to investigate the source of  $Ca^{2+}$  mobilized by  $IP_3$ . Thapsigargin was used to inhibit SERCA and release  $Ca^{2+}$  from the ER, and chloroquine was used to collapse the pH gradient and release  $Ca^{2+}$  from the acidic pool. These experiments demonstrate that the ER is the major  $IP_3$ -sensitive  $Ca^{2+}$  store in *P. falciparum*, since we show  $IP_3$ -dependent  $Ca^{2+}$  release was abolished after SERCA inhibition, but was unaffected by chloroquine. We have previously reported that thapsigargin did not fully block the  $Ca^{2+}$  release by exogenous  $IP_3$  addition ( $5 \mu M$ ) to permeabilized *P. chabaudi* parasites (35). This residual increment of  $IP_3$ -induced  $Ca^{2+}$  release in the permeabilized parasites was apparently derived from the chloroquine-sensitive  $Ca^{2+}$  pool. This discrepancy between the present and previous studies may reflect a difference between *P. chabaudi* (rodent malaria) and *P. falciparum* (human malaria) in terms of  $IP_3$  receptor location and/or density. However, it should be noted that this present study assesses the sensitivity of the acid compartments to  $IP_3$  under much more physiological conditions, because the cell-permeant caged- $IP_3$  does not require isolation and permeabilization of the parasites prior to  $IP_3$  addition as used in previous investigations. Moreover, flash photolysis

releases only a fraction of the  $2 \mu M$  caged- $IP_3$  included in the loading buffer, as indicated by the ability of cells to respond to more than one round of  $IP_3$  uncaging and the need to use multiple pulses to reach the threshold for  $Ca^{2+}$  release in some experiments. These data also provide evidence that the  $IP_3$  levels generated by a single photolysis pulse were not saturating for the *P. falciparum*  $IP_3$ -receptor  $Ca^{2+}$  channel. Therefore, the fact that  $Ca^{2+}$  release elicited by  $IP_3$  uncaging occurred as an all-or-nothing response (amplitude and kinetics), suggests there may be positive feedback on the  $Ca^{2+}$  release channel(s) as observed in mammalian  $IP_3$ -receptors (21, 22). When our intact red blood cell parasite cultures were incubated with higher concentrations of caged- $IP_3$  ( $3\text{--}5 \mu M$ ) UV flash photolysis often resulted in irreversible elevations in  $Ca^{2+}$  and consequently cell death (data not shown). This observation suggests the *Plasmodia*  $IP_3$  receptors, unlike their mammalian analogues (21), may not be sensitive to  $Ca^{2+}$ -dependent inhibition.

The present study provides the first direct evidence that the host hormone melatonin elicits a rise in intracellular  $IP_3$  levels in the malaria parasite. Previous studies in which *P. falciparum* was labeled with [ $^3H$ -myo]inositol have shown that the  $Ca^{2+}$  ionophore, ionomycin is capable of increasing inositol phosphate levels (presumably by  $Ca^{2+}$ -dependent activation of PLC) (36). Our data clearly demonstrate a receptor coupled event leading to increased inositol polyphosphate levels and strongly support the role of a G-protein and PLC dependent signaling cascade in this organism. In mammalian systems it has been possible to separate individual inositol phosphate isomers (53), however because the number of infected RBCs is low ( $< 10\%$ ), and the parasites occupy only a small fraction of

## Melatonin and IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Malaria Parasites

the RBC volume, there was not sufficient signal to measure individual inositol phosphate isomers in our experiments. Instead, the anion exchange column method was used to elute total IP<sub>3</sub> and IP<sub>4</sub> isomers together (IP<sub>3</sub> + IP<sub>4</sub>) in the presence of LiCl to inhibit inositol phosphate breakdown (36, 53, 54). However, as we assume IP<sub>4</sub> is derived from the generation of IP<sub>3</sub>, this is the first report of hormone-induced IP<sub>3</sub> generation in *P. falciparum*.

As mentioned in the "Results," increases in inositol polyphosphates by melatonin concentrations below 100 nM were not significant. Melatonin in the lower range is capable of exerting effects on life cycle progression when included in RBC malaria parasite cultures (13, 40). However, these cell cycle progression effects of melatonin occur on a much slower timescale than the 20-min incubations in the present experiments, and the associated Ca<sup>2+</sup> increases are also slower and of lower amplitude (40). Melatonin is relatively hydrophobic (Log<sub>p</sub> 1.6) and is expected to cross the erythrocyte and parasitophorous membranes. However, we cannot be sure of the actual concentration of melatonin perceived by the parasite after only 20 min of exposure. Thus higher concentrations may be necessary to elicit maximal amplitude and immediate responses at the level of inositol phosphate generation and Ca<sup>2+</sup> mobilization.

Previous studies from our laboratory have shown that the effects of melatonin on parasite Ca<sup>2+</sup> release and synchronized progression through the cell cycle are blocked by the PLC inhibitor U73122 (13, 14, 40). Importantly, the activation of PLC by melatonin in *P. falciparum* is corroborated in this study without the use of pharmacological inhibitors and the potential nonspecific effects of these compounds. In humans, melatonin receptors MT1 and MT2 couple predominately to

G<sub>i</sub> (55) and thus mediate their cellular effects via inhibition of adenylate cyclase and PKA. However, melatonin receptors can also couple to G-proteins that lead to PLC activation and IP<sub>3</sub> generation (56–58), including in *Xenopus* melanocytes (59) and unicellular eukaryotic dinoflagellates (60). In common with the IP<sub>3</sub> receptor, the lack of an identified melatonin receptor in the *Plasmodium* genome database suggests that the molecular identity of the *P. falciparum* melatonin receptor protein is far removed from the human host. Indeed, we have demonstrated that cAMP levels and PKA activity are actually increased by melatonin in *P. falciparum*, and this plays an important role in parasite synchronization (17). This melatonin-induced increase in cAMP is a secondary consequence of the activation of PLC and associated Ca<sup>2+</sup> mobilization. Further evidence for the presence of a *P. falciparum* melatonin receptor comes from the finding that the antagonist luzindole (61) inhibits melatonin-induced Ca<sup>2+</sup> release and the synchronization of cell cycle progression in the parasite (12, 13). Interestingly, this antagonist shows more than 10-fold greater selectivity for MT2 over MT1 melatonin receptors, and it is also an effective antagonist of the *Xenopus* melatonin receptor (62).

In contrast to our observations of Ca<sup>2+</sup> mobilization by IP<sub>3</sub> uncaging and melatonin addition at the trophozoite stage of *P. falciparum*, we did not observe any Ca<sup>2+</sup> response to either agent in intraerythrocytic schizonts. This

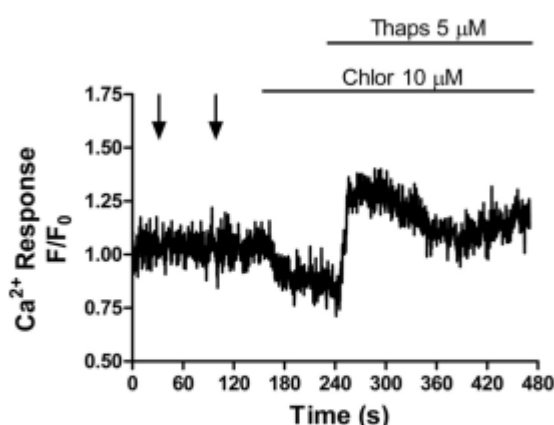


FIGURE 6. IP<sub>3</sub> receptor function is lost at schizony in *P. falciparum*. *P. falciparum* cells in the schizont phase were insensitive to photolysis of caged-IP<sub>3</sub>. A representative trace of a schizont stimulated with two sequential pulses of UV (arrows), followed by chloroquine (10 μM), and thapsigargin (5 μM) (trace representative of 12 cells from four independent experiments). Thapsigargin-dependent release confirms that the ER Ca<sup>2+</sup> store is intact but insensitive to changes in IP<sub>3</sub> and chloroquine.

raises the interesting possibility that PLC-dependent signaling is regulated by stage specific expression of components of the intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling pathway. This is of particular relevance when considering the multitude of Ca<sup>2+</sup>-dependent kinases and binding proteins operative at different stages of both sexual and asexual development (30–32, 63, 64). It was recently reported that parasite egress from erythrocytes depends on the calcium-dependent protein kinase PfCDPK5 (33) a process that occurs during late schizogony. Moreover, another calcium-dependent kinase, PfpKB, is believed to be involved in the reinvasion of erythrocytes by the released merozoites (31, 32). It has also been reported that cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases in free merozoites in response to the change in K<sup>+</sup> ion concentration when they are released from the red blood cell (9). This Ca<sup>2+</sup> increase and the PfpKB activation are both blocked by the PLC inhibitor U73122 (9, 31, 32), implying that PLC/IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling may also be active during the late schizont and merozoite stage of the *P. falciparum* lifecycle, albeit activated by different extracellular signals. In our experiments we were not able to measure Ca<sup>2+</sup> signals in intraerythrocytic segmented (late phase) schizonts (Fig 6) and free merozoites were not observed.

In the present study, we provide clear and direct evidence that a classical PLC-dependent intracellular Ca<sup>2+</sup> release pathway exists in *P. falciparum*. This Ca<sup>2+</sup> signaling pathway is activated by melatonin, which provides a mechanism for coordination of parasite development and release by the human host hormone associated with circadian rhythm. Periodic fever due to synchronized parasite release is characteristic of human malaria, and may provide a mechanism for the parasite to overwhelm the immune system during release and reinvasion of new erythrocytes. Once inside the RBC, the parasite is protected from immunological recognition. Thus, blockade of the *Plasmodium* melatonin signaling pathway has pharmaceutical potential in preventing the synchronization of the parasite within the host.





## Melatonin and IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Malaria Parasites

**Acknowledgments**—We thank Dr. Fiddok and C. Brownback (Columbia University, Departments of Microbiology and Medicine, Hammer Health Sciences Center, New York) and Dr. Mohandas (Lindsey F. Kimball Research Institute, NY Blood Center) for kindly providing us with cultured *P. falciparum*.

### REFERENCES

- Breman, J. G. (2009) *Sci. Prog.* 92, 1–38
- Skinner-Adams, T. S., Stack, C. M., Trøenholme, K. R., Brown, C. L., Grembecka, J., Lowther, J., Mucha, A., Drag, M., Kafarski, P., McGowan, S., Whisstock, J. C., Gardiner, D. L., and Dalton, J. P. (2010) *Trends Biochem. Sci.* 35, 53–61
- Eklund, E. H., and Fidock, D. A. (2007) *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 363–370
- Kappe, S. H., Vaughan, A. M., Bodley, J. A., and Cowman, A. F. (2010) *Science* 328, 862–866
- Kocij, T. W., Janse, C. J., and Waters, A. P. (2006) *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 344–357
- Doenig, C., Baker, D., Billker, O., Blackman, M. J., Chitnis, C., Dhar Kumar, S., Heussler, V., Holder, A. A., Kocken, C., Krishna, S., Langley, G., Lasorder, E., Menard, R., Meissner, M., Pradel, G., Ranford-Cartwright, L., Sharma, A., Shama, P., Tardieux, T., Tatu, U., and Alano, P. (2009) *Parasite* 16, 169–182
- Haldar, K., and Mohandas, N. (2009) *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 87–93
- Garcia, C. R., de Azevedo, M. F., Wunderlich, G., Budu, A., Young, J. A., and Barnister, L. (2008) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 266, 85–156
- Singh, S., Alam, M. M., Pal-Bhownick, I., Bizzostowski, J. A., and Chitnis, C. E. (2010) *PLoS Pathog.* 6, e1000746
- Garcia, C. R., Markus, R. P., and Madeira, L. (2001) *J. Biol. Rhythms.* 16, 436–443
- Barnister, L., and Mitchell, G. (2003) *Trends Parasitol.* 19, 209–213
- Hotta, C. T., Gazarini, M. L., Beraldo, F. H., Varotti, F. P., Lopes, C., Markus, R. P., Pozzan, T., and Garcia, C. R. (2000) *Nat. Cell Biol.* 2, 466–468
- Beraldo, F. H., and Garcia, C. R. (2005) *J. Pineal Res.* 39, 224–230
- Beraldo, F. H., Mikoshiba, K., and Garcia, C. R. (2007) *J. Pineal Res.* 43, 360–364
- Srinivasan, V., Spence, D. W., Moscovitch, A., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Brown, G. M., and Cardinali, D. P. (2010) *J. Pineal Res.* 48, 1–8
- Varotti, F. P., Beraldo, F. H., Gazarini, M. L., and Garcia, C. R. (2003) *Cell Calcium* 33, 137–144
- Beraldo, F. H., Almeida, F. M., da Silva, A. M., and Garcia, C. R. (2005) *J. Cell Biol.* 170, 551–557
- Nagamune, K., and Sibley, L. D. (2006) *Mol. Biol. Evol.* 23, 1613–1627
- Krishna, S., and Squire-Pollard, L. (1990) *Parasitol. Today* 6, 196–198
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., and Moreno, S. N. J. (2005) *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 251–261
- Bernidge, M. J. (2002) *Cell Calcium* 32, 235–249
- Bernidge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Beriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyrle, S., Chan, M.-S., Nere, V., Shalom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Argiuoli, S., Perte, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M. A., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Cantoci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., and Berrill, B. (2002) *Nature* 419, 498–511
- Nagamune, K., Beatty, W. L., and Sibley, L. D. (2007) *Eukaryot. Cell* 6, 2147–2156
- Lovett, J. L., and Sibley, L. D. (2003) *J. Cell Sci.* 116, 3009–3016
- Madeira, L., Galante, P. A., Budu, A., Azevedo, M. F., Malnic, B., and Garcia, C. R. (2008) *PLoS ONE* 3, e1889
- Dyer, M., and Day, K. (2000) *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 437–448
- Fang, J., Marchesini, N., and Moreno, S. N. (2006) *Biochem. J.* 394, 417–425
- Billker, O., Lourido, S., and Sibley, L. D. (2009) *Cell Host Microbe* 5, 612–622
- Koyama, F. C., Chakrabarti, D., and Garcia, C. R. (2009) *Mol. Biochem. Parasitol.* 165, 1–7
- Vaid, A., and Sharma, P. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 27126–27133
- Vaid, A., Thomas, D. C., and Sharma, P. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 5589–5597
- Dvořák, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., Bright, A. T., Westerberger, S., Wirtzler, E., Blackman, M. J., Baker, D. A., Wardless, T. J., and Duraisingh, M. T. (2010) *Science* 328, 910–912
- Gazarini, M. L., and Garcia, C. R. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 138–144
- Passos, A. P., and Garcia, C. R. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 155–160
- Elabbadi, N., Anselin, M. L., and Vial, H. J. (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* 63, 179–192
- Wengelrik, K., and Vial, H. J. (2007) *Res. Microbiol.* 158, 51–59
- Martin, S. K., Jett, M., and Schneider, I. (1994) *J. Parasitol.* 80, 371–378
- Budu, A., Peres, R., Bueno, V. B., Catalani, L. H., and Garcia, C. R. (2007) *J. Pineal Res.* 42, 261–266
- Hotta, C. T., Markus, R. P., and Garcia, C. R. (2003) *Bras. J. Med. Biol. Res.* 36, 1583–1587
- Bagnanesi, P., Alves, E., da Silva, H. B., Epiphanyo, S., Mota, M. M., and Garcia, C. R. (2009) *Int. J. Gen. Med.* 2, 47–55
- Trager, W., and Jensen, J. B. (1976) *Science* 193, 673–675
- Lambros, C., and Vanderberg, J. P. (1979) *J. Parasitol.* 65, 418–420
- Bernidge, M. J., Downes, C. P., and Hanley, M. R. (1982) *Biochem. J.* 206, 587–595
- Dakin, K., and Li, W. H. (2007) *Cell Calcium* 42, 291–301
- Smith, I. F., Wiltgen, S. M., and Parker, I. (2009) *Cell Calcium* 45, 65–76
- Di Virgilio, F., Steinberg, T. H., and Silverstein, S. C. (1990) *Cell Calcium* 11, 57–62
- Gazarini, M. L., Thomas, A. P., Pozzan, T., and Garcia, C. R. (2003) *J. Cell Biol.* 161, 103–110
- Biagini, G. A., Bray, P. G., Spiller, D. G., White, M. R., and Ward, S. A. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 27910–27915
- Rohlbach, P., Friedrich, O., Hentschel, J., Plattner, H., Fink, R. H., and Lanzetta, M. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 27960–27969
- Olszewski, K. L., Morrissey, J. M., Wilinski, D., Burns, J. M., Vaidya, A. B., Rabinowitz, J. D., and Llinás, M. (2009) *Cell Host Microbe* 5, 191–199
- Pouville, B., Spiegel, R., Hsiao, L., Howard, R. J., Morris, R. L., Thomas, A. P., and Taraschi, T. F. (1991) *Nature* 353, 73–75
- Thomas, A. P., Alexander, J., and Williamson, J. R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5574–5584
- Irvine, R. F., Anggård, E. E., Letcher, A. J., and Downes, C. P. (1985) *Biochem. J.* 229, 505–511
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A., and Delagrèze, P. (2008) *Br. J. Pharmacol.* 154, 1182–1195
- Brydon, L., Rola, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P. J., Nanoff, C., Strosberg, A. D., and Jockers, R. (1999) *Mol. Endocrinol.* 13, 2025–2038
- Lai, F. P., Mody, S. M., Yung, L. Y., Kam, J. Y., Pang, C. S., Pang, S. F., and Wong, Y. H. (2002) *J. Neurochem.* 80, 736–745
- Steffens, F., Zhou, X. B., Sausbier, U., Sailer, C., Motejlek, K., Ruth, P., Oloese, J., Korth, M., and Wieland, T. (2003) *Mol. Endocrinol.* 17, 2103–2115
- Mullins, U. L., Fernandes, P. B., and Eison, A. S. (1997) *Cell Signal.* 9, 169–173
- Tsim, S.-T., Wong, J. T., and Wong, Y. H. (1997) *J. Cell Sci.* 110, 1387–1393
- Dubocovich, M. L. (1988) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246, 902–910
- Sugden, D. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* 213, 405–408
- Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R., Wenig, G., Franke-Fayard, B., and Brinkmann, V. (2004) *Cell* 117, 503–514
- Doerig, C., Billker, O., Hayslead, T., Sharma, P., Tobin, A. B., and Waters, N. C. (2008) *Trends Parasitol.* 24, 570–577