Piero Bagnaresi

Inter-relação do Ritmo e da Ação de Drogas
Antimaláricas na Infecção da Malária de
Roedores

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Célia
Regina da Silva Garcia

São Paulo

2009

Bagnaresi, Piero

Inter-relação do ritmo e da ação de
drogas antimaláricas na infecção da
malária de roedores

Número de páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.

1. Malária 2. Ritmos Biológicos 3.
Cálcio) I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Orientador(a)

À minha corajosa e batalhadora Mãe

He wishes for the cloths of Heaven

Had I the heavens' embroidered cloths,
Enwrought with golden and silver light,
The blue and the dim and the dark cloths
Of night and light and the half-light,
I would spread the cloths under your feet:
But I, being poor, have only my dreams;
I have spread my dreams under your feet;
Tread softly because you tread on my dreams.

William Butler Yates

Agradecimentos

Gostaria de agradecer cada pessoa que passou pela minha vida durante meu processo de doutoramento. Nele, não ganhei apenas bagagem acadêmica; aprendi muito sobre a vida. E descobri que ela deve ser vivida intimamente ligada as pessoas que se ama.

Primeiramente, agradeço a minha mãe, um exemplo de mulher forte, honesta e muito batalhadora. Não estaria aqui sem o seu apoio incondicional. Meu infinito amor é seu, sempre. Agradeço meu pai, que me ensinou lições importantes, e que me ajudaram a chegar aqui.

À Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia, muito obrigado pelos ensinamentos, pelo acompanhamento cuidadoso durante todo o meu processo de formação, que se iniciou 8 anos atrás, e pela oportunidade de trabalhar em um laboratório com a estrutura necessária e – muito mais importante - com uma equipe brilhante.

Agradeço em especial ao Dr. Flavio Beraldo e ao Prof. Dr. Marcos Gazarini, que me receberam quando eu ainda era um graduando no curso de graduação, e eles pós-graduandos. Foi com eles que aprendi as primeiras lições na bancada, e percebo que são talvez as mais importantes. Obrigado pelo apoio, pelo coleguismo e pela amizade. Agradeço também ao Dr. Robson Sartorello, com quem dividi toda a minha permanência no laboratório. Um grande amigo e um grande profissional.

Aprendi muito com as pessoas que passaram pelas bancadas de nosso laboratório durante minha iniciação científica e doutorado: Obrigado Fernandão, Carlos, Paula, Adne, Silvia, Alexandre, Monica, Miguel, Rafael, Henrique, Luciana e Mauro. Agradeço também aos integrantes atuais do grupo, que fazem com que o dia de trabalho seja muito recompensador: Alexandre Budu, Eduardo, Desirée, Fernanda,

Fernando Pretel, Fernando, Ramira, Julio, Miriam e Saulo. Espero que o sucesso abrace vocês, como vocês abraçam a ciência diariamente.

Agradeço aos meus amigos, que fora do ambiente profissional fazem a vida falar a pena. Vocês são peça fundamental da minha vida, e espero que vocês estejam cada vez presentes nela. Um obrigado muito especial a minha Juju, que divide todas as minhas frustrações, agonias, medos, felicidades, glórias... Meu coração é seu.

Obrigado aos funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, por todo o auxílio que me foi oferecido, e por toda infra-estrutura que pude desfrutar.

Agradeço a FAPESP, pelo apoio financeiro.

“A descoberta consiste em ver coisas que todo mundo vê, e pensar em algo que alguém jamais pensou”

-- Albert Szent-Gyorgyi

(1893 – 1986)

Índice

Introdução	01
Objetivos	31
Materiais e Métodos	32
Resultados e Discussão	41
Conclusões	83
Referências	84
Resumo	98
<i>Abstract</i>	99
Anexos	100

Introdução

Malaria

Hoje, 2,37 bilhões de pessoas vivem em áreas onde ocorre malária (Guerra *et al.*, 2008). A Organização Mundial de Saúde estima que 300 a 500 milhões de pessoas são infectadas anualmente, ocorrendo mais de 1 milhão de óbitos. Metade da população mundial está sobre risco de contrair a infecção. A malária, doença parasitária que mais mata no mundo, causada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, continua sendo um grande problema de saúde pública, que pode piorar ainda mais devido a crescente resistência das cepas de parasitas aos fármacos antimaláricos.

De acordo com o último relatório da OMS, 109 países e territórios são classificados como endêmicos, ou previamente endêmicos com risco de reintrodução da doença. Estes países são agrupados em 4 categorias, que descrevem a transição do controle da doença até a sua eliminação: Prevenção de reintrodução, eliminação, pré-eliminação e controle (Fig. 1).

Apesar da doença por em risco metade da população mundial, sua incidência é maior na África (Fig. 2), que responde por 85% dos casos estimados. Dos casos africanos, 98% são causados pelo *P. falciparum*, parasita que causa formas mais severas da doença. Esse parasita causa 92% dos casos estimados no mundo (OMS, 2008).

Figura 1. Mapa de distribuição dos países classificados pelo estado do controle de malária (OMS, 2008)

Figura 2. Incidência de malária por 1000 habitantes em 2006 (OMS, 2008).

A forma severa da doença é uma importante desordem multi-sistêmica, apresentando diversos sintomas: i) anemia severa crônica, causada pela hemólise dos eritrócitos circulantes e pela redução de sua produção; ii) acidose metabólica; iii) importante resposta inflamatória, mediada por interleucina-10 (IL-10), TNF, interferon- γ e óxido nítrico (NO). Além disso, pode ocorrer sintomas relacionados com o sequestramento de parasitas na microcirculação de diversos tecidos, devido a citoaderência dos parasitas ao endotélio dos capilares. No baço, esse fenômeno gera esplenomegalia. A obstrução dos vasos no cérebro acarretam malária cerebral, responsável por grande parte dos óbitos registrados. O sequestramento pode se dar na placenta durante a gravidez, caracterizando malária maternal, que ocasiona mortalidade neonatal (Mackintosh *et al.*, 2004). Pode atingir o pulmão, causando lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda (Mohan *et al.*, 2008).

Compreendendo um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado, o ciclo de vida do parasita pode variar entre as espécies de parasitas e hospedeiros, mas mantêm pontos comuns entre eles. O ciclo sexuado do parasita se dá no hospedeiro invertebrado, que tem início com a picada do inseto em um hospedeiro vertebrado, assim ingerindo eritrócitos infectados com gametócitos de *Plasmodium*. Os eritrócitos sofrem lise quando chegam no trato digestivo do inseto, e os gametócitos são liberados na luz do tubo digestivo, onde, depois de diferenciados em microgametas e macrogametas, se unem e formam o zigoto. Este zigoto apresenta mobilidade e por essa característica é denominado oocineto. O oocineto atravessa a parede do tubo digestivo e penetra em sua parede, desenvolvendo-se em um oocisto. O oocisto se

rompe, liberando esporozoítos na hemocele do vetor, de onde migram para as glândulas salivares do inseto (Enserink, 2000)

O ciclo assexuado acontece no hospedeiro vertebrado, e se inicia pela picada da fêmea do vetor. Durante a hemofagia, o inseto injeta sua saliva, que age como um anticoagulante e contém esporozoítos. Os esporozoítos se movimentam na derme até atingir um vaso, e o invadem ativamente, atingindo assim a circulação sanguínea (Amino *et al.*, 2006) com destino ao fígado, onde irão invadir os hepatócitos. Para isso, o parasita atravessa varias barreiras celulares, como o epitélio sinusóide para atingir seu alvo (Mota e Rodriguez, 2004; Sinnis e Coppi, 2007), reconhecendo-o através proteoglicanas presentes em sua membrana (Coppi *et al.*, 2007). Uma vez encontrado o alvo, o esporozoíto o invade e se reproduz assexuadamente, dando origem a formas exoeritrocítica (EEF). Os merozoítos são liberados das EEFs através de um processo complexo. Para que tenham acesso aos eritrócitos, os merozoítos tem que alcançar os sinusóides do fígado passando pelo espaço de Disse, uma camada de matriz extracelular, e pelo endotélio sinusoidal. Além disso, os parasitas tem que evitar a fagocitose pelas células de Kupffer, macrófagos que patrulham os sinusóides do fígado (Terzakis *et al.*, 1976). Para garantir que os merozoítos cheguem à corrente sanguínea, os parasitas modificam o hepatócito, induzindo a apoptose da célula porem inibindo a exposição de fosfatidilserina (Sturm *et al.*, 2006). Assim, o parasita modifica o hepatócito, utilizando-o como uma vesícula que garante a chegada dos merozoítos à corrente sanguínea e evita a fagocitose pelas células de Kupffer, uma vez que a vesícula não apresenta marcadores para o evento (Sturm *et al.*, 2006) (Fig. 3).

Figura 3. Hipótese para liberação dos merozoítos (modificada de Sturm et al.,2006). Em vermelho, eritrócitos; em azul, células de Kupffer; em laranja, células endoteliais.

Esta forma de vida invade os eritrócitos, e dentro deles iniciam a fase intraeritrocítica do seu ciclo de vida. A invasão é um processo complexo, que pode ser dividido em 7 fases: adesão inicial; contato entre o ápice do merozoíto e o eritrócito e a formação da junção apical; geração do vacúolo parasitóforo, que é concomitante com o movimento do parasita para dentro do vacúolo; isolamento do merozoíto dentro do vacúolo; transformação do merozoíto para o estágio de anel (Garcia *et al.*, 2008). O merozoíto entra em contato com o eritrócito a ser invadido, podendo aderir em qualquer ponto da superfície do parasita. Após o contato, o parasita rola sobre a superfície do eritrócito, que envolve o parasita parcialmente. Quando o ápice do merozoíto toca a superfície da célula hospedeira, ocorre uma interação para a formação da junção apical, que tem elementos estruturais presentes tanto no parasita quanto no eritrócito (Aikawa *et al.*, 1978). Uma vez estabelecido o contato, uma ou mais invaginações surgem na membrana do eritrócito, que se estendem profundamente no citossol do mesmo. Uma dessas invaginações cresce em tamanho, para o qual o merozoíto migra antes de ser isolado dentro do eritrócito. Esta cavidade pode ter, em sua composição, componentes secretados pelo parasita durante este

processo (Galiski *et al.*, 2005). Durante a invasão, o eritrócito é altamente modificado, com as roptrias atuando largamente no processo. O material secretado por essas organelas removem várias organelas membranosas e citoesqueleto da cavidade de invasão (Aikawa *et al.*, 1979; Atkinson *et al.*, 1988; Dluzewski *et al.*, 1989), indicando que proteases são secretadas. Mesmo assim, algumas proteínas provenientes do eritrócito entram neste vacúolo inicial, ligadas a formação de balsas lipídicas (Murphy *et al.*, 2004). Material proveniente das roptrias podem constituir parte desta cavidade inicial de invasão (Bannister e Mitchell, 1989).

A junção apical começa a se mover, e agora é denominada junção móvel. Este movimento é produto da interação entre as proteínas motoras actina e miosina, uma vez que inibidores dessas proteínas previnem o movimento do parasita para o vacúolo em formação (Miller *et al.*, 1979; Dluzewski *et al.*, 1989). Varias evidências apontam que a força motriz desse movimento vem do deslizamento de cabeças de miosina localizados no parasita e filamentos de actina ligadas a proteínas acessórias que, por sua vez, se ligam a membrana do eritrócito. Apesar de toda maquinaria desse motor molecular não estar descrita, se conhece vários componentes chaves do mecanismo (Garcia *et al.*, 2008). A junção cresce, acompanhando a circunferência do merozoíto que desliza para dentro da cavidade. O parasita é selado dentro do vacúolo parasitóforo, e o vacúolo então se separa da membrana do eritrócito. Grânulos densos são secretados do merozoíto, e seu conteúdo é liberado dentro do vacúolo, fazendo com que este aumente em tamanho (Bannister *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1990). Após isso, as estruturas da junção apical desaparecem, e o parasita toma a forma de anel.

A fase intraeritrocítica compreende três formas de vida: anel, trofozoíto e esquizonte. A fase de anel é assim denominada por razões morfológicas. Ela é seguida pela fase de trofozoíto, onde o parasita possui intensa atividade metabólica, captando nutrientes e ativando vias biossintéticas. A fase esquizonte segue a de trofozoíto, e é caracterizada por seguidas divisões mitóticas sem que ocorra citocinese. Após a passagem pelas três fases, os eritrócitos se rompem liberando novos merozoítos, que reiniciam o ciclo intra-eritrocítico ou, através de um mecanismo ainda pouco compreendido, ocorrer a diferenciação em gametócitos masculinos ou femininos, que irão dar prosseguimento a fase sexuada do ciclo de vida do parasita, no hospedeiro invertebrado (Bannister *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1978; Bannister e Dluzewski, 1990; Garcia *et al.*, 2001) (Fig. 4)

Figura 4. Ciclo de vida de *Plasmodium* (modificado de Bannister *et al.*, 2003)

História da malária

O primeiro relato da doença na história se encontra no cânon da medicina chinesa de 4700 anos atrás, que se refere a febres repetidas, com aumento esplênico e tendência a episódios epidêmicos (Hoepli, 1959).

Escrituras védicas e brâmanes, datando de 3500 a 2800 e 2800 a 1900 anos atrás, respectivamente, do vale do Rio Indo, no nordeste da Índia, fazem muitas referências à febre (Bruce-Chwatt, 1965). Uma das escrituras faz menção a um demônio da febre, Takman, onde se lê sobre tremores, da periodicidade da febre e do seu retorno no terceiro dia.

Sumérios e egípcios, em textos de 4000 anos atrás, citam condições de esplenomegalia, febres intermitentes e constantes, que configuram sintomas clássicos da doença (Carter e Mendis, 2002).

Dois mil anos após esses relatos, a malária aparece nas escrituras gregas, em torno de 500 a.C. Nos trabalhos atribuídos a Hipócrates (460 a.C. – 377 a.C.), a presença de malária na península grega é claramente descrita nas suas formas terçã benigna, quartã e subterçã maligna.

No começo do século I, a malária já se espalhava pelo mediterrâneo, Centro, Sul e Sudoeste da Ásia, China, Manchúria, Korea e parte do Japão (Carter e Mendis, 2002). Provavelmente, a malária espalhou-se pela Europa na Idade Média. Com as navegações, a doença foi introduzida no Novo Mundo no século XV, onde se estabeleceu no Caribe, América Central e do Sul.

A malária se tornou foco de pesquisa de maneiras distintas. Para franceses e ingleses, a expansão de suas colônias por regiões do globo onde a malária era a mais

debilitante doença tropical fez com que pesquisadores tentassem atacar o problema para erradicar o fator que limitava a exploração de recursos naturais, gerando menores lucros. Na Itália, por sua vez, a malária não era uma doença tropical – ou mesmo colonial – mas sim endêmica no país, tornando-se assim um importante problema de saúde pública que minava o desenvolvimento do sul da península, criando obstáculos a manutenção da unidade nacional, alcançada há apenas uma década (Capanna, 2006).

Em 1880, Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), medico militar trabalhando da Argélia, descreveu parasitas da malária no sangue de pacientes febris, denominando-os *Oscillaria malariae*. Ronald Ross (1857-1932), medico do exercito inglês na Índia, descreveu oocistos nas paredes do estomago de um mosquito ainda não classificado, o qual imaginava pertencer ao gênero *Culex*.

Ettore Marchiafava (1847-1935) e Augusto Celli (1857-1914), trabalhando em Roma, acreditavam que a malária era causada por uma bactéria, *Bacillus malariae*. Porém, após maiores estudos, eles concordam com Laveran reconhecendo a natureza protozoária do parasita, e propõe o nome *Plasmodium* para o parasita identificado por Laveran. A dupla de médicos italianos mais tarde identificou duas espécies do parasita, *P. falciparum* e *P. vivax*.

Camillo Golgi (1843-1926) fez contribuições importantes ao estudo da malária, ao relacionar o sinal clinico da febre com a esquizogonia dos parasitas. Também mostrou que a diferença no período das febres terçã e quartã era devido a diferentes espécies de parasitas, que algumas vezes se apresentavam no mesmo hospedeiro.

Battista Grassi (1854-1925) demonstrou, em 1898, que a doença era transmitida para humanos por mosquitos do gênero *Anopheles*.

Ritmo na infecção

Uma das principais características da infecção malárica é a periodicidade, ponto comum entre as infecções nos diversos hospedeiros. Em 1929, Boyd demonstrou que o ciclo de vida do parasita de galinha, *P. cathemerium*, mudava com direta relação ao regime do ciclo claro/escuro submetido ao hospedeiro. Taliaferro e Taliaferro modificaram o ciclo do parasita de macaco *P. brazilianum*, em 1934, atrasar o período de esquizogonia em 12 horas com modificação de ciclo de luz. Assim, foi demonstrada a importância das fases de claro e escuro no ciclo do parasita, e que esse estímulo deve ser percebido pelo hospedeiro. Esse fato foi relatado por Stauber, em 1939, que demonstra que luz incidente sobre a superfície do corpo do hospedeiro ou diretamente sobre os parasitas não altera a sincronia da infecção (Arnold *et al.*, 1969).

Em 1970, Hawking - estudando pacientes parasitados por *P. vivax* - sugeriu que as febres eram provenientes do súbito acréscimo de merozoítos na circulação sanguínea do hospedeiro, e concluiu que os parasitas se desenvolveriam sincronicamente para produzir este seu aumento populacional.

O ritmo também está presente na parte sexuada do ciclo de vida do *Plasmodium*. Shah observou o evento em 1934, quando encontrou um pico no número de gametócitos do parasita de aves *P. cathemerium*, às 18:00hrs. Resultados similares foram relatados por Gambrell (1937) e Hawking e colaboradores (1968a). Hawking, em 1970, realizou experimentos, utilizando *P. knowlesi*, parasita de macaco, que

sugerem uma relação do ritmo circadiano com a produção de gametócitos, que aumentavam em número no período da noite. Esse fenômeno já foi demonstrado para algumas espécies de *Plasmodium* (Para revisão, ver Gautret e Motard, 1999). A maturação do parasita temporalmente próxima do período de alimentação do inseto vetor é uma importante característica adaptativa. A essa cíclica e precisa temporização do surgimento de gametócitos para coincidir com a alimentação - e logo infecção - do hospedeiro invertebrado foi denominada de “Efeito Hawking” por Garnham e Powers (1974).

A principal característica da infecção malárica é sua periodicidade dos picos de febre, que ocorrem geralmente em um múltiplo de 24 horas. Isso sugere que o processo de ruptura dos eritrócitos e invasão de novas células é um evento altamente sincronizado, sendo que essa periodicidade pode ser entendida como uma estratégia dos parasitas para evadir o sistema imune.

Trager e Jensen, em 1976, relatam que parasitas em cultura perdem a sincronia, sugerindo a participação da fisiologia do hospedeiro na manutenção da ritmicidade da infecção. A maturação dos parasitas, quando analisados individualmente, levava o mesmo tempo do que era observado em sistemas in vivo, o que aponta a existência de um relógio biológico no parasita, que controla seu desenvolvimento na célula hospedeira. Porém a sincronia, entendida aqui por um estado onde a população de parasitas se encontra na mesma fase de desenvolvimento, é perdida. No hospedeiro, quando analisadas as formas de vida presentes no sangue, encontra-se uma forma de vida predominante, seja ela anel, trofozoíto ou esquizonte.

Já em cultura, observa-se parasitas em todas das fases, o que nos leva a acreditar que existe um fator exógeno ao parasita que sincroniza as fases de seu ciclo.

Nosso grupo, em 2000, demonstrou que a melatonina, um hormônio que marca o ritmo circadiano, como os seus precursores, são capazes de sincronizar o ciclo de vida de *P. chabaudi* e *P. falciparum* in vitro, e *P. chabaudi* in vivo (Hotta *et al.*, 2000; Beraldo e Garcia, 2005). Essa evidência mostra a capacidade do parasita de subverter o sistema endócrino do hospedeiro, utilizando-o como sinal para regular a complexa maquinaria celular compreendida na maturação do parasita dentro do eritrócito.

Melatonina

Um relógio biológico é a parte de um sistema de temporização que tem a capacidade de gerar uma oscilação usada pelo animal para medir tempo, mesmo na ausência de pistas ambientais. Os núcleos supra-quiasmáticos (NSQ) têm papel como osciladores circadianos em mamíferos. O NSQ é arrastado pela percepção de luz, o que sincroniza o relógio com a condição ambiental. Estímulos ambientais que arrastam o oscilador recebem o nome de *Zeitgeber*, termo alemão para “doador de tempo”. O estímulo da glândula pineal, através de neurotransmissores provenientes de sinal do NSQ, induz secreção do hormônio melatonina, entre outros eventos, o que dá a esse hormônio importância como um poderoso modulador dos ritmos circadianos, uma vez que tem sua secreção sincronizada com o ciclo claro/escuro. Em todos os mamíferos estudados até hoje, seja ele de atividade noturna ou diurna, a melatonina é sintetizada na fase escura do ciclo claro/escuro e chega rapidamente ao corpo via corrente sanguínea, o que dá ao hormônio importância como um poderoso modulador

dos ritmos circadianos. (Para revisão, ver Simonneaux e Ribelayga, 2003) Ele também é responsável pela modulação de diversos processos fisiológicos, como a dispersão de pigmentos em células pigmentares (Deoliveira *et al.*, 1996) modulação da permeabilidade vascular em respostas inflamatórias (Lopes *et al.*, 1997), ajustes sazonais da função imune (Nelson e Drazen, 1999), modulação do sono e temperatura (Van Someren, 2000). Pode exercer seus efeitos através de um receptor de membrana acoplado a proteína G, ou interferindo diretamente em processos celulares como a ligação Ca^{2+} - calmodulina (Benitez-King *et al.*, 1993), diminuição do stress oxidativo (Tan *et al.*, 2007) e ativação de NF- κ B (Gilad *et al.*, 1998), que tem papel importante na regulação da resposta inflamatória (Karin e Ben-Neriah, 2000; Meffert e Baltimore, 2005). O hormônio participa da função do sistema imunológico, regulando-o, tal quando secretado centralmente qual quando secretado localmente, por células do sistema imune (Markus *et al.*, 2007).

O aminoácido Triptofano é transformado em 5-hidroxi triptofano (5HTP), pela enzima triptofano 5-hidroxilase. Após isso, a 5HTP carboxilase transforma o 5HTP em serotonina. A serotonina é N-acetilada pela N-acetil transferase (NAT) produzindo N-acetil serotonina (NAS). Esse é o principal passo na via de biossíntese da melatonina: a atividade da enzima NAT aumenta de 70 a 100 vezes na fase de escuro, tornando a síntese de melatonina praticamente restrita a esta fase. A hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT) transforma o NAS em melatonina. Quando a quantidade de NAS satura a capacidade da HIOMT de convertê-la em melatonina, a enzima é considerada fator limitante na síntese da melatonina (Arendt, 1995) (Fig. 5).

Figura 5. Síntese da melatonina e concentração de melatonina e seus precursores (modificado de Nussey e Whitehead, 2001).

A ação da melatonina foi relatada para diversos grupos taxonômicos, como vertebrados (Skene *et al.*, 1991), plantas (Dubbels *et al.*, 1995) e protozoários (Hardeland *et al.*, 1995). *Trypanossoma cruzi* sintetiza melatonina e a utiliza como antioxidante, auxiliando assim seu ciclo de vida e processo parasitário (Macias *et al.*, 1999). A alga unicelular *Gonyaulax polyedra* utiliza melatonina como marcador de seu fotoperíodo (Balzer e Hardeland, 1991).

Em *P. chabaudi*, nosso grupo relatou a mobilização de cálcio de estoques intracelulares pela melatonina. O hormônio induz a geração de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) em diferentes modelos biológicos, como células de melanoma (Eison e Mullins, 1993), cérebro de pombo (Mullins e Eison, 1994), cérebro de galinha (Popova e Dubocovich, 1995) e dinoflagelados (Tsim *et al.*, 1997). Também foi demonstrado para *P. falciparum* a presença de uma SERCA sensível a tapsigargina, portanto demonstrando que o retículo endoplasmático é um estoque passível de mobilização (Varotti *et al.*, 2003). Dados do laboratório mostram a presença da mesma via para liberação de cálcio por melatonina no parasita de humanos. O envolvimento do cálcio como segundo mensageiro no processo de maturação do parasita, bem como a importância do cálcio extracelular no desenvolvimento do parasita, vem sendo demonstrado por nosso grupo (Garcia, 1999; Gazarini *et al.*, 2003; Varotti *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a melatonina produz aumento da concentração citoplasmática de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) em *Plasmodium*, em estágio de trofozoíto. Dados relatados pelo nosso grupo sugerem que a ação da melatonina seja efetivada pela via de sinalização que tem como segundo mensageiro o IP_3 , produzido através de ativação de fosfolipase C., que é capaz de mobilizar cálcio em células eucarióticas, incluindo o *Plasmodium* (Passos e Garcia, 1998). O hormônio também induz a um aumento da concentração de AMPc e ativação de PKA. Esses eventos são precedidos do aumento da concentração intracelular de cálcio, uma vez que essa ativação é prevenida pelo uso de BAPTA, um quelante intracelular do íon (Beraldo *et al.*, 2005). As vias de sinalização de cálcio e do AMPc se convergem neste parasita quando analisada a resposta ao hormônio, uma vez

que o AMPc gerado em resposta ao estímulo da melatonina induz o aumento de cálcio intracelular (Beraldo *et al.*, 2005) (Fig. 6).

Figura 6. Vias de transdução de sinal da melatonina no ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium* (modificado de Beraldo *et al.*, 2005). AC, adenilil ciclase; PLC, fosfolipase C; PDE, fosfodiesterase; PKA, proteína quinase A; ER, retículo endoplasmático; R, receptor hipotético de melatonina.

Produtos do catabolismo do triptofano, como a triptamina, serotonina e N-acetilserotonina são capazes de sincronizar o ciclo celular de *P. falciparum*, e produzir aumento de cálcio intracelular. Como observado para a melatonina, seus efeitos são bloqueados pelo uso de luzindol, antagonista competitivo da melatonina, ou por U73122, inibidor da fosfolipase C (Beraldo e Garcia, 2005). Um dos produtos do

metabolismo da melatonina, o N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) é capaz de sincronizar o ciclo de *P. falciparum* e *P. berghei*. O composto também induz aumento da concentração de cálcio intracelular nos parasitas. Foi detectada a produção do metabolito em *P. chabaudi*, quando os eritrócitos infectados foram pré-incubados com melatonina (Budu *et al.*, 2007).

O Cálcio e sua sinalização

O cálcio é o íon mais abundante nos vertebrados (20-30g por Kg de peso corpóreo em humanos) (Binghurst, 1989) sendo que a maior parte deste íon está armazenada nos ossos e dentes na forma de hidroxiapatita $(Ca^{2+})_3(PO)_4$ (Para revisão, ver Pozzan *et al.*, 1994). A modulação da concentração do íon nos fluidos do corpo é dada por estímulos hormonais que alteram a mobilização do cálcio dos ossos, absorção intestinal e excreção do íon pelos rins.

A diferença das concentrações do íon livre existentes no meio extracelular – em torno de mM- e intracelular – em torno de nM- produzem um gradiente eletroquímico, e alterações de permeabilidade de membrana, induzidas por estímulos fisiológicos, podem produzir mudanças na concentração citossólica de cálcio. As alterações podem servir de sinal para vários eventos biológicos em que o cálcio possui participação importante, como diferenciação, divisão celular e organização do citoesqueleto (Berridge e Irvine, 1984; Carafoli, 1987; Berridge e Irvine, 1989; Sambrook, 1990; Berridge, 1993; Putney e Bird, 1993). Além disso, o íon liga-se a proteínas regulatórias, modulando processos metabólicos e muitas atividades celulares (Rasmussen e Barrett, 1984; Kligman e Hilt, 1988). O íon, em altas concentrações

citossólicas, pode prejudicar a função ou mesmo causar morte celular, apesar de ser fundamental na sua sinalização (Garcia, 1999). Para a manutenção da concentração citossólica baixa de cálcio, as células eucarióticas possuem transportadores do íon na membrana plasmática, na membrana do retículo endoplasmático, na mitocôndria e em organelas ácidas. Na membrana plasmática estão presentes uma Ca^{2+} -ATPase específica (PMCA) que exporta o íon para o meio extracelular (Scarpa *et al.*, 1992), diversos tipos de canais de membrana (Berridge *et al.*, 2003) e um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Reuter e Seitz, 1968; Blaustein e Hodgkin, 1969), porém o último não se encontra nos eritrócitos maduros de mamíferos. Na mitocôndria, a captação do íon não depende de hidrólise de ATP (Vasington e Murphy, 1962). O retículo também participa desta manutenção, possuindo uma Ca^{2+} -ATPase (SERCA) em sua membrana, que transporta o íon para o lúmen da organela. Esta enzima é regulada pela calmodulina, que aumenta a afinidade da SERCA pelo íon, assim estimulando sua captação (Carafoli *et al.*, 1996). Esta bomba tem estrutura divergente daquela encontrada na Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (Ebashi, 1958; Hasselbach e Makinose, 1961), porém transportam o cálcio na mesma razão estequiométrica, clivando uma molécula de ATP para cada 2 íons transportados (MacLennan, 1970)(Fig. 6). A mitocôndria, que tem como função primária a produção de ATP por fosforilação oxidativa, também participa da homeostase do íon. Para gerar o ATP, é formado um gradiente eletroquímico pela cadeia de transporte de elétrons, onde os complexos I, III e IV atuam como bombas de H^+ . Esse potencial de membrana é utilizado para modular o transporte do íon pelo transportador uniporte da mitocôndria (Kroner, 1986; Igbavboa e Pfeiffer, 1988). Além desse transportador, o canal de resposta rápida (Sparagna *et al.*, 1994; Sparagna

et al., 1995) e o poro de permeabilidade transitória (Bernardi, 1999) também tem papel importante no transporte e estoque de cálcio na célula. Proteínas ligadoras de cálcio estão presentes no citossol – calbindina, calretinina – e no lúmen pro retículo endoplasmático – calreticulina, calsequestrina, calnexina – para tamponar o íon, auxiliando no processo de homeostase (Berridge *et al.*, 2003). Um grande numero de proteínas com domínios “EF hands”, que ligam cálcio, estão presentes no genoma, mostrando a importância desse segundo mensageiro na biologia do parasita (Aravind *et al.*, 2003).

Figura 6. Modelo dos componentes envolvidos na homeostase de cálcio de células eucarióticas (Modificado de Brini e Carafoli, 2000). Na figura, trocadores, canais e bombas na membrana plasmática (em amarelo), SERCA e canal sensível a IP_3 no retículo endoplasmático (em verde), trocadores na organela ácida (em azul) e transportador uniporte e trocadores na mitocôndria (em vermelho).

Para o íon cumprir seu papel como sinalizador, o aumento de sua concentração no citossol da célula pode ser operado tanto mobilizando-se estoques intracelulares quanto estimulando o influxo do íon do meio extracelular. A mobilização dos estoques intracelulares é mediada por segundos mensageiros, como o IP₃, AMP_c, ADP-ribose cíclica, NAADP e mesmo o íon cálcio. A ligação do íon com proteínas efetadoras de uma resposta ou mesmo reguladoras da função de outras proteínas modulam um grande numero de eventos celulares. Os fenômenos sinalizatórios também ocorrem em microdomínios entre organelas, ou entre organelas e a membrana plasmática. Nesses microdomínios a concentração do íon é maior, possibilitando que os estoques sejam mobilizados sem que ocorra uma grande mudança na concentração citossolica do íon (Rizzuto *et al.*, 1993). Além de uma especialização espacial do sinal, o cálcio pode mediar diversas funções pela diferença temporal de seus estímulos (Berridge *et al.*, 2003).

A presença de cálcio extracelular é indispensável para a invasão do parasita, evento demonstrado por vários grupos (Johnson *et al.*, 1980; Matsumoto *et al.*, 1987; Wasserman, 1990). A retirada do íon do meio de cultura impossibilita que *P. falciparum* complete o seu ciclo de vida em cultura (Wasserman, 1990). O processo de invasão de cálcio-dependente, e a complementação de um meio livre de cálcio por outros cátions, como magnésio, zinco e manganês não reverte este efeito (Mccallum-Deighton e Holder, 1992). O cátion também participa do processo de exflagelação em *P. falciparum* e *P. berghei* (Kawamoto *et al.*, 1990; Kawamoto *et al.*, 1991).

O modo de vida do parasita configura então um obstáculo na sinalização por cálcio, uma vez que este infecta o eritrócito, uma célula, que possui uma concentração

de cálcio citoplasmática baixa. O parasita, para assegurar um ambiente externo rico em cálcio, inverte uma Ca^{2+} -ATPase da membrana do eritrócito no momento da invasão e conseqüente formação do vacúolo parasitoforo. Assim, a bomba passa a bombear cálcio para a luz do vacúolo, gerando uma região com concentração do cátion na faixa micromolar, suficiente para seu desenvolvimento (Gazarini *et al.*, 2003) (Fig. 7)

Figura 7. Concentrações de cálcio nas diferentes regiões da célula infectada. Pode se notar a inversão da bomba Ca^{2+} -ATPase no vacúolo parasitoforo. (Gazarini *et al.*, 2003). RBC – eritrócito, PVM – membrana do vacúolo parasitoforo.

Apesar de trocadores $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ e homólogos de receptores de IP_3 não terem sido encontrados em *Plasmodium* (Nagamune e Sibley, 2006), o parasita possui descritas Ca^{2+} - ATPases (Murakami *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 1993; Trottein e Cowman, 1995), calmodulina (Robson e Jennings, 1991), reticulocalbindina (La Greca *et al.*, 1997), calcineurina (Dobson *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2005) e diversas quinases dependentes de cálcio (Zhao *et al.*, 1993; Zhao, Franklin *et al.*, 1994; Zhao, Pokutta *et al.*, 1994).

Evidências para a existência de pelo menos 2 estoques intracelulares de cálcio no parasita são abundantes (Garcia *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1998; Passos e Garcia, 1998; Garcia, 1999; Alleva e Kirk, 2001; Biagini *et al.*, 2003; Varotti *et al.*, 2003; Gazarini e Garcia, 2004). São elas o retículo endoplasmático, estoque típico de células eucariontes, e o vacúolo ácido, típico desses protozoários. Os dois estoques são sensíveis a mobilização pelo segundo mensageiro IP_3 (Passos e Garcia, 1998). A liberação de cálcio de estoques ácidos pelo IP_3 já foi reportada para células de mamíferos (Gerasimenko *et al.*, 1996).

O envolvimento do cálcio como segundo mensageiro no processo de maturação do parasita, bem como a importância do cálcio extracelular no desenvolvimento do parasita, vem sendo demonstrado por nosso grupo (Garcia, 1999; Gazarini *et al.*, 2003; Varotti *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a melatonina produz aumento da concentração citoplasmática de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em *Plasmodium*, em estágio de trofozoíto. Nosso laboratório relatou que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ é bloqueada utilizando-se luzindol, um antagonista competitivo do receptor de melatonina. O U73122, inibidor de fosfolipase C, também inibe a ação da melatonina. Uma adição de

tapsigargina, inibidor da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático, mostrou que o retículo endoplasmático era passível de ser mobilizado após a adição de luzindol e U73122 (Hotta *et al.*, 2000). Com esses dados, o laboratório mostrou fortes evidências que o mecanismo de sinalização utilizado pela melatonina seja o do IP_3 , via clássica e importante segundo mensageiro para a mobilização de cálcio em células eucarióticas, incluindo o *Plasmodium* (Passos e Garcia, 1998). Quando utilizado 2-APB, bloqueador de receptor de IP_3 , a resposta a melatonina é inibida em *P. falciparum*, mostrando a importância dessa via de transdução de sinal para o parasita (Beraldo *et al.*, 2007).

Drogas antimaláricas e sua resistência

Em 1934, Hans Andersag, químico alemão que trabalhava para os laboratórios Bayer, sintetizou o composto Resochin (cloroquina), seguido do Sontoquin ou Sontoquine (3-metilcloroquina), pertencente a classe das 4-aminoquinolinas. O esforço para encontrar uma alternativa ao quinino era resultante da invasão alemã no leste da África, onde suas tropas sofriam grandes baixas acometidas de malária. O quinino havia caído em mãos japonesas, com a tomada da ilha de Java. Porém, superestimando as reações adversas da nova droga, não houveram esforços para sua exploração, passando assim a fórmula para sua empresa-irmã nos E. U. A., no final da década de 30. A fórmula ficou esquecida até a explosão da Segunda Grande Guerra.

Com a invasão alemã da Holanda, e a ilha de Java em mãos japonesas, as forças aliadas estavam sem acesso ao quinino. Este fato deflagrou esforços britânicos e estadunidenses para a procura de novos antimaláricos. Após a ocupação aliada da África, tropas francesas tomaram um carregamento de Sontochine alemão, e

enviaram-no para o mesmo laboratório que havia recebido os compostos na década de 30. Os estadunidenses fizeram algumas modificações na formulação do composto, nomeando-o de cloroquina. Após algum tempo, foi descoberto que essa nova formulação feita em solo estadunidense era idêntica ao Resochin alemão. A droga somente ficou disponível às tropas no final da guerra. Após o conflito, a cloroquina e o DDT, um inseticida, se tornaram as duas principais armas para o controle da doença no mundo. Cerca de dez anos depois, isolados resistentes à cloroquina apareciam na Colômbia e na fronteira entre o Camboja e a Tailândia. Destes locais, a resistência se espalhou para a América do Sul e Sudeste da Ásia. No final da década de 1970, a resistência à cloroquina havia chegado no continente africano, e vêm se espalhando para a região subsaariana desde então.

Não se conhece ao certo o modo de ação da cloroquina. Acredita-se que, por ser uma base fraca, a cloroquina é acumulada no vacúolo digestivo, que possui pH mais ácido do que o citossol. No compartimento, a cloroquina é protonada, e não consegue mais atravessar as membranas biológicas, sendo seqüestrado para dentro do vacúolo (Fig. 8). Acredita-se que a cloroquina previna a polimerização da hemozoína, o pigmento malárico. A formação de hemozoína é uma estratégia para lidar com o grupo heme – tóxico no estado monomérico – formado com a digestão da hemoglobina. Quando polimerizado, os grupos heme são inertes. A cloroquina se liga a ferro-protoporfirina IX, um subproduto da digestão da hemoglobina. Esta molécula possui alta afinidade por proteínas de membrana, e quando livre aumenta a permeabilidade das membranas, causando lise celular. A ferro-protoporfirina também pode inibir a atividade de enzimas do parasita, causando interrupção de seu desenvolvimento

(Ginsburg, 1999). Para evitar esses efeitos prejudiciais, o parasita polimeriza o composto, gerando a hemozoina.

Através do estudo da captação de cloroquina marcada radioativamente, foi demonstrado que cepas resistentes a cloroquina possuem um mecanismo de efluxo da droga na membrana plasmática, que necessita de energia para funcionar, e pode ser inibido com verapamil, um inibidor do canal de Ca^{2+} , e W7, um inibidor da Ca^{2+} - calmodulina (Sanchez *et al.*, 2004). Estes dados, juntamente com o fato de que a cloroquina é capaz de mobilizar cálcio de estoques intracelulares (Passos e Garcia, 1998; Gazarini *et al.*, 2007) indicam que a resistência do parasita à droga é dependente de interações com o íon.

Figura 8. Modelo do eritrócito infectado, indicando o mecanismo de entrada de cloroquina para atingir o vacúolo digestivo. Hb, hemoglobina; Hz, hemozoina; [CQ], concentração de cloroquina. (Modificado de Ridley, 1998).

Biologia molecular e transfecção em Plasmodium

Com os esforços para se sequenciar os genomas de *Plasmodium*, foi observado o parasita possui em torno de 5000 proteínas preditas, e mais da metade delas não podem ter função hipotetizada por meio de homologia com as proteínas de função conhecida. (Carlton *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 2002; Hall e Carlton, 2005). O uso da bioinformática e de técnicas de genética reversa vêm sendo utilizadas para elucidar o função das proteínas e sua regulação em um grande numero de organismos.

A técnica da transfecção consiste em introduzir, na célula alvo, ácidos nucléicos de origem exógena, que tem a capacidade recrutam a maquinaria celular da célula. Assim pode ser estudado com os genes são regulados, identificando regiões envolvidas no controle da transcrição e tradução, ou mesmo a função da proteína gerada por aquele gene. Esta técnica pode ser dividida em duas categorias: transfecção transiente e estável. A transfecção transiente usualmente é composta de um plasmídeo com um gene reportador, que é controlado pela região regulatória de interesse. Assim, modificações nessas regiões podem gerar informações seu funcionamento. A transfecção estável faz uso de um plasmídeo com um gene que confere resistência a uma droga de seleção, que é usada para selecionar as células que receberam o plasmídeo. Esse marcador, juntamente com outros elementos, como sequências para integração e cassetes de expressão permitem a criação e complementação de mutantes, e também a super-expressão ou nocaute de proteínas. Por isso, este tipo de transfecção é mais comumente utilizado para estudar a função de proteínas, uma vez que pode analisar o fenótipo das células transfectadas, e assim inferir a função do gene que foi modificado.

O estabelecimento de uma metodologia de transfecção em *Plasmodium* encontrou alguns obstáculos. O genoma rico em A-T e a instabilidade do DNA do parasita em *Escherichia coli* se apresentaram como grandes dificuldades na construção dos plasmídeos. Em 1993, o primeiro sucesso com transfecção do parasita foi obtido por Wirth e colaboradores, quando se conseguiu a expressão transiente de genes em *P. gallinaceum* (Goonewardene *et al.*, 1993). No trabalho, gametas e zigotos de *P. gallinaceum* foram eletroporados com um plasmídeo que continha o gene para luciferase. Em 1995, obteve-se a transfecção transiente em *P. falciparum* (Wu *et al.*, 1995) pela eletroporação de anéis com plasmídeo contendo gene reportador cloranfenicol acetiltransferase. A transfecção estável foi obtida, em 1996, por meio de um vetor contendo um gene que confere resistência a droga pirimetamina, em *P. berghei* (Van Dijk *et al.*, 1996). A transfecção estável em *P. falciparum* foi obtida utilizando-se um sistema similar de seleção (Crabb e Cowman, 1996; Wu *et al.*, 1996).

A integração dos plasmídeos no genoma do parasita é feita por recombinação homóloga, sendo ela simples ou dupla. Isso possibilita a geração da linhagem nocaute seja gerada pela inserção de um cassete de seleção diretamente no gene, e consequentemente truncando sua expressão, ou pela completa reposição do gene-alvo pelo cassete de seleção. Para truncar o gene-alvo, é necessário apenas um evento de recombinação, enquanto que para a substituição completa do gene, são necessárias dois eventos recombinatórios. (Fig. 9). Para que a recombinação aconteça, são necessários tão pouco quanto 300 pares de bases homólogos entre as seqüências (Nunes *et al.*, 1999). Recombinação não-homóloga já foi reportada (Crabb e Cowman,

1996), porem acredita-se ser um evento raro, uma vez que não foi observado novamente.

A Construção para inserção

B Construção para substituição

Figura 9. Plasmídeos para transfecção em *Plasmodium*. A. Construções para inserção possuem um cassete de seleção (seta preta) e sequencias para a recombinação (região hachurada). Nessa construção, um segmento interno do gene (b e c) é utilizado para realizar a recombinação. Para o uso em *P. berghei*, o plasmídeo é linearizado no sitio indicado pela seta Pb. Para a tranfecção em *P. falciparum*, utiliza-se o vetor circular. A integração ocorre por evento de recombinação simples, resultando na inserção do plasmídeo (linha fina) em sua totalidade. B. Construções para substituição consistem em duas sequencias para recombinação (região hachurada), separadas por um cassete de seleção (seta preta). A integração se dá por recombinação dupla, levando a substituição do gene selvagem. A integração pode se dar por recombinação simples, na parte proximal (I) ou distal (II) da sequencia de recombinação. Neste caso, é gerado uma copia truncada e outra copia completa do gene alvo, sendo a ultima nao mais sob efeito regulatório de suas regiões promotoras nativas. (Modificado de De Koning-Ward *et al.*., 2000).

Os estudos com sistemas de transfecção são de extrema importância, pois constituem um meio de estudar a resistência a drogas, citoaderência, variação antigênica, entre outras características do parasita, na infecção humana. Em outros modelos, a metodologia permite o melhor entendimento *in vivo* das relações entre parasita e hospedeiro, além de propiciar o estudo de vários aspectos dessa interação celular, como o controle do ciclo celular do parasita, e como ele controla a sincronia de sua população (De Koning-Ward *et al.*, 2000).

Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi investigar: i) a homeostase de cálcio em *P. berghei*; ii) a capacidade de sincronização do hormônio melatonina no ciclo de vida de *P. berghei*, e como esse sinal é transduzido; iii) o papel do ritmo da infecção na sua resposta a droga antimalárica clássica cloroquina, através de ensaios *in vivo*. Em adição, a tese teve como objetivo a obtenção de constructos para noucauteamento de genes possivelmente envolvidos em transdução de sinal em *Plasmodium*.

Material e Métodos

Manutenção dos parasitas

O *Plasmodium berghei* e *P. chabaudi* foram mantidos em camundongos (Balb/C e C3H) por transferência de infecção. A parasitemia foi acompanhada por meio de lâminas coradas com Giemsa.

Plasmodium falciparum foi mantido em cultura como descrito por Trager e Jensen, 1976.

Isolamento dos eritrócitos infectados

O sangue foi coletado dos camundongos na presença de ACD (60 mM citrato de sódio, 30 mM ácido cítrico, 166 mM D-Glicose P.A.), através da ruptura da artéria carótida. A separação do plasma foi obtida através de duas centrifugações de 450g por 10 min utilizando-se tampão fosfato-salino (PBS, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,4 mM NaH_2PO_4 , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl). A separação de leucócitos foi realizada através de uma coluna de celulose (Whatman CF11). Os eritrócitos isolados foram mantidos em PBS.

Isolamento dos parasitas

Eritrócitos infectados por *Plasmodium* foram tratados com saponina (10 mg/ml) em PBS, na presença de inibidores de proteases (20 $\mu\text{g/ml}$ antipaina, 20 $\mu\text{g/ml}$ quimostatina, 20 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 20 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina A, 0,5 nM benzamidina), para romper as membranas dos eritrócitos. A seguir, os parasitas foram separados através de centrifugação a 5500g por 10 min a 4 °C, e lavados duas vezes em PBS.

Marcação dos parasitas com Fluo-3 AM

Os parasitas isolados (10^6 células/ml) foram ressuspensos em tampão A (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO_4 , 5,5 mM D-Glicose e 50 mM MOPS, 1mM CaCl_2 pH 7.2) onde foi adicionado 6 μM de fluo-3 AM, previamente diluído em dimetilsulfóxido anidro, inibidores de proteases e 28 μM de probenecid (Sigma, EUA). Esta última é uma droga inibidora do transporte do fluo-3 para o meio extracelular por meio de um ânion orgânico (Di Virgilio *et al.*, 1988; Di Virgilio *et al.*, 1989; 1990). Os eritrócitos foram incubados por 1 hora a temperatura de 37°C. Ao término da incubação, o indicador fluorescente extracelular foi removido através de 3 lavagens com tampão A.

Medidas de cálcio intracelular

As medidas do cálcio intracelular foram realizadas em espectrofluorímetro Shimdzu modelo RF-5301PC (Kioto, Japão) com comprimento de onda de excitação 505 nm e de emissão a 530 nm. As curvas de calibração referentes à concentração de Ca^{2+} livre, quando utilizado como indicador o Fluo-3 AM, serão obtidas através do programa Super Ion Probe – Versão 1.00 – Copyright © Shimadzu Corporation, 1996. O cálculo das concentrações é feito pelo programa acoplado ao equipamento e realizam o cálculo automaticamente, a partir da seguinte fórmula:

$$[Ca^{2+}] = K_d (F - F_{min}) / (F_{max} - F) \quad ,$$

onde: K_d (constante de dissociação do Fluo-3 AM) tem o valor de 390 nM a 37°C, F é a fluorescência obtida, F_{min} equivale à fluorescência mínima obtida com a adição de 10mM de EGTA e F_{max} é a fluorescência máxima obtida através da adição de 5mM de digitonina e 1mM de cálcio (Fig. 10).

Figura 10. Curva de calibração para utilização da fórmula para obtenção da concentração de Ca^{2+} , quando utilizado o marcador fluorescente Fluo-3 AM.

Experimentos in vitro

Os parasitas serão mantidos em cultura em meio RPMI 1640, 25mM HEPES suplementado com soro fetal bovino. Lâminas coradas com Giemsa serão utilizadas para análise dos resultados, com contagem de 1000 células por lâmina. Os dados foram analisados através de teste de variância One-Way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls.

Experimentos in vivo com luzindol e cloroquina

Camundongos foram infectados com 10^7 células de *P. chabaudi*, às 18:00hrs. Simultaneamente foi iniciada a injeção de cloroquina, uma vez ao dia, às 12h00 e/ou luzindol, às 18h00. O sangue será retirado diariamente às 12h00 para avaliação de parasitemia e formas de vida. A contagem de camundongos sobreviventes será feita de 12 em 12 horas, às 06:00hrs e 18:00hrs. O experimento seguiu por 10 dias ou até a morte de todos os camundongos. Lâminas coradas com Giemsa foram utilizadas para análise dos resultados, com contagem de 1000 células por lâmina. Os resultados foram analisados através de teste de variância One-Way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls.

Experimentos in vivo com ratos e P. berghei

Ratos Wistar com peso corporal de aproximadamente 300g foram infectados com 10^7 eritrócitos infectados por *P. berghei* NK65. Os animais foram mantidos com alimentação e água *ad libitum*, em regime de fotoperíodo de 12 hrs claro / 12 hrs escuro. Uma hora antes do início da fase de escuro, amostras de sangue foram coletadas da cauda para confecção de esfregaços, para análise de parasitemia e distribuição de fases de desenvolvimento, contando não menos do que 1000 células por lâmina.

Extração de DNA genômico

Os parasitas isolados foram ressuspensos em tampão de lise (25 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml proteinase K, 10 mM Tris-HCl pH 7,6), incubados por 14 horas a 37°C sob agitação 250 rpm. Após a incubação, foi acrescentado 1 volume de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico, e a solução foi centrifugada por 10 min a 3000 rpm a 4°C. A fase aquosa proveniente da centrifugação foi coletada e a ela foi adicionada 0,1 volume de 3M acetato de sódio pH 7,0 e 2 volumes de etanol 100%. Após nova centrifugação a 300 rpm por 2 minutos a 4°C, o pellet formado foi lavado com etanol 70%, e depois ressuspensionado em 10 mM Tris-HCl pH 7,0, e incubado a 65°C por 10 minutos. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Genequant (Amersham Biosciences).

Primers para amplificação das UTRs através de PCR

Foram desenhados primers para amplificar as regiões não transcritas que flanqueiam os genes que serão alvos das construções para knockout em *P. berghei* e *P. falciparum*. Os primers desenhados foram adicionados dos sítios de restrição para realizar a clonagem. As reações foram realizadas com enzima AmpliTaq® Gold (Applied Biosystems).

Tabela 1. Primers para amplificação das UTRs dos genes de interesse. Em itálico, sítios de restrição das enzimas utilizadas; grifados, códons de parada.

PF14_0649 5' UTR fw	<i>CCGCGG</i> AAAAGGAAGAAAAGACGAACG
PF14_0649 5' UTR rv	<i>ACTAGTCTCTTTTATCTTCTGATGGATGC</i>
PF14_0649 3' UTR fw	<i>ATCGATTTTTATTTCCATTGACTTATTCCTC</i>
PF14_0649 3' UTR rv	<i>CCATGGTTGTCCATTTCCCCTATAAATAAAAC</i>
PF14_0189 5' UTR fw	<i>CCGCGGAGGACGAAAGGATAATCAACG</i>
PF14_0189 5' UTR rv	<i>ACTAGTTGTTAACAGTTAGCCAAAATATACACG</i>
PF14_0189 3' UTR fw	<i>ATCGATTTTTTCAATAAAACTCAGAACAAAA</i>
PF14_0189 3' UTR rv	<i>CCATGGCTTCCCCTTTTTGAATCACC</i>
PbSR10 5' UTR fw	<i>ATCGATAATACACGCGCATTATTGG</i>
PbSR10 5' UTR rv	<i>AAGCTTTGGAAGAATAAGCAGGGAAGG</i>
PbSR10 3' UTR fw	<i>GGATCCTTTTTGTGTATACTTTCTAAGCGGATA</i>
PbSR10 3' UTR rv	<i>TCTAGAAAGAAAACGATGAAATATGCTGAA</i>
PbSR25 5' UTR fw	<i>ATCGATAAGGTTTTAAATTTCCATAAAAAACAAG</i>
PbSR25 5' UTR rv	<i>AAGCTTAAACCAATTACTTCACTTCAAATTATC</i>
PbSR25 3' UTR fw	<i>GGATCCTTTTTGTGTGAAATTGTGATAAAAAAGAG</i>
PbSR25 3' UTR rv	<i>TCTAGACATCTACACACATGCCTATAATTGC</i>
PF14_0649 RS fw	AATAGATCTCGTGCATCTGGCACCT <u><i>AGAAT</i></u>
PF14_0649 RS rv	ACCCTCGAGCATACACGTT <u><i>AA</i></u> TCGGGAGTTGTG
PF14_0189 RS fw	GTGAGATCTAAAAAGTTCGAAAAAGAAGAAGCG <u><i>TAA</i></u>
PF14_0189 RS rv	ATTCTCGAGTTTTCCATTTGGTAATAAAAAACG <u><i>TTA</i></u>

Clonagem das UTRs em pGEM®- T Easy

Os fragmentos de interesse foram amplificados com as condições ótimas de PCR encontradas, e depois clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega), seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. A ligação foi eletroporada em bactérias *E. coli* DH10-B eletrocompetentes, e plaqueados em meio LB Agar, suplementado de Ampicilina 0,1 mg/ml.

Mini-preps dos plasmídeos

As colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB suplementado com 0,1 mg/ml de ampicilina, e incubados “overnight” a 37°C sob agitação de 250 rpm. A obtenção dos plasmídeos foi feita através de mini-prep por lise alcalina. As bactérias foram precipitadas sob centrifugação e ressuspensas em 300 µL de solução P1 (50 mM Tris, 100 mM EDTA, 50 µg/ml RNase A, pH 7,5), e foi adicionado 300 µL de solução P2 (200 mM NaOH, 1% SDS). Após 5 minutos de incubação, foi adicionado 300 µL de solução P3 (3,1 M Acetato de Potássio pH 5,5), e seguiu-se incubação de 5 minutos no gelo. Após centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde foi adicionado 600 µL de clorofórmio / álcool isoamílico 24:1. Os tubos foram agitados em vortex e centrifugados por 1 minuto. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, onde 600 µL de isopropanol foram adicionados para precipitar o DNA de plasmídeo. Após centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente por 5 minutos sob 14000 rpm. O etanol foi retirado, e o precipitado foi deixado para secar. Após secagem, o precipitado foi ressuspensado em água ultrapura, e estocado a -20°C.

Digestão de mini-preps

As mini-preps foram digeridas com enzimas da New England Biolabs, sendo utilizados os tampões fornecidos pelos fabricantes.

Ligação dos insertos

Os insertos foram ligados no vetor de knockout com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), utilizando-se protocolo e reagentes fornecidos pelo fabricante.

*Tranfecção dos vetores em *P. falciparum**

Os vetores finalizados foram ressuspensos em CytoMix (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl_2 , 2 mM EGTA, 5 mM MgCl_2 , 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 25 mM HEPES, pH 7,6). 100 μg de vetor foram eletroporados em 100 μL de eritrócitos infectados, na fase anel, com parasitemia em 5%, com os seguintes parâmetros: 0,31 kV, 950 μF , capacitância máxima. Após 3 dias, tratamento com 2,5 nM da droga de seleção positiva WR99210 foi iniciado. Na primeira semana, a cultura tem seu meio trocado duas vezes ao dia, sempre suplementando o meio com a droga. Após esse período, troca-se o meio de cultura em dias alternados, até o aparecimento de parasitas.

Ensaio de incubação com macrófagos

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) usadas nos ensaios de proliferação celular foram separadas por gradiente de densidade de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) por centrifugação. O sangue, retirado com anticoagulante ACD (60 mM citrato de sódio, 30 mM ácido cítrico, 166 mM D-Glicose P.A.), foi diluído

na proporção 1:2 em PBS (4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM NaH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4) e adicionado lentamente sobre a solução de Ficoll-Paque na proporção de 1:2,5. Os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 20 min. em temperatura ambiente. O anel de células mononucleares, formado na interface entre o plasma e o Ficoll-Paque, foi removido com uma pipeta Pasteur e transferido para tubos de plásticos de 15 ml. As células foram lavadas 3 vezes em PBS, por centrifugação a 2.000 rpm por 5 min. e, ao final, ressuspensas em 1 ml de meio RPMI completo. A viabilidade das células foi avaliada pela exclusão do corante azul de Trypan (Invitrogen) na diluição 1:1. As células foram incubadas em garrafas de cultura de 72 cm² em ambiente de 5% CO₂ a 37°C, com meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas, as células aderentes (monócitos/macrófagos) foram retiradas das garrafas de cultura utilizando tripsina, contadas em hemocitómetro. Essas células foram adicionadas na cultura de *P. falciparum*, na proporção 1 macrófago para cada 10 parasitas, e foi adicionado 2 µg LPS, para ativação dos macrófagos. Após 24 horas, laminae foram confeccionadas e coradas com Giemsa, para aferir parasitemia. Para a sincronização da cultura, foi utilizado o método do sorbitol (Lambros e Vanderberg, 1979).

Resultados e Discussão

Efeito da melatonina em P. berghei

Com o objetivo de investigar se *P. berghei*, parasita que tem uma infecção *in vivo* assincrônica, percebe a presença do hormônio melatonina, analisamos a resposta de cálcio intracelular, bem caracterizada em outras espécies do parasita (Hotta *et al.*, 2000; Hotta *et al.*, 2003; Gazarini e Garcia, 2004; Beraldo *et al.*, 2005). Experimentos utilizando parasitas *P. berghei* isolados, marcados com o indicador de cálcio fluorescente Fluo-3 AM, ressuspensos em Tampão A (1mM Ca^{2+}) foram realizados para obter-se a medida da concentração de cálcio citossólica basal. A concentração de Ca^{2+} livre medida foi 499 ± 34.109 nM (n=19).

Células eucarióticas possuem uma complexa maquinaria para regular sua concentração intracelular de cálcio, segundo mensageiro ubíquo. Foi estudado o envolvimento de estoques intracelulares do íon em sua homeostase. A participação do retículo endoplasmático foi investigada utilizando-se a taspigargina, um inibidor específico de Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA) (Thastrup, 1990; Lytton *et al.*, 1991). Esta droga liga-se irreversivelmente no estado conformacional E2 da SERCA, mesmo estado em que o íon se liga (Wictome *et al.*, 1992). Foi observado um aumento sustentado da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de $205 \pm 32,856$ nM (n=11) em parasitas isolados marcados com Fluo-3 AM ressuspensos em Tampão A, quando adicionamos 5 μ M de taspigargina (Fig. 11).

Figura 11. Adição de 5 μM de Tapsigargina (THG) a *P. berghei* marcados com o indicador fluorescente de cálcio Fluo-3 AM, em meio com 1mM Ca^{2+} .

Para caracterizarmos se o cálcio responsável pelo aumento observado era proveniente do estoque intracelular, sem contribuição do cálcio presente no meio externo, retiramos o íon do tampão de ensaio. Quando utilizamos Tampão A sem CaCl_2 e suplementado com 4mM de EGTA (Etileno Glicol-bis β -aminoetil Éter), observamos que a adição de 5 μM de tapsigargina promove aumento da fluorescência em parasitas *P. berghei* (Fig. 12), demonstrando que o aumento de fluorescência provem da mobilização de estoques intracelulares.

Figura 12. Adição de 5 μ M de tapsigargina (THG) a *P. berghei* marcados com o indicador fluorescente de cálcio Fluo-3 AM em meio sem cálcio e suplementado com 4mM EGTA.

Estes dados mostram a importância do retículo endoplasmático na homeostase do íon, uma vez que este é um estoque passível de ser mobilizado. Vias de sinalização clássicas tem no retículo um alvo para gerar um sinal que dá continuidade à cascata de sinalização. Entre eles está o IP_3 , que é resultado da clivagem de fosfaditilinositóis de membrana, após ativação da fosfolipase C. Já foi reportado, pelo nosso grupo, que esse segundo mensageiro é capaz de mobilizar cálcio do retículo endoplasmático de *P. chabaudi* (Passos e Garcia, 1998). O efeito da tapsigargina também aponta a presença de uma SERCA nesses parasitas, responsável pelo bombeamento de cálcio para dentro do lúmen da organela. Esta enzima é alvo da

droga antimalárica artemisinina em *P. falciparum* (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003) e a cloroquina é capaz de mobilizar o íon do retículo endoplasmático do parasita de roedor *P. chabaudi* (Passos e Garcia, 1998).

Também foi investigada a participação de organelas ácidas na homeostase de cálcio nos parasitas. Para elucidar a participação deste estoque, foi utilizada uma droga que desfaz o gradiente de prótons, necessário para o armazenamento do íon nas organelas ácidas, a monensina, um ionóforo Na^+/H^+ . A adição de 25 μM de monensina em parasitas isolados e marcados com Fluo-3- AM, ressuspensos em Tampão A, com 1 mM de Ca^{2+} , provoca um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de $265 \pm 30,96$ nM (n=11) (Fig. 13).

Figura 12. Adição de 25 μM de monensina (MON) a *P. berghei* marcados com o indicador fluorescente de cálcio Fluo-3 AM, em meio com 1mM Ca^{2+} .

Em meio desprovido de cálcio, utilizando-se Tampão A sem CaCl_2 , suplementado com 4mM EGTA, a adição da droga ainda promove o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 14), mostrando que o aumento da fluorescência é resultado da mobilização do estoque intracelular. A presença de estoques intracelulares de cálcio nesta espécie de parasita já fora relatada por Marchesini e colaboradores, em 2000 (Marchesini *et al.*, 2000).

Figura 14. Adição de 5 μM de monensina (MON) a *P. berghei* marcados com o indicador fluorescente de cálcio Fluo-3 AM, em meio sem cálcio e suplementado com 4mM EGTA.

Uma vez caracterizada a presença de maquinaria de homeostase de cálcio em *P. berghei*, a ação da melatonina como agonista foi investigada em parasitas isolados. A adição de 20 μM de melatonina a parasitas isolados e marcados com Fluo-3 AM,

ressuspensos em Tampão A com 1 mM Ca^{2+} não promoveu aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Uma adição posterior de tapsigargina mostrou que os estoques intracelulares eram passíveis de mobilização (Fig. 15).

Figura 15. Adição de 20 μM de melatonina (MEL) seguida da adição de 5 μM de tapsigargina (THG) a *P. berghei* marcados com o indicador fluorescente de cálcio Fluo-3 AM, em meio com 1mM Ca^{2+} .

O hormônio não possui ação em células em meio desprovido de cálcio, como mostrou o experimento realizado com parasitas isolados ressuspensos em Tampão A privado de CaCl_2 , suplementado com 4 mM de EGTA (Fig. 16).

Figura 16. Adição de 20 μ M de moensina (MEL) a *P. berghei* marcados com o indicador fluorescente de cálcio Fluo-3 AM, em meio sem cálcio e suplementado com 4mM EGTA.

A ausência de resposta de aumento da concentração de cálcio intracelular livre ao estímulo do hormônio melatonina é extremamente interessante, se lembrarmos que esse parasita não apresenta sincronia em sua infecção. Como previamente demonstrado para parasitas que possuem uma infecção *in vivo* sincronizada, a melatonina promove aumento da concentração citossólica de cálcio, independente da presença do íon no meio externo (Hotta *et al.*, 2000). Assim, esse conjunto de evidências nos leva a cogitar se esta ausência de resposta ao hormônio pode estar envolvida com a característica não sincrônica da infecção por *P. berghei*.

Para avaliar se o hormônio poderia modular o ciclo celular de *P. berghei* independente da ausência de sinalização pelo cálcio, realizamos experimentos *in vitro*, adicionando melatonina em concentrações variando de 1nM a 1μM. Parasitas cultivados em meio RPMI 1640, suplementado com 50% Calf Serum, com hematocrito 5% não são sincronizados por melatonina, nas concentrações 1 nM, 10 nM, 100 nM, e 1μM. Os resultados apresentados representam 3 experimentos independentes (Fig. 17).

Figura 17. Distribuição de fases de *P. berghei*, quando cultivados em presença do hormônio melatonina nas concentrações 1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μM. R, Anel; T, Trofozoíto e S, esquizonte.

Os dados referentes a parasitemia dos grupos experimentais também não sofreram alteração pela adição do hormônio ao meio de cultura, nas concentrações 1 nM, 10 nM, 100 nM e 1 μ M (Fig. 18).

Figura 18. Parasitemia dos grupos experimentais, após incubação com o hormônio melatonina nas concentrações 1nM, 10 nM, 100nM e 1 μ M.

O hormônio melatonina não é capaz de elicitar resposta de cálcio intracelular ou mesmo modular o ciclo celular de *P. berghei*. Esta evidência, quando analisada em conjunto com os dados previamente reportados por nosso grupo, sugere que o hormônio melatonina atua como protagonista na sincronização do ciclo celular destes parasitas, uma vez que modula o ciclo celular e vias de transdução de sinal em parasitas que possuem infecção sincronizada no hospedeiro vertebrado, como *P. chabaudi* (Hotta *et al.*, 2000; Hotta *et al.*, 2003; Beraldo *et al.*, 2005). Apesar dos dados obtidos mostrarem que *P. berghei* não é sensível ao hormônio, traços de uma sinalização envolvendo moléculas derivadas de indol estão presentes no

desenvolvimento sexual deste parasita. O ácido xanturênico, molécula presente no trato digestório do parasita e proveniente do metabolismo do triptofano, induz diferenciação de gametas, através de uma sinalização dependente de cálcio e de proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} . O mesmo indol não induz aumento do íon em formas intraeritrocíticas (Billker *et al.*, 1998; Billker *et al.*, 2004).

Após encontrarmos evidências de que *P. berghei*, é insensível a melatonina quando administrada *in vitro*, utilizamos o rato, um animal onde a secreção de melatonina é ainda mais significativa da que observada no camundongo. Mesmo neste modelo *in vivo*, a infecção mediada por *P. berghei* não apresenta sincronia das formas do parasita (Fig. 19). Esquizontes dificilmente são observados, devido à sequestroamento na microcirculação (Desowitz e Barnwell, 1976).

Figura 19. Distribuição das fases no quinto dia de infecção. A, anel; T, trofozoíto e E, esquizonte. Não existe diferença significativa entre as fases. Esquizontes não estão presentes na corrente sanguínea devido a sequestroamento microvascular.

O conjunto de dados – a ausência da resposta de melatonina em *P. berghei* e o papel do hormônio em sincronizar a infecção de *P. chabaudi*, juntamente com as evidências de que essa infecção é dessincronizada quando utilizados camundongos pinealectomizados, i.e. sem produção de melatonina circadiana – fortalece a hipótese de que a melatonina é responsável pela sincronia do parasita *in vivo*, e que a infecção de *P. berghei* não apresenta sincronia devido, entre outros fatores, a sua incompetência em perceber este sinal.

Influencia do ritmo na resposta ao antimalárico cloroquina

Uma vez que a sincronia pode caracterizar estratégia de evadir o sistema imune e aumentar a probabilidade de sucesso da infecção, avaliamos o papel da sincronia na sobrevivência de camundongos a infecção da malária. Em cada grupo experimental foram alocados 8 animais submetidos ao ciclo claro/escuro 12hrs/12hrs, com fase de claro iniciando as 6:00hrs e terminando as 18:00hrs. Utilizamos 15 mg/kg de luzindol - antagonista competitivo do receptor de melatonina - e 3 mg/kg de cloroquina – fármaco antimalárico classicamente utilizado, administrados as 18:00hrs e 12:00hrs respectivamente. Durante 10 dias, foi avaliada a parasitemia e distribuição das fases do ciclo intraeritrocítico de camundongos infectados, nos seguintes grupos: Controle (sem administração de nenhuma droga ou veículo), PBS (veículo da cloroquina), Etanol (ETOH) (veículo do luzindol), Luzindol (LUZ), Cloroquina (CLQ) e Luzindol + Cloroquina (LUZ + CLQ).

A curva de sobrevivência mostrou uma grande diferença entre os camundongos tratados com o antimalárico (CLQ, LUZ +CLQ) em comparação os

controles, através do aumento da fração de sobreviventes, confirmando a grande eficiência do fármaco no combate a infecção. O uso combinado das drogas resulta em nenhuma mortalidade, enquanto que o uso somente de cloroquina causou grande fração de sobreviventes. O luzindol, nesta concentração (15 mg/kg), não diminui a mortalidade dos camundongos, uma vez que uma pequena fração dos camundongos sobreviveu. Todos os camundongos dos grupos controle (PBS, ETOH e CON) morreram.(Fig. 20).

Figura 20. Curva de sobrevivência dos camundongos Balb/C infectados com *P. chabaudi*, sujeitos a tratamentos com 3 mg/kg de cloroquina, 15 mg/kg de luzindol e veículos (PBS e Etanol).

O curso das parasitemias nos grupos experimentais foi analisado, mostrando direta relação entre aumento de parasitemia e aumento de mortalidade (Fig. 21).

Figura 21. Parasitemia de camundongos Balb/C infectados com *P. chabaudi*, sujeitos a tratamentos com 3 mg/kg de cloroquina, 15 mg/kg de luzindol e veículos (PBS e Etanol)

Após esse experimento, avaliamos o efeito de diferentes concentrações de cloroquina na sobrevivência de camundongos Balb/C sujeitos à infecção malárica, para melhor analisar o efeito combinado do luzindol e cloroquina. Com a concentração de cloroquina utilizada, era difícil estimar se o tratamento com o antagonista causava algum benefício, uma vez que grande parte dos camundongos sobreviveram ao serem tratados com cloroquina. Para isso, foram designados 5 grupos experimentais, sujeitos a administração de concentrações crescentes do antimalárico (0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg e controle) às 12:00hrs. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12hrs, com início de fase de claro às 06:00hrs e término às

18:00hrs. Como esperado, a aumento da fração de sobreviventes possui direta relação com o aumento da concentração de cloroquina (Fig 22).

Figura 22. Curva de sobrevivência de camundongos Balb/C infectados com *P. chabaudi*, sujeitos a concentrações crescentes do fármaco antimalárico cloroquina. Concentrações das curvas estão indicadas na figura.

Com essa informação, realizamos um novo experimento, utilizando uma concentração sub-ótima do fármaco (1,5 mg/kg). Com esta concentração, podemos observar melhor o efeito da utilização do luzindol na sobrevivência dos camundongos. Assim, como no experimento anterior, 8 camundongos foram designados nos mesmos 6 grupos experimentais (CON, PBS, ETOH, CLQ, LUZ, LUZ + CLQ), submetidos a ciclo claro/escuro 12/12hrs, com fase de claro com início as 06:00hrs e término as 18:00hrs. Foram utilizadas 1,5 mg/kg de cloroquina e 15 mg/kg de luzindol, administrados as 12:00hrs e 18:00hrs respectivamente.

Foi observado que não houve sobreviventes nos grupos controle (CON, ETOH e PBS). Houve uma pequena fração de sobreviventes nos grupos onde foi administrada apenas uma droga (LUZ e CLQ). No grupo onde as duas drogas foram administradas, houve uma maior fração de sobreviventes, mostrando ação sinérgica entre as duas drogas (Fig. 23). O curso das parasitemias nos grupos experimentais foi analisado, mostrando direta relação entre aumento de parasitemia e aumento de mortalidade (Fig. 24).

Figura 23. Curva de sobrevivência dos camundongos Balb/C infectados com *P. chabaudi*, sujeitos a tratamentos com 1,5 mg/kg de cloroquina, 15 mg/kg de luzindol e veículos (PBS e Etanol).

Figura 24. Parasitemia de camundongos Balb/C infectados com *P. chabaudi*, sujeitos a tratamentos com 1,5 mg/kg de cloroquina, 15 mg/kg de luzindol e veículos (PBS e Etanol)

Os experimentos relatados mostram que o luzindol aumenta sutilmente a sobrevivência dos camundongos. Porém, quando utilizado em conjunto com a cloroquina, ocorre um aumento significativo da fração de sobreviventes de camundongos Balb/C. Este dado mostra a importância da sincronia da infecção como estratégia de sobrevivência do parasita no hospedeiro vertebrado, e abre novas perspectivas para alvos de novos antimaláricos, uma vez que a resistência aos tratamentos atuais vem crescendo, e novas estratégias terapêuticas são necessárias para que se possa combater a epidemia com eficiência.

A partir dos dados já reportados sobre a influência do ritmo na resposta do hospedeiro a drogas antimaláricas, realizamos um experimento para aferir se o sistema imune poderia estar sendo auxiliado pela ausência de ritmo, lembrando da

observação de que uma dose sub-ótima de drogas antimaláricas é suficiente para acarretar em um importante aumento do número de animais sobreviventes quanto a estes foi administrado luzindol, agente que dessincroniza a parasitemia (Hotta *et al.*, 2000). Adicionamos a cultura de *P. falciparum*, sincronizada ou assíncrona, macrófagos purificados de sangue periférico e avaliamos se houve diferenças na resposta dos macrófagos – ativados e não ativados por LPS - a essas duas condições, através de contagem de parasitemia.

Este ensaio contou com a colaboração da Profa. Dra. Maria Regina D’Imperio Lima e do Dr. Sergio Rodrigues Málaga. O experimento mostrou uma tendência de que a cultura sincronizada não sofre a mesma influencia da presença dos macrófagos do que a cultura assíncrona. (Fig. 25)

Figura 25. Parasitemia de cultura de *P. falciparum* incubadas por 24 horas na presença de macrófagos e LPS.

Ao contrário dos resultados obtidos em *P. chabaudi* (malaria de roedor) e *P. falciparum* (Hotta *et al.*, 2000; Beraldo *et al.*, 2005), nossos dados indicaram claramente que em *P. berghei* e *P. yoelli* (resultados obtidos por Eduardo Alves, Bagnaresi *et al.*, no prelo) a melatonina não modula o ciclo celular (alteração da sincronização) como também não é capaz de promover o aumento de cálcio citossólico nestes parasitas. Em busca de possíveis mecanismos moleculares que pudessem ser responsáveis pela marcante diferença em resposta ao hormônio encontrada nesses quatro modelos de malaria, iniciamos um estudo molecular para melhor entender como o sinal é transduzido aos seus efetores celulares. Nesta parte iremos apresentar os resultados obtidos para construção de vetores para a geração de parasitas nocauteados, tanto para o modelo roedor, utilizando *P. berghei*, quanto para o modelo de malária humana, utilizando *P. falciparum*.

A utilização da metodologia de genética reversa em *Plasmodium* tem auxiliado a compreensão de função de proteínas nos parasitas. Ao silenciarmos a expressão de um gene, podemos analisar como o parasita se comporta sem esse componente de vias metabólicas ou de transdução de sinal. Porém, essa técnica encontra alguns obstáculos. O genoma do parasita é muito rico em bases A-T, sendo que estes perfazem 80% do total de bases no genoma (http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum/genome.overview.shtml), o que faz com que o DNA seja instável em *E. coli* (Triglia *et al.*, 1992), dificultando muito passos simples de clonagem, como uma simples ligação direcional. Mesmo assim, os vetores para genética reversa vem ajudado enormemente a entender a complexa biologia do parasita.

Nocautes obtidos pela técnica de integração com um único evento de recombinação tem sido amplamente utilizados para compreender o papel de genes no parasita, mas possui limitações. Após a integração do plasmídeo nesta técnica, todo o vetor, com o seu *backbone*, é retido dentro do locus do gene truncando, tornando muito mais difícil uma segunda integração com um vetor com outro cassete de seleção. Isso ocorre porque o *backbone* do vetor oferece mais sítios para recombinação com o segundo plasmídeo do que do locus para qual ele foi desenhado. Além disso, se o nocaute causar um efeito prejudicial ao parasita, os parasitas que possui replicação episomal do plasmídeo irão crescer mais rápido, o que pode impossibilitar a seleção de parasitas com integração do vetor. A estratégia da recombinação dupla, mais complexa por utilizar um cassete de seleção negativa e necessitar de 2 eventos de *crossing-over*, foi desenvolvida (Duraisingh *et al.*, 2002) para transpor essas dificuldades. Isso torna os parasitas com replicação episomal resistentes a droga de seleção positiva, mas susceptíveis a droga de seleção negativa. Uma vez integrado o plasmídeo vetor, seu backbone não se encontra no locus do gene alvo, e a droga de seleção negativa não é mais tóxica ao parasita.

A expressão de proteínas na forma nativa representa uma estratégia ubiqüitária para estudo de função de proteínas. No entanto, a expressão de proteínas de *Plasmodium* apresenta uma série de obstáculos devido a dificuldade de encontrar um bom sistema heterólogo. A expressão em *E. coli* na grande maioria das vezes não é bem sucedida, e grande parte das proteínas que tem expressão neste modelo ficam insolúveis, dificultando o uso do sistema para análises funcionais das proteínas. (Birkholtz *et al.*, 2008). Acredita-se que isso se dá pelo fato de que as proteínas de

Plasmodium possar ser tóxicas a bactéria (Vedadi *et al.*, 2007) e da diferença de conteúdo de aminoácidos nos dois sistemas, assim tornando a produção de proteínas heterológicas um obstáculo metabólico para a bactéria. Somando-se a isso, a expressão em sistema heterologo não proporciona as mesmas modificações pós-traducionais encontradas no parasita. Sistemas alternativos, como leveduras, células de inseto infectadas com baculovirus, *Dictyostelium discoideum*, *Xenopus laevis* e mesmo células de mamíferos são utilizados para a tentativa de expressão de proteínas do parasita. Para preparações de proteínas solúveis, a levedura *Pichia pastoris*, baculovirus podem apresentar melhor eficiência, já para o estudo da função da proteína, o uso de *Sarccharomyces*, *Dictyostelium* e células de mamíferos são mais adequadas (para revisão, ver Vedadi *et al.*, 2007).

Por esta razão, embora a obtenção de nocaute em *Plasmodium* apresente dificuldades, optamos pela utilização desta metodologia no presente trabalho empregando plasmídeo para nocaute por recombinação simples e dupla em diversos genes.

Para o estudo no modelo de roedor, demos ênfase para homólogos de genes que são potenciais candidatos a possuir uma função de receptor serpentina. Através de uma análise computacional do genoma de *P. falciparum*, proteínas com 7 ou 8 domínios transmembrânicos foram avaliadas, e foram excluídas proteínas com funções, domínios ou motivos que não eram compatíveis com receptores serpentinicos. Ao final do estudo, 4 candidatos foram encontrados (Madeira *et al.*, 2008), sendo que 2 deste possuem genes ortólogos atualmente anotados no genoma de *P. berghei*. Os genes escolhidos foram: PbSR10 (PB001093.01.0) e PbSR25 (PB000947.03.0), que

mostram homologia aos candidatos a receptores serpertinos de *P. falciparum* PfSR10 (PFL0765w) e PfSR25 (MAL7P1.64), respectivamente.

O gene PbSR10 possui 1776 pares de base, e codifica uma proteína de aproximadamente 69 kDa, com 8 domínios transmembrânicos, sendo um deles um peptídeo sinal. Possui um domínio que possui homologia com receptores de 7 domínios transmembrânicos de pulmão. Possui um pequeno intron de 2 pares de base.

O gene PbSR25 possui 1074 pares de bases, codificando uma proteína de aproximadamente 49 kDa. São previstos 7 domínios transmembrânicos, sendo um deles um possível peptídeo sinal. Possui um intron de 323 pares de base.

Para analisar os possíveis mecanismos moleculares da transdução do sinal da melatonina e entender o papel de alguns genes, e seus produtos, tentou-se construir vetores para a obtenção de parasitas nocaute, afim de se estudar os fenótipos encontrados. Para a análise do ritmo na infecção em camundongos, foi escolhido o modelo *P. berghei*, uma vez que não existia metodologia para transfecção em *P. chabaudi*, e onde o ensaio é facilitado pelo uso de plasmídeo linear, o que facilita a integração no genoma do parasita e evita a replicação episomal. A estratégia escolhida para realizar os nocautes foi a da dupla-recombinação, onde as regiões não transcritas que flanqueiam o gene alvo são clonadas e ligadas a um vetor de nocaute (Fig. 26), que possui um gene que confere resistência a uma droga (DHFR), no caso a pirimetamina. Por recombinação homóloga, as UTRs recombinaem e o gene é substituído pelo gene DHFR, possibilitando assim uma seleção pela resistência a droga.

Figura 26. Vetor para nocaute pL0001

Foram selecionados alguns genes para iniciar a abordagem em *P. berghei*: PbSR10 (PB001093.01.0) e PbSR25 (PB000947.03.0). Estas proteínas são ortólogas às proteínas identificadas como candidatos a receptores serpentina em *P. falciparum* (Madeira et al., 2008).

Após análise das seqüências dos genes, as regiões não transcritas (UTRs) que flanqueiam os genes de interesse foram retirados do banco de dados PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org>), e então feito o desenho de primers para amplificar de aproximadamente 500 bp das regiões não transcritas. Aos primers, foram adicionados com os sítios para enzimas de restrição para a realização das clonagens: ClaI e HindIII para a região 5' UTR e BamHI e XbaI para a região 3'UTR.

Para PbSR10 5' UTR, o amplicon esperado possui 530 bp. O amplicon esperado para PbSR10 3' UTR possui 401 bp. Análise em gel de agarose dos produtos de PCRs mostram que as reações resultaram em amplificação específica, no tamanho previsto (Fig. 27)

Figura 27. PCR para amplificação das UTRs que flanqueiam o gene PbSR10. As bandas são específicas, nos tamanhos esperados de 530 bp para PbSR10 5' UTR e 401 bp para PbSR10 3' UTR.

Após definidos as condições de PCR ótimas para cada reação, foi feita uma reação de PCR preparativa, e os produtos desta reação foram corridos em gel de agarose. Os produtos da reação foram corridos em gel de agarose, e as bandas de interesse foram extraídas e purificadas através dos kits GFX (Amersham Biosciences) e Quiaquick (Quiagen). Os fragmentos foram ligados a vetores de clonagem pGEM®-T Easy. Após transformação de bactérias e crescimento em meio seletivo, minipreps foram feitas, e digeridas para avaliar se continham os insertos ligados. A digestão com

enzima de restrição EcoRI, que libera o inserto ligado pois seus sítios flanqueiam a região onde se insere a ligação, gerou banda de tamanho esperado (530 bp para PbSR10 5' UTR e 401 bp para PbSR10 3'UTR), como observado na análise em gel de agarose, denotando o sucesso da clonagem neste vetor (Fig. 28).

Figura 28. Digestão dos plasmídeos pGEN-T Easy ligados as UTRs do gene PbSR10. As reações foram realizadas utilizando a enzima de restrição EcoRI, liberando o fragmento ligado, que se apresenta no tamanho esperado de 530 para o fragmento 5'UTR e 401 bp para o fragmento 3' UTR.

Para PbSR 25 5' UTR e PbSR25 3' UTR ,os amplicons esperados possuem 506 bp e 593 bp, respectivamente. A análise em gel de agarose dos produtos de PCR mostrou amplificação específica e no tamanho esperado (Fig 29).

Figura 29. PCR para amplificação das UTRs que flanqueiam os genes PbSR25. As bandas são específicas, no tamanho esperado de 506 bp para PbSR25 5'UTR e 593 bp para PbSR25 3' UTR.

Após definidos as condições de PCR ótimas para cada reação, foi feita uma reação de PCR preparativo. O produto das reações foram corridos em gel de agarose, e as bandas de interesse foram extraídas e purificadas através dos kits GFX (Amersham Biosciences) e Quiaquick (Quiagen). Os fragmentos foram ligados a vetores de clonagem pGEM®-T Easy. Digestões utilizando a enzima EcoRI, que flanqueia o sitio de integração dos fragmentos ligados, mostra bandas de tamanho esperado (506 bp para PbSR25 5'UTR e 593 bp para PbSR25 3'UTR) na análise em gel de agarose, denotando o sucesso da clonagem neste vetor (Fig. 30)

Figura 30. Digestão dos plasmídeos pGEN-T Easy ligados as UTRs do gene PbSR25,. As reações foram realizadas utilizando EcoRI, liberando o fragmento ligado, que se apresenta no tamanho esperado.

Os insertos foram, assim, clonados para posterior ligação ao plasmídeo para nocaute pL0001 (Fig. 26), e transfecção em *P. berghei*, para análise de fenótipo. Este é um vetor para recombinação dupla, e possui cassete de seleção que confere resistência a pirimetamina.

Além da construção de plasmídeos para nocaute em *P. berghei*, para posterior análise de fenótipo no parasita, foi realizada também a construção de vetores para nocaute em *P. falciparum*, dos genes PF14_0649 e PF14_0189 a fim de tentar analisar possíveis papéis de genes na transdução de sinal deste parasita, que possui ciclo de vida passível de ser sincronizado pelo hormônio melatonina, além da transfecção de uma construção para nocaute da proteína PfSR1. O vetor para nocaute do PfSR1 foi construído pelo Dr. Mauro Ferreira de Azevedo, durante seu estágio de pós-doutorado

em nosso laboratório. A estratégia escolhida para realizar os nocautes foi a da dupla-recombinação, como para *P. berghei*, onde as regiões não transcritas que flanqueiam o gene alvo são clonadas e ligadas a um vetor de nocaute. Neste caso, utilizaremos o PHH-TK (Crabb *et al.*, 2004)(Fig. 31), que utiliza o gene da timidina quinase para seleção negativa, uma vez que a trafecção neste parasita é feita com o plasmídeo circularizado. Esta seleção previne a persistente replicação episomal que ocorre em outros vetores.

Figura 31. Vetor para nocaute PHH-TK.

Os genes PF14_0649 e PF14_0189, escolhidos para iniciar o estudo, foram encontrados em um ensaio de cromatografia de afinidade de melatonina, realizada em nosso laboratório, pela Dr. Luciana Madeira, durante seu doutorado. A 6-hidroximelatonina foi ligada a matriz Sefarose 6B 6-epoxi-ativada por 68 horas a 32°C, afim de se obter uma coluna melatonina-agarose. Membranas de parasitas foram preparadas após seu isolamento dos eritrócitos e lise com 2% de digitonina, seguindo o protocolo adaptado de Rivkees *et al.*, 1990. Análises por espectrometria de massas resultou no seqüenciamento de quatro peptídeos de proteínas de *P. falciparum*. Comparando essas sequências com o banco de dados genômico, dois peptídeos mostraram 100% identidade para regiões das proteínas hipotéticas, PF14_0189 e PF14_0649 (Madeira, 2006).

Assim, as proteínas identificadas nesta coluna estariam possivelmente ligadas a sinalização intracelular de percepção do ambiente pelo parasita.

A sequência do gene PF14_0189 possui 636 bp, não possuindo introns. Codifica uma proteína de 211 aminoácidos, com peso molecular predito de 25,5 kDa.

A sequência do gene PF14_0649 possui com 7677 bp, possuindo um intron de 339 bp. Codifica uma proteína de 25558 aminoácidos, com peso molecular predito de aproximadamente 256 kDa.

O vetor para nocaute do gene PfSR1 já havia sido construído em nosso laboratório, pelo Dr. Mauro Ferreira de Azevedo. Não é conhecida a função dessa proteína, mas análises *in silico* colocam-na como um candidato a receptor serpentina (Madeira et al, 2008). Este gene está localizado no cromossomo 11, tem 2322 bp, e codifica uma proteína de 773 aminoácidos. Possui 7 domínios transmembrânicos, com

domínios apresentando homologia a repetições WD40. Seu domínio N-terminal é extremamente grande, com 508 aminoácidos, semelhante a receptores metabotrópicos de vertebrados (Bockaert e Pin, 1999).

A transfecção do vetor foi feita em parasitas *P. falciparum*, nas cepas 3D7 e W2. Após tratamento com 2.5 nM de WR99120, droga de seleção positiva do vetor, observou-se em cultura o aparecimento dos parasitas, indicando que a transfecção foi bem sucedida. (Fig. 32). Os ensaios de transfecção foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Philip J. Rosenthal, Universidade da Califórnia, São Francisco, E.U.A., assim como as construções dos vetores para nocaute em *P. falciparum*.

Figura 32. *P. falciparum* W2 observados em cultura após transfecção com o vetor PHH-TKΔPfSR1. A cultura foi tratada por 20 dias com 2.5 nM de WR99210, droga de seleção para o vetor.

A construção dos vetores para nocaute dos gene PF14_0189 começou pela amplificação das UTRs que flanqueiam os genes de interesses. Assim, as sequências das regiões não transcritas que foram retirados do banco de dados PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org>), e feito o desenho de primers para amplificar fragmentos das regiões não transcritas, com os sítios para enzimas de restrição apropriadas: SacII e SpeI para a região 5'UTR, e ClaI e NcoI para a região 3'UTR.

A análise em gel de agarose do produto de PCR mostrou amplificação no tamanho esperado. Para PF14_0189 5' UTR, o amplicon esperado possui 502 bp. O amplicon esperado para PF14_0189 3' UTR possui 571 bp (Fig. 33).

Figura 33. PCR para amplificação das UTRs do gene PF14_0189. A reação resultou em bandas do tamanho esperado, 502 bp para 5' UTR e 571 bp para 3'UTR.

Após definidos as condições de PCR ótimas para cada reação, foi feito um PCR preparativo, onde as bandas de interesse foram extraídas do gel de agarose purificadas através dos kits GFX (Amersham Biosciences) e Quiaquick (Quiagen). Os fragmentos foram ligados a vetores de clonagem pGEM®-T Easy. A ligação foi

eletroporada em bactérias *E. coli* DH10-B eletrocompetentes, e plaqueadas para selecionadas.

Os plasmídeos foram digeridos para confirmar a presença dos insertos. A análise em gel de agarose da digestão confirmou a presença do inserto nos tamanhos esperados (Fig. 34).

Figura 34. Digestão das minipreps obtidas para UTRs de PF14_0189. Para os insertos referentes a 5' UTR, a digestão foi feita com ClaI e NcoI. Para os insertos referentes a 3' UTR, a digestão foi feita com SacII e SpeI. Os clones 1 e 3 da ligação 5' UTR apresentam tamanho esperado de 502 bp, e todos os clones da ligação 3'UTR possui o tamanho esperado de 571 bp.

Após clonagem das UTRs, os insertos foram subclonados no vetor de transfeção PHH-TK, que possui cassete de seleção que confere resistência à droga WR92210. A sub-clonagem neste vetor tem uma baixíssima eficiência (Crabb *et al.*, 2004). A estratégia foi clonar inserir cada UTR separadamente no vetor, gerando PHH-

TKs para cada UTRs. Os plasmídeos pGEN-T com os insertos foram digeridos e foi feita ligação para sub-clonagem das UTRs no vetor PHH-TK. Assim, foi gerado o plasmideo PHH-TK – PF14_0189 5' UTR (Fig. 35) e PHH-TK – PF14_0189 3' UTR (Fig. 36)

Figura 35. Digestão do plasmídeo PHH_TK – PF14_0189 5'UTR. As bandas resultantes da clivagem dos clones mostram que o fragmento foi inserido, no tamanho, e que o vetor continua integro em todos os clones analisados .

Figura 36. Digestão do plasmídeo PHH_TK – PF14_0189 3'UTR. As bandas resultantes da clivagem do plasmídeo mostram que o fragmento foi inserido, e que o vetor continua íntegro.

Após isso, clivou-se os vetores, utilizando-se os sítios XmnI e SpeI. Esta digestão produz dois fragmentos, sendo que divide o gene de resistência a ampicilina presente no plasmídeo para seleção das colônias bacterianas que possuem o vetor. Assim, após a ligação, somente as bactérias que foram transformadas com os plasmídeos que tiveram uma religação correta aparecerão na placa, diminuindo muito o número de colônias falso positivas. Assim, foram concluídos os vetores pHH-TKΔPF14_0189 (Fig. 37), que foram transfectados em *P. falciparum* 3D7 e W2.

Figura 37. Digestão do vetor PHH-TK Δ PF_14_0189. Bandas nos tamanhos esperados - 502 bp para 5'UTR e 571 bp para 3' UTR- mostram que os fragmentos clonados estão inseridos no vetor, e que ele continua inteiro. Digestão do plasmídeo sem os insertos foi corrida ao lado, para mostrar a integração. Ao lado, mapa esquemático do plasmídeo.

Além da construção do vetor nocaute por recombinação dupla, também foi feita a construção de um plasmídeo por recombinação simples, uma vez que essa técnica tem a vantagem de integrar mais eficazmente ao genoma, uma vez que so necessita de um evento de recombinação. Assim, primers truncados foram desenhados na porção media de 569 do gene, acrescidos de códons de parada e sítios para enzimas de restrição BglII e XhoI. Assim, prosseguiu-se com a reação de amplificação, e seu produtos foram analisados em gel de agarose. Foi obtida amplificação específica, de tamanho esperado de 569 bp (Fig 38).

Figura 38. PCR para amplificação de região do gene PF14_0189, utilizando-se primers truncados. Obteve-se banda específica, de tamanho esperado (569 bp).

A banda foi extraída do gel e purificada. Após digestão com XhoI e BglII, o inserto foi ligado ao plasmídeo pHDΔFP3myc (Sijwali *et al.*, 2004), cedido gentilmente pelo Dr. Philip J. Rosenthal, Universidade da Califórnia, São Francisco, E.U.A.. O plasmídeo foi digerido para substituir o fragmento previamente clonado pelo nosso fragmento de interesse. Após a ligação, transformação de bactérias, seleção de colônias transformadas e extração do plasmídeo, fez-se a digestão com as enzimas XhoI e BglII. A análise em gel de agarose desta reação mostra que o sucesso da construção, resultando no plasmídeo pHDΔPF14_0189 (Fig. 39)

Figura 39. Digestão do plasmídeo pHDΔPF14_0189. A banda resultante, de 569 bp, mostra que o fragmento foi inserido no vetor com sucesso.

Após a construção do plasmídeo finalizada, efetuamos a transfecção de *P. falciparum* cepas 3D7 e W2, como descrito na seção de métodos. Mesmo após 30 dias de tratamento, não observou-se parasitas, o que pode indicar que não houve sucesso na transfecção, ou que este gene é essencial para o parasita.

Também construímos vetor de recombinação dupla para a proteína PF14_0649. A construção dos vetores começou pela amplificação das UTRs que flanqueiam os genes de interesses. Assim, as sequências das regiões não transcritas que foram retirados do banco de dados PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org>), foi feito o desenho de primers para amplificar fragmentos das regiões não transcritas, com os sítios para enzimas de restrição apropriadas: SacII e SpeI para a região 5'UTR, e ClaI e NcoI para a região 3' UTR. Para PF14_0649 5' UTR, o amplicon esperado possui 631 bp. O amplicon esperado para PF14_0649 3' UTR possui 692 bp. A análise

em gel de agarose dos produtos da reação de PCR mostrou amplificação das bandas nos tamanhos esperados de 631 bp para 5' UTR e 692 bp para 3' UTR (Fig. 40).

Figura 40. PCR para amplificação das UTRs do gene PF14_0649. As bandas mostram amplificação de fragmentos nos tamanhos esperados (631 para 5'UTR e 692 para 3'UTR)

Após definidos as condições de PCR ótimas para cada reação, foi feito um PCR preparativo, onde as bandas de interesse foram extraídas do gel de agarose purificadas através dos kits GFX (Amersham Biosciences) e Quiaquick (Quiagen). Os fragmentos foram ligados a vetores de clonagem pGEM®-T Easy. A ligação foi eletroporada em bactérias *E. coli* DH10-B eletrocompetentes, e plaqueadas para seleção.

Os plasmídeos foram digeridos para confirmar a presença dos insertos. A análise em gel de agarose da digestão com as enzimas de restrição EcoRI. Que

flanqueia o sítio de clonagem, confirmou a presença do inserto nos tamanhos esperados, exceto no clone 2 do 5' UTR (Fig. 41).

Figura 41. Digestão de plasmídeos pGEN-T Easy, com os insertos clonados. A digestão com a enzima EcoRI mostra bandas de tamanho esperado (631 para 5' UTR e 693 para 3'UTR).

Após isso, digeriu-se os plasmídeos positivos para sub-clonagem em PHH-TK com as mesmas enzimas utilizadas no desenho dos primers - SacII e SpeI para 5' UTR e ClaI e NcoI para 3' UTR- e efetuou-se a ligação. Análise em gel de agarose do produto da digestão da ligação mostra bandas no tamanho esperado, mostrando que o inserto foi clonado com sucesso no plasmídeo de nocaute. Assim, obteve-se os plasmídeos PHH-TK Δ PF14_0649 5'UTR (Fig. 42) e PHH-TK Δ PF14_0649 3' UTR (Fig. 43).

Figura 42. Digestão do plasmídeo PHH-TK Δ PF14_0649 5'UTR. As bandas mostram integração do inserto no vetor, denotado pelo aumento de tamanho da banda menor, em comparação com a digestão do vetor inicial. O aumento do tamanho da banda é compatível com o tamanho do inserto, 631 bp.

Figura 43. Digestão do plasmídeo PHH-TK Δ PF14_0649 5'UTR. As bandas mostram integração do inserto no vetor, denotado pelo aumento de tamanho da banda menor, em comparação com a digestão do vetor inicial. O aumento de tamanho é compatível com o tamanho do inserto, 693 bp.

Após isso, clivou-se os vetores, utilizando-se os sítios XmnI e SpeI. Esta digestão produz dois fragmentos, sendo que divide o gene de resistência a ampicilina presente no plasmídeo para seleção das colônias bacterianas que possuem o vetor. Assim, Após a ligação, somente as bactérias que foram transformadas com os plasmídeos que tiveram uma religação correta aparecerão na placa, diminuindo muito o numero de colônias falso positivas. Assim, foram concluídos os vetor pHH-TKΔPF14_0069 (Fig. 44), que foram transfectados em *P. falciparum* 3D7 e W2.

Figura 44. Digestão do vetor PHH-TKΔPF_14_0649. Bandas nos tamanhos esperados - 502 bp para 5'UTR e 571 bp para 3' UTR- mostram que os fragmentos clonados estão inseridos no vetor, e que ele continua integro. Digestão do plasmídeo sem os insertos foi corrida ao lado, para mostrar a integração. Ao lado, mapa esquemático do plasmídeo.

A transfecção do vetor foi realizada nos parâmetros descritos na seção de métodos, em *P. falciparum* cepas 3D7 e W2. Após 20 dias de tratamento com 2.5 nM de WR99210, droga de seleção positiva, foi observado parasitas em cultura (Fig. 45).

Figura 45. *P. falciparum* W2 observados em cultura Após tranfecção com o vetor PHH-TKΔPF14_0649. A cultura foi tratada por 20 dias com 2.5 nM de WR99210, droga de seleção para o vetor

O trabalho abre a perspectiva do estudo da função das proteínas PfSR1, PF14_0649 e PF14_0189 em *P. falciparum*. Para tanto será necessário a continuação do tratamento da cultura com as drogas de seleção, para buscar a integração do vetor no genoma do parasita. Após confirmado o nocauteamento do gene, a análise do fenótipo trará informações importantes sobre a função destas proteínas na biologia do parasita. O uso de parasitas nocaute já auxiliaram a elucidar aspectos da biologia do parasita, gerando fenótipos como: redução de infectividade do vetor *Anopheles stephensi*, mediado pelo nocaute do gene PbCHT1 (Dessens *et al.*, 2001); redução da taxa de crescimento no ciclo intraeritrocítico, mediado pelo nocaute dos genes PfPM1 e PfPMIV (Omara-Opyene *et al.*, 2004); alteração da morfologia mitocondrial, mediada

pelo nocaute do gene PfPMII (Omara-Opyene *et al.*, 2004); acúmulo de vesículas no vacúolo digestivo, mediado pelo nocaute do gene PfHAP (Omara-Opyene *et al.*, 2004); atividade de cisteínas proteases e digestão de hemoglobina reduzidas, mediado pelo nocaute dos gene PfFP2 (Sijwali *et al.*, 2004); fase G₁ mais longa e crescimento devagar, mediado pelo nocaute do gene EF-1 α (Janse *et al.*, 2003); impedimento da translocação da proteína PfEMP1 para fora da membrana do eritrócito, mediado pelo nocaute do gene PfEMP3 (Waterkeyn *et al.*, 2000); inibição da formação dos “knobs” e redução de citoaderência, mediado pelo nocaute do gene KAHRP (Crabb e Gilson, 2007); inibição da invasão do esporozoito na glândula salivar, mediado pelo nocaute do gene MAEBL (Kariu *et al.*, 2002); inibição da diferenciação do oocisto em esporozoito, mediados pelos genes PbCSP em *P. berghei* (Menard *et al.*, 1997) e PkCSP em *P. knowlesi* (Kocken *et al.*, 2002); entre muitos outros fenótipos observados (para revisão, ver Garcia *et al.*, 2008).

Conclusões

Atraves do presente trabalho, podemos concluir que:

- i) O parasita da malária de roedores *P. berghei* possui mecanismos e homeostase de cálcio e estoques intracelulares do íon;
- ii) *P. berghei* não percebe o estímulo do hormônio melatonina, uma vez que a molécula não induz aumento de cálcio intracelular e não modula o ciclo de vida do parasita, como observado para *P. chabaudi* e *P. falciparum*;
- iii) O ritmo da infecção de *P. chabaudi* é uma estratégia do parasita para evadir o sistema imune, uma vez que quando sua infecção é dessincronizada pelo uso do luzindole, concentrações sub-otimas do fármaco antimalárico cloroquina aumenta a sobrevida do hospedeiro roedor;
- iv) A análise de fenótipos de parasitas com os genes PfSR1, PF14_0189 e PF14_0649 nocauteados com as construções obtidas durante este trabalho irão trazer informações importantes para o melhor entendimento da complexa biologia do parasita.

Referências

- Aikawa, M.; Cochrane, A. H.; Nussenzweig, R. S.; Rabbege, J. Freeze-fracture study of malaria sporozoites: antibody-induced changes of the pellicular membrane. *J Protozool*, v. 26, n. 2, p. 273-279, May 1979.
- Aikawa, M.; Miller, L. H.; Johnson, J.; Rabbege, J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol*, v. 77, n. 1, p. 72-82, Apr 1978.
- Aikawa, M.; Torii, M.; Sjolander, A.; Berzins, K.; Perlmann, P.; Miller, L. H. Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of Plasmodium falciparum merozoites. *Exp Parasitol*, v. 71, n. 3, p. 326-329, Oct 1990.
- Alleva, L. M.; Kirk, K. Calcium regulation in the intraerythrocytic malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, v. 117, n. 2, p. 121-128, Oct 2001.
- Amino, R.; Thiberge, S.; Martin, B.; Celli, S.; Shorte, S.; Frischknecht, F.; Menard, R. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med*, v. 12, n. 2, p. 220-224, Feb 2006.
- Aravind, L.; Iyer, L. M.; Wellems, T. E.; Miller, L. H. Plasmodium biology: genomic gleanings. *Cell*, v. 115, n. 7, p. 771-785, Dec 26 2003.
- Arendt, J. *Melatonin and the mammalian pineal gland*. London: Chapman & Hill, 1995.
- Arnold, J. D.; Berger, A.; Martin, D. C. The role of the pineal in mediating photoperiodic control of growth and division synchrony and capillary sequestration of Plasmodium berghei in mice. *J Parasitol*, v. 55, n. 3, p. 609-616, Jun 1969.
- Atkinson, C. T.; Aikawa, M.; Perry, G.; Fujino, T.; Bennett, V.; Davidson, E. A.; Howard, R. J. Ultrastructural localization of erythrocyte cytoskeletal and integral membrane proteins in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Eur J Cell Biol*, v. 45, n. 2, p. 192-199, Feb 1988.
- Balzer, I.; Hardeland, R. Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, Gonyaulax polyedra. *Science*, v. 253, n. 5021, p. 795-797, Aug 16 1991.
- Bannister, L. H.; Butcher, G. A.; Dennis, E. D.; Mitchell, G. H. Structure and invasive behaviour of Plasmodium knowlesi merozoites in vitro. *Parasitology*, v. 71, n. 3, p. 483-491, Dec 1975.

- Bannister, L. H.; Dluzewski, A. R. The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells*, v. 16, n. 2-3, p. 257-292; discussion 293-257, 1990.
- Bannister, L. H.; Hopkins, J. M.; Dluzewski, A. R.; Margos, G.; Williams, I. T.; Blackman, M. J.; Kocken, C. H.; Thomas, A. W.; Mitchell, G. H. Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J Cell Sci*, v. 116, n. Pt 18, p. 3825-3834, Sep 15 2003.
- Bannister, L. H.; Mitchell, G. H. The fine structure of secretion by Plasmodium knowlesi merozoites during red cell invasion. *J Protozool*, v. 36, n. 4, p. 362-367, Jul-Aug 1989.
- Benitez-King, G.; Huerto-Delgadillo, L.; Anton-Tay, F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci*, v. 53, n. 3, p. 201-207, 1993.
- Beraldo, F. H.; Almeida, F. M.; Da Silva, A. M.; Garcia, C. R. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of Plasmodium falciparum cell cycle. *J Cell Biol*, v. 170, n. 4, p. 551-557, Aug 15 2005.
- Beraldo, F. H.; Garcia, C. R. Products of tryptophan catabolism induce Ca²⁺ release and modulate the cell cycle of Plasmodium falciparum malaria parasites. *J Pineal Res*, v. 39, n. 3, p. 224-230, Oct 2005.
- Beraldo, F. H.; Mikoshiba, K.; Garcia, C. R. Human malarial parasite, Plasmodium falciparum, displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the P. falciparum cell cycle. *J Pineal Res*, v. 43, n. 4, p. 360-364, Nov 2007.
- Bernardi, P. Mitochondria in muscle cell death. *Ital J Neurol Sci*, v. 20, n. 6, p. 395-400, Dec 1999.
- Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, v. 361, n. 6410, p. 315-325, Jan 28 1993.
- Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 4, n. 7, p. 517-529, Jul 2003.
- Berridge, M. J.; Irvine, R. F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, v. 312, n. 5992, p. 315-321, Nov 22-28 1984.
- _____. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, v. 341, n. 6239, p. 197-205, Sep 21 1989.

- Biagini, G. A.; Bray, P. G.; Spiller, D. G.; White, M. R.; Ward, S. A. The digestive food vacuole of the malaria parasite is a dynamic intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem*, v. 278, n. 30, p. 27910-27915, Jul 25 2003.
- Billker, O.; Dechamps, S.; Tewari, R.; Wenig, G.; Franke-Fayard, B.; Brinkmann, V. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*, v. 117, n. 4, p. 503-514, May 14 2004.
- Billker, O.; Lindo, V.; Panico, M.; Etienne, A. E.; Paxton, T.; Dell, A.; Rogers, M.; Sinden, R. E.; Morris, H. R. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, v. 392, n. 6673, p. 289-292, Mar 19 1998.
- Birkholtz, L. M.; Blatch, G.; Coetzer, T. L.; Hoppe, H. C.; Human, E.; Morris, E. J.; Ngcete, Z.; Oldfield, L.; Roth, R.; Shonhai, A.; Stephens, L.; Louw, A. I. Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation. *Malar J*, v. 7, p. 197, 2008.
- Blaustein, M. P.; Hodgkin, A. L. The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J Physiol*, v. 200, n. 2, p. 497-527, Feb 1969.
- Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, v. 18, n. 7, p. 1723-1729, Apr 1 1999.
- Brini, M.; Carafoli, E. Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci*, v. 57, n. 3, p. 354-370, Mar 2000.
- Bruce-Chwatt, L. J. Paleogenesis and Paleo-Epidemiology of Primate Malaria. *Bull World Health Organ*, v. 32, p. 363-387, 1965.
- Budu, A.; Peres, R.; Bueno, V. B.; Catalani, L. H.; Garcia, C. R. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. *J Pineal Res*, v. 42, n. 3, p. 261-266, Apr 2007.
- Capanna, E. Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? *Int Microbiol*, v. 9, n. 1, p. 69-74, Mar 2006.
- Carafoli, E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*, v. 56, p. 395-433, 1987.
- Carafoli, E.; Garcia-Martin, E.; Guerini, D. The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. *Experientia*, v. 52, n. 12, p. 1091-1100, Dec 15 1996.

- Carlton, J. M.; Angiuoli, S. V.; Suh, B. B.; Kooij, T. W.; Perte, M.; Silva, J. C.; Ermolaeva, M. D.; Allen, J. E.; Selengut, J. D.; Koo, H. L.; Peterson, J. D.; Pop, M.; Kosack, D. S.; Shumway, M. F.; Bidwell, S. L.; Shallom, S. J.; Van Aken, S. E.; Riedmuller, S. B.; Feldblyum, T. V.; Cho, J. K.; Quackenbush, J.; Sedegah, M.; Shoaibi, A.; Cummings, L. M.; Florens, L.; Yates, J. R.; Raine, J. D.; Sinden, R. E.; Harris, M. A.; Cunningham, D. A.; Preiser, P. R.; Bergman, L. W.; Vaidya, A. B.; Van Lin, L. H.; Janse, C. J.; Waters, A. P.; Smith, H. O.; White, O. R.; Salzberg, S. L.; Venter, J. C.; Fraser, C. M.; Hoffman, S. L.; Gardner, M. J.; Carucci, D. J. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*, v. 419, n. 6906, p. 512-519, Oct 3 2002.
- Carter, R.; Mendis, K. N. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev*, v. 15, n. 4, p. 564-594, Oct 2002.
- Coppi, A.; Tewari, R.; Bishop, J. R.; Bennett, B. L.; Lawrence, R.; Esko, J. D.; Billker, O.; Sinnis, P. Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to *Plasmodium* sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host Microbe*, v. 2, n. 5, p. 316-327, Nov 15 2007.
- Crabb, B. S.; Cowman, A. F. Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 14, p. 7289-7294, Jul 9 1996.
- Crabb, B. S.; Gilson, P. R. A new system for rapid plasmid integration in *Plasmodium* parasites. *Trends Microbiol*, v. 15, n. 1, p. 3-6, Jan 2007.
- Crabb, B. S.; Rug, M.; Gilberger, T. W.; Thompson, J. K.; Triglia, T.; Maier, A. G.; Cowman, A. F. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol*, v. 270, p. 263-276, 2004.
- De Koning-Ward, T. F.; Janse, C. J.; Waters, A. P. The development of genetic tools for dissecting the biology of malaria parasites. *Annu Rev Microbiol*, v. 54, p. 157-185, 2000.
- Deoliveira, A. R.; Castrucci, A. M.; Visconti, M. A. Cellular signalling in vertebrate pigment cells. *Braz J Med Biol Res*, v. 29, n. 12, p. 1743-1749, Dec 1996.
- Desowitz, R. S.; Barnwell, J. W. *Plasmodium berghei*: deep vascular sequestration of young forms in the heart and kidney of the white rat. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 70, n. 4, p. 475-476, Dec 1976.
- Dessens, J. T.; Mendoza, J.; Claudianos, C.; Vinetz, J. M.; Khater, E.; Hassard, S.; Ranawaka, G. R.; Sinden, R. E. Knockout of the rodent malaria parasite chitinase pbCHT1 reduces infectivity to mosquitoes. *Infect Immun*, v. 69, n. 6, p. 4041-4047, Jun 2001.

- Di Virgilio, F.; Steinberg, T. H.; Silverstein, S. C. Organic-anion transport inhibitors to facilitate measurement of cytosolic free Ca^{2+} with fura-2. *Methods Cell Biol*, v. 31, p. 453-462, 1989.
- _____. Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium*, v. 11, n. 2-3, p. 57-62, Feb-Mar 1990.
- Di Virgilio, F.; Steinberg, T. H.; Swanson, J. A.; Silverstein, S. C. 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. *J Immunol*, v. 140, n. 3, p. 915-920, Feb 1 1988.
- Dluzewski, A. R.; Fryer, P. R.; Griffiths, S.; Wilson, R. J.; Gratzer, W. B. Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. *J Cell Sci*, v. 92 (Pt 4), p. 691-699, Apr 1989.
- Dobson, S.; May, T.; Berriman, M.; Del Vecchio, C.; Fairlamb, A. H.; Chakrabarti, D.; Barik, S. Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex. *Mol Biochem Parasitol*, v. 99, n. 2, p. 167-181, Apr 30 1999.
- Dubbels, R.; Reiter, R. J.; Klenke, E.; Goebel, A.; Schnakenberg, E.; Ehlers, C.; Schiwara, H. W.; Schloot, W. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res*, v. 18, n. 1, p. 28-31, Jan 1995.
- Duraisingh, M. T.; Triglia, T.; Cowman, A. F. Negative selection of *Plasmodium falciparum* reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. *Int J Parasitol*, v. 32, n. 1, p. 81-89, Jan 2002.
- Ebashi, S. A granule-bound relaxation factor in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*, v. 76, n. 2, p. 410-423, Aug 1958.
- Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; Van Goethem, I. D.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S. Artemisinin target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, v. 424, n. 6951, p. 957-961, Aug 21 2003.
- Eison, A. S.; Mullins, U. L. Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in Syrian hamster RPMI 1846 melanoma cells. *Life Sci*, v. 53, n. 24, p. PL393-398, 1993.
- Enserink, M. Mosquito engineering. Building a disease-fighting mosquito. *Science*, v. 290, n. 5491, p. 440-441, Oct 20 2000.
- Gambrell, W. E. Variations in gametocyte production in avian malaria. *Am. J. Trop. Med.*, v. 17, p. 689-727, 1937.

- Garcia, C. R. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol Today*, v. 15, n. 12, p. 488-491, Dec 1999.
- Garcia, C. R.; Ann, S. E.; Tavares, E. S.; Dluzewski, A. R.; Mason, W. T.; Paiva, F. B. Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol*, v. 76, n. 2, p. 133-138, Jun 1998.
- Garcia, C. R.; De Azevedo, M. F.; Wunderlich, G.; Budu, A.; Young, J. A.; Bannister, L. Plasmodium in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Int Rev Cell Mol Biol*, v. 266, p. 85-156, 2008.
- Garcia, C. R.; Dluzewski, A. R.; Catalani, L. H.; Burtin, R.; Hoyland, J.; Mason, W. T. Calcium homeostasis in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur J Cell Biol*, v. 71, n. 4, p. 409-413, Dec 1996.
- Garcia, C. R.; Markus, R. P.; Madeira, L. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. *J Biol Rhythms*, v. 16, n. 5, p. 436-443, Oct 2001.
- Gardner, M. J.; Hall, N.; Fung, E.; White, O.; Berriman, 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.; Kyes, S.; Chan, M. S.; Nene, V.; Shallom, S. J.; Suh, B.; Peterson, J.; Angiuoli, S.; Pertea, M.; Allen, J.; Selengut, J.; Haft, D.; Mather, M. W.; Vaidya, A. B.; Martin, D. M.; 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.; Carucci, D. J.; Hoffman, S. L.; Newbold, C.; Davis, R. W.; Fraser, C. M.; Barrell, B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, v. 419, n. 6906, p. 498-511, Oct 3 2002.
- Garnham, P. C.; Powers, K. G. Periodicity of infectivity of plasmodial gametocytes: the "Hawking phenomenon". *Int J Parasitol*, v. 4, n. 1, p. 103-106, Feb 1974.
- Gautret, P.; Motard, A. Periodic infectivity of *Plasmodium* gametocytes to the vector. A review. *Parasite*, v. 6, n. 2, p. 103-111, Jun 1999.
- Gazarini, M. L.; Garcia, C. R. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca^{2+} fluctuations. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 321, n. 1, p. 138-144, Aug 13 2004.
- Gazarini, M. L.; Sigolo, C. A.; Markus, R. P.; Thomas, A. P.; Garcia, C. R. Antimalarial drugs disrupt ion homeostasis in malarial parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 3, p. 329-334, Jun 2007.
- Gazarini, M. L.; Thomas, A. P.; Pozzan, T.; Garcia, C. R. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol*, v. 161, n. 1, p. 103-110, Apr 14 2003.

- Gerasimenko, O. V.; Gerasimenko, J. V.; Belan, P. V.; Petersen, O. H. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell*, v. 84, n. 3, p. 473-480, Feb 9 1996.
- Gilad, E.; Wong, H. R.; Zingarelli, B.; Virag, L.; O'connor, M.; Salzman, A. L.; Szabo, C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J*, v. 12, n. 9, p. 685-693, Jun 1998.
- Ginsburg, H. Iron acquisition by Plasmodium spp. *Parasitol Today*, v. 15, n. 11, p. 466, Nov 1999.
- Goonewardene, R.; Daily, J.; Kaslow, D.; Sullivan, T. J.; Duffy, P.; Carter, R.; Mendis, K.; Wirth, D. Transfection of the malaria parasite and expression of firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, n. 11, p. 5234-5236, Jun 1 1993.
- Guerra, C. A.; Gikandi, P. W.; Tatem, A. J.; Noor, A. M.; Smith, D. L.; Hay, S. I.; Snow, R. W. The limits and intensity of Plasmodium falciparum transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med*, v. 5, n. 2, p. e38, Feb 2008.
- Hall, N.; Carlton, J. Comparative genomics of malaria parasites. *Curr Opin Genet Dev*, v. 15, n. 6, p. 609-613, Dec 2005.
- Hardeland, R.; Balzer, I.; Poeggeler, B.; Fuhrberg, B.; Uria, H.; Behrmann, G.; Wolf, R.; Meyer, T. J.; Reiter, R. J. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res*, v. 18, n. 2, p. 104-111, Mar 1995.
- Hasselbach, W.; Makinose, M. [The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting.]. *Biochem Z*, v. 333, p. 518-528, 1961.
- Hawking, F. The clock of the malaria parasite. *Sci Am*, v. 222, n. 6, p. 123-131, Jun 1970.
- Hawking, F.; Worms, M. J.; Gammage, K. 24- and 48-hour cycles of malaria parasites in the blood; their purpose, production and control. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 62, n. 6, p. 731-765, 1968a.
- _____. Host temperature and control of 24-hour and 48-hour cycles in malaria parasites. *Lancet*, v. 1, n. 7541, p. 506-509, Mar 9 1968b.
- Hotta, C. T.; Gazarini, M. L.; Beraldo, F. H.; Varotti, F. P.; Lopes, C.; Markus, R. P.; Pozzan, T.; Garcia, C. R. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol*, v. 2, n. 7, p. 466-468, Jul 2000.

- Hotta, C. T.; Markus, R. P.; Garcia, C. R. Melatonin and N-acetyl-serotonin cross the red blood cell membrane and evoke calcium mobilization in malarial parasites. *Braz J Med Biol Res*, v. 36, n. 11, p. 1583-1587, Nov 2003.
- Igbavboa, U.; Pfeiffer, D. R. EGTA inhibits reverse uniport-dependent Ca^{2+} release from uncoupled mitochondria. Possible regulation of the Ca^{2+} uniporter by a Ca^{2+} binding site on the cytoplasmic side of the inner membrane. *J Biol Chem*, v. 263, n. 3, p. 1405-1412, Jan 25 1988.
- Janse, C. J.; Haghparast, A.; Speranca, M. A.; Ramesar, J.; Kroeze, H.; Del Portillo, H. A.; Waters, A. P. Malaria parasites lacking eef1a have a normal S/M phase yet grow more slowly due to a longer G1 phase. *Mol Microbiol*, v. 50, n. 5, p. 1539-1551, Dec 2003.
- Johnson, J. G.; Epstein, N.; Shiroishi, T.; Miller, L. H. Factors affecting the ability of isolated Plasmodium knowlesi merozoites to attach to and invade erythrocytes. *Parasitology*, v. 80, n. 3, p. 539-550, Jun 1980.
- Karin, M.; Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, v. 18, p. 621-663, 2000.
- Kariu, T.; Yuda, M.; Yano, K.; Chinzei, Y. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med*, v. 195, n. 10, p. 1317-1323, May 20 2002.
- Kawamoto, F.; Alejo-Blanco, R.; Fleck, S. L.; Kawamoto, Y.; Sinden, R. E. Possible roles of Ca^{2+} and cGMP as mediators of the exflagellation of Plasmodium berghei and Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, v. 42, n. 1, p. 101-108, Aug 1990.
- Kawamoto, F.; Alejo-Blanco, R.; Fleck, S. L.; Sinden, R. E. Plasmodium berghei: ionic regulation and the induction of gametogenesis. *Exp Parasitol*, v. 72, n. 1, p. 33-42, Jan 1991.
- Kimura, M.; Yamaguchi, Y.; Takada, S.; Tanabe, K. Cloning of a Ca^{2+} -ATPase gene of Plasmodium falciparum and comparison with vertebrate Ca^{2+} -ATPases. *J Cell Sci*, v. 104 (Pt 4), p. 1129-1136, Apr 1993.
- Kligman, D.; Hilt, D. C. The S100 protein family. *Trends Biochem Sci*, v. 13, n. 11, p. 437-443, Nov 1988.
- Kocken, C. H.; Ozwara, H.; Van Der Wel, A.; Beetsma, A. L.; Mwenda, J. M.; Thomas, A. W. Plasmodium knowlesi provides a rapid in vitro and in vivo transfection system that enables double-crossover gene knockout studies. *Infect Immun*, v. 70, n. 2, p. 655-660, Feb 2002.

- Kroner, H. "Allosteric regulation" of calcium-uptake in rat liver mitochondria. *Biol Chem Hoppe Seyler*, v. 367, n. 6, p. 483-493, Jun 1986.
- Kumar, R.; Musiyenko, A.; Barik, S. Plasmodium falciparum calcineurin and its association with heat shock protein 90: mechanisms for the antimalarial activity of cyclosporin A and synergism with geldanamycin. *Mol Biochem Parasitol*, v. 141, n. 1, p. 29-37, May 2005.
- La Greca, N.; Hibbs, A. R.; Riffkin, C.; Foley, M.; Tilley, L. Identification of an endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein with multiple EF-hand motifs in asexual stages of Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, v. 89, n. 2, p. 283-293, Nov 1997.
- Lambros, C.; Vanderberg, J. P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, v. 65, n. 3, p. 418-420, Jun 1979.
- Lopes, C.; Delyra, J. L.; Markus, R. P.; Mariano, M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*, v. 23, n. 2, p. 72-78, Sep 1997.
- Lytton, J.; Westlin, M.; Hanley, M. R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*, v. 266, n. 26, p. 17067-17071, Sep 15 1991.
- Macias, M.; Rodriguez-Cabezas, M. N.; Reiter, R. J.; Osuna, A.; Acuna-Castroviejo, D. Presence and effects of melatonin in Trypanosoma cruzi. *J Pineal Res*, v. 27, n. 2, p. 86-94, Sep 1999.
- Mackintosh, C. L.; Beeson, J. G.; Marsh, K. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol*, v. 20, n. 12, p. 597-603, Dec 2004.
- MacLennan, D. H. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, v. 245, n. 17, p. 4508-4518, Sep 10 1970.
- Madeira, L. *Identificação molecular de proteínas envolvidas na transdução de sinal em Plasmodium falciparum*. (2006). (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- Madeira, L.; Galante, P. A.; Budu, A.; Azevedo, M. F.; Malnic, B.; Garcia, C. R. Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. *PLoS ONE*, v. 3, n. 3, p. e1889, 2008.
- Marchesini, N.; Luo, S.; Rodrigues, C. O.; Moreno, S. N.; Docampo, R. Acidocalcisomes and a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in malaria parasites. *Biochem J*, v. 347 Pt 1, p. 243-253, Apr 1 2000.

- Markus, R. P.; Ferreira, Z. S.; Fernandes, P. A.; Cecon, E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, v. 14, n. 3-4, p. 126-133, 2007.
- Matsumoto, Y.; Perry, G.; Scheibel, L. W.; Aikawa, M. Role of calmodulin in *Plasmodium falciparum*: implications for erythrocyte invasion by the merozoite. *Eur J Cell Biol*, v. 45, n. 1, p. 36-43, Dec 1987.
- Mccallum-Deighton, N.; Holder, A. A. The role of calcium in the invasion of human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 50, n. 2, p. 317-323, Feb 1992.
- Meffert, M. K.; Baltimore, D. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci*, v. 28, n. 1, p. 37-43, Jan 2005.
- Menard, R.; Sultan, A. A.; Cortes, C.; Altszuler, R.; Van Dijk, M. R.; Janse, C. J.; Waters, A. P.; Nussenzweig, R. S.; Nussenzweig, V. Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature*, v. 385, n. 6614, p. 336-340, Jan 23 1997.
- Miller, L. H.; Aikawa, M.; Johnson, J. G.; Shiroishi, T. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J Exp Med*, v. 149, n. 1, p. 172-184, Jan 1 1979.
- Mohan, A.; Sullivan, W. J., Jr.; Radivojac, P.; Dunker, A. K.; Uversky, V. N. Intrinsic disorder in pathogenic and non-pathogenic microbes: discovering and analyzing the unfoldomes of early-branching eukaryotes. *Mol Biosyst*, v. 4, n. 4, p. 328-340, Apr 2008.
- Mota, M. M.; Rodriguez, A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell Microbiol*, v. 6, n. 12, p. 1113-1118, Dec 2004.
- Mullins, U. L.; Eison, A. S. Pharmacologic characterization of melatonin-mediated phosphoinositide hydrolysis in pigeon brain. *J Pineal Res*, v. 17, n. 1, p. 33-38, Aug 1994.
- Murakami, K.; Tanabe, K.; Takada, S. Structure of a *Plasmodium yoelii* gene-encoded protein homologous to the Ca(2+)-ATPase of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, v. 97 (Pt 3), p. 487-495, Nov 1990.
- Murphy, S. C.; Samuel, B. U.; Harrison, T.; Speicher, K. D.; Speicher, D. W.; Reid, M. E.; Prohaska, R.; Low, P. S.; Tanner, M. J.; Mohandas, N.; Haldar, K. Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood*, v. 103, n. 5, p. 1920-1928, Mar 1 2004.

- Nagamune, K.; Sibley, L. D. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol Biol Evol*, v. 23, n. 8, p. 1613-1627, Aug 2006.
- Nelson, R. J.; Drazen, D. L. Melatonin mediates seasonal adjustments in immune function. *Reprod Nutr Dev*, v. 39, n. 3, p. 383-398, May-Jun 1999.
- Nunes, A.; Thathy, V.; Bruderer, T.; Sultan, A. A.; Nussenzweig, R. S.; Menard, R. Subtle mutagenesis by ends-in recombination in malaria parasites. *Mol Cell Biol*, v. 19, n. 4, p. 2895-2902, Apr 1999.
- Nussey, S.; Whitehead, S. *Endocrinology: An Integrated Approach*. London, 2001.
- Omara-Opyene, A. L.; Moura, P. A.; Sulsona, C. R.; Bonilla, J. A.; Yowell, C. A.; Fujioka, H.; Fidock, D. A.; Dame, J. B. Genetic disruption of the Plasmodium falciparum digestive vacuole plasmepsins demonstrates their functional redundancy. *J Biol Chem*, v. 279, n. 52, p. 54088-54096, Dec 24 2004.
- Passos, A. P.; Garcia, C. R. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite P. chabaudi. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 245, n. 1, p. 155-160, Apr 7 1998.
- Popova, J. S.; Dubocovich, M. L. Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. *J Neurochem*, v. 64, n. 1, p. 130-138, Jan 1995.
- Pozzan, T.; Rizzuto, R.; Volpe, P.; Meldolesi, J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev*, v. 74, n. 3, p. 595-636, Jul 1994.
- Putney, J. W., Jr.; Bird, G. S. The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev*, v. 14, n. 5, p. 610-631, Oct 1993.
- Rasmussen, H.; Barrett, P. Q. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol Rev*, v. 64, n. 3, p. 938-984, Jul 1984.
- Reuter, H.; Seitz, N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol*, v. 195, n. 2, p. 451-470, Mar 1968.
- Ridley, R. G. Malaria: dissecting chloroquine resistance. *Curr Biol*, v. 8, n. 10, p. R346-349, May 7 1998.
- Rivkees, S. A.; Conron, R. W., Jr.; Reppert, S. M. Solubilization and purification of melatonin receptors from lizard brain. *Endocrinology*, v. 127, n. 3, p. 1206-1214, Sep 1990.

- Rizzuto, R.; Brini, M.; Murgia, M.; Pozzan, T. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, v. 262, n. 5134, p. 744-747, Oct 29 1993.
- Robson, K. J.; Jennings, M. W. The structure of the calmodulin gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 46, n. 1, p. 19-34, May 1991.
- Sambrook, J. F. The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell*, v. 61, n. 2, p. 197-199, Apr 20 1990.
- Sanchez, C. P.; Mclean, J. E.; Stein, W.; Lanzer, M. Evidence for a substrate specific and inhibitable drug efflux system in chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* strains. *Biochemistry*, v. 43, n. 51, p. 16365-16373, Dec 28 2004.
- Scarpa, A.; Carafoli, E.; Papa, S. Ion-Motive ATPases: Structure, Function, and Regulation. Proceedings of a conference. Cleveland, Ohio, June 13-17, 1992. *Ann N Y Acad Sci*, v. 671, p. 1-515, Nov 30 1992.
- Shah, K. S. The periodic development of sexual forms of *Plasmodium vinckei chabaudi* in the peripheral circulation of canaries. *Am. J. Hyg.*, v. 20, p. 392-403, 1934.
- Sijwali, P. S.; Kato, K.; Seydel, K. B.; Gut, J.; Lehman, J.; Klemmba, M.; Goldberg, D. E.; Miller, L. H.; Rosenthal, P. J. *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 23, p. 8721-8726, Jun 8 2004.
- Sinnis, P.; Coppi, A. A long and winding road: the *Plasmodium* sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitol Int*, v. 56, n. 3, p. 171-178, Sep 2007.
- Skene, D. J.; Vivien-Roels, B.; Pevet, P. Day and nighttime concentrations of 5-methoxytryptophol and melatonin in the retina and pineal gland from different classes of vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*, v. 84, n. 3, p. 405-411, Dec 1991.
- Sparagna, G. C.; Gunter, K. K.; Gunter, T. E. A system for producing and monitoring in vitro calcium pulses similar to those observed in vivo. *Anal Biochem*, v. 219, n. 1, p. 96-103, May 15 1994.
- Sparagna, G. C.; Gunter, K. K.; Sheu, S. S.; Gunter, T. E. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem*, v. 270, n. 46, p. 27510-27515, Nov 17 1995.
- Sturm, A.; Amino, R.; Van De Sand, C.; Regen, T.; Retzlaff, S.; Rennenberg, A.; Krueger, A.; Pollok, J. M.; Menard, R.; Heussler, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, Sep 1 2006.

- Tan, D. X.; Manchester, L. C.; Terron, M. P.; Flores, L. J.; Reiter, R. J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, v. 42, n. 1, p. 28-42, Jan 2007.
- Terzakis, J. A.; Vanderberg, J. P.; Weiss, M. M. Viruslike particles in malaria parasites. *J Parasitol*, v. 62, n. 3, p. 366-371, Jun 1976.
- Thastrup, O. Role of Ca²⁺(+)-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺(+)-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions*, v. 29, n. 1-2, p. 8-15, Jan 1990.
- Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, v. 193, n. 4254, p. 673-675, Aug 20 1976.
- Triglia, T.; Wellems, T. E.; Kemp, D. J. Towards a high-resolution map of the *Plasmodium falciparum* genome. *Parasitol Today*, v. 8, n. 7, p. 225-229, Jul 1992.
- Trottein, F.; Cowman, A. F. Molecular cloning and sequence of two novel P-type adenosinetriphosphatases from *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*, v. 227, n. 1-2, p. 214-225, Jan 15 1995.
- Tsim, S. T.; Wong, J. T.; Wong, Y. H. Calcium ion dependency and the role of inositol phosphates in melatonin-induced encystment of dinoflagellates. *J Cell Sci*, v. 110 (Pt 12), p. 1387-1393, Jun 1997.
- Van Dijk, M. R.; Janse, C. J.; Waters, A. P. Expression of a *Plasmodium* gene introduced into subtelomeric regions of *Plasmodium berghei* chromosomes. *Science*, v. 271, n. 5249, p. 662-665, Feb 2 1996.
- Van Someren, E. J. More than a marker: interaction between the circadian regulation of temperature and sleep, age-related changes, and treatment possibilities. *Chronobiol Int*, v. 17, n. 3, p. 313-354, May 2000.
- Varotti, F. P.; Beraldo, F. H.; Gazarini, M. L.; Garcia, C. R. *Plasmodium falciparum* malaria parasites display a THG-sensitive Ca²⁺ pool. *Cell Calcium*, v. 33, n. 2, p. 137-144, Feb 2003.
- Vasington, F. D.; Murphy, J. V. Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J Biol Chem*, v. 237, p. 2670-2677, Aug 1962.
- Vedadi, M.; Lew, J.; Artz, J.; Amani, M.; Zhao, Y.; Dong, A.; Wasney, G. A.; Gao, M.; Hills, T.; Brokx, S.; Qiu, W.; Sharma, S.; Diassiti, A.; Alam, Z.; Melone, M.; Mulichak, A.; Wernimont, A.; Bray, J.; Loppnau, P.; Plotnikova, O.; Newberry, K.; Sundararajan, E.; Houston, S.; Walker, J.; Tempel, W.; Bochkarev, A.; Kozieradzki, I.; Edwards, A.

- Arrowsmith, C.; Roos, D.; Kain, K.; Hui, R. Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Mol Biochem Parasitol*, v. 151, n. 1, p. 100-110, Jan 2007.
- Wasserman, M. The role of calcium ions in the invasion of *Plasmodium falciparum*. *Blood Cells*, v. 16, n. 2-3, p. 450-451, 1990.
- Waterkeyn, J. G.; Wickham, M. E.; Davern, K. M.; Cooke, B. M.; Coppel, R. L.; Reeder, J. C.; Culvenor, J. G.; Waller, R. F.; Cowman, A. F. Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *EMBO J*, v. 19, n. 12, p. 2813-2823, Jun 15 2000.
- Wictome, M.; Michelangeli, F.; Lee, A. G.; East, J. M. The inhibitors thapsigargin and 2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone favour the E2 form of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase. *FEBS Lett*, v. 304, n. 2-3, p. 109-113, Jun 15 1992.
- Wu, Y.; Kirkman, L. A.; Wellems, T. E. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 3, p. 1130-1134, Feb 6 1996.
- Wu, Y.; Sifri, C. D.; Lei, H. H.; Su, X. Z.; Wellems, T. E. Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, n. 4, p. 973-977, Feb 14 1995.
- Zhao, Y.; Franklin, R. M.; Kappes, B. *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase phosphorylates proteins of the host erythrocytic membrane. *Mol Biochem Parasitol*, v. 66, n. 2, p. 329-343, Aug 1994.
- Zhao, Y.; Kappes, B.; Franklin, R. M. Gene structure and expression of an unusual protein kinase from *Plasmodium falciparum* homologous at its carboxyl terminus with the EF hand calcium-binding proteins. *J Biol Chem*, v. 268, n. 6, p. 4347-4354, Feb 25 1993.
- Zhao, Y.; Pokutta, S.; Maurer, P.; Lindt, M.; Franklin, R. M.; Kappes, B. Calcium-binding properties of a calcium-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum* and the significance of individual calcium-binding sites for kinase activation. *Biochemistry*, v. 33, n. 12, p. 3714-3721, Mar 29 1994.

Resumo

A malária é a doença parasitaria que mais mata no mundo. Metade da população mundial está sob risco de contrair a doença, que mata mais de 1 milhão de pessoas por ano, principalmente crianças com menos de 5 anos de idade.

A periodicidade das febres é o sintoma característico da doença. A febre é resultado da lise dos eritrócitos mediada pela saída do parasita, para infectar novas células. Esse evento é sincronizado, com os parasitas rompendo as células ao mesmo tempo. Para que isso aconteça, os eventos celulares que são necessários para a maturação do parasita dentro do eritrócito tem que ser finamente regulada. O hormônio circadiano melatonina é o sinal que sincroniza o ciclo intraeritrocítico do *Plasmodium*.

Neste trabalho, reportamos que a sincronia observada na maioria das espécies do parasita pode ser usada por ele como meio de evadir o sistema imune do hospedeiro e assegurar a continuidade da infecção. Quando dessincronizamos o desenvolvimento do parasita *P. chabaudi* utilizando luzindol, um antagonista da melatonina, foi observado que o uso de uma dose sub-ótima do antimalárico cloroquina aumenta a sobrevida de camundongos infectados.

Reportamos também que *P. berghei*, parasita de roedor que possui uma infecção não sincronizada, não percebe o hormônio. Diferentemente do que é observado com espécies que possuem sincronia, a melatonina falhou em induzir aumento de cálcio intracelular ou sincronizar o ciclo de vida do parasita *in vitro*.

No trabalho também é relatado a construção de vetores para nocauteamento de genes em *Plasmodium*, afim de se conhecer a função das genes alvo por análise de fenótipo.

Abstract

Malaria is the most killing parasitic disease in the world. Half of the world population is at risk of contracting the disease, which kills over 1 million people, being children under 5 the most affected.

The fever periodicity is the characteristic symptom of the disease. The fever is a result of the burst of the erythrocyte when the parasite leaves the host cell to infect other ones. This event is highly synchronous, with the parasites going out of the cells at the same time. For this to happen, the cellular events that are necessary for parasite growth have to be very well regulated. The circadian hormone melatonin is the signal that synchronizes the intraerythrocytic cycle of *Plasmodium*.

In this work, we report that this synchrony, observed in the majority of the parasite's species, could be used as a way to evade the immune system, assuring the continuity of the infection. When we disrupt this synchrony with luzindole, a melatonin antagonist, we observe that a suboptimal dose of the antimalarial chloroquine increases the survival of the infected mice.

We also report that *P. berghei*, rodent parasite that possess and unsynchronized infection, can't perceive the hormone. Unlike what is observed in species that have a synchronous infection, melatonin fail to induce intracellular calcium increase or promote cell cycle synchronization *in vitro*.

Here we also report the construction of knockout vector for *Plasmodium*, to be used to investigate the functions of the target genes by phenotype analysis.

Anexos

Em anexo, artigos publicados durante a realização deste doutoramento e artigos no prelo

Review

Calcium signaling in lizard red blood cells [☆]

Piero Bagnaresi ^a, Miguel T. Rodrigues ^b, Célia R.S. Garcia ^{a,*}

^a *Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

^b *Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Received 9 May 2006; received in revised form 21 September 2006; accepted 25 September 2006

Available online 3 October 2006

Abstract

The ion calcium is a ubiquitous second messenger, present in all eukaryotic cells. It modulates a vast number of cellular events, such as cell division and differentiation, fertilization, cell volume, decodification of external stimuli. To process this variety of information, the cells display a number of calcium pools, which are capable of mobilization for signaling purposes. Here we review the calcium signaling on lizards red blood cells, an interesting model that has been receiving an increasing notice recently. These cells possess a complex machinery to regulate calcium, and display calcium responses to extracellular agonists. Interestingly, the pattern of calcium handling and response are divergent in different lizard families, which enforces the morphological data to their phylogenetic classification, and suggest the radiation of different calcium signaling models in lizards evolution.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Ca^{2+} homeostasis; Red blood cells; Lizards; IP_3 receptors; Ryanodine receptors; Purinoceptors; Intracellular messengers

Contents

1. Calcium handling mechanisms in lizards' RBCs	781
2. Acidic pools	782
3. Participation of mitochondria in calcium homeostasis in lizards, RBCs	784
4. Purinoceptors: perceiving extracellular messages	784
5. Second messengers in RBC calcium signaling	785
Acknowledgements	785
References	785

Understanding the basic mechanism of Ca^{2+} homeostasis and role of the different organelles, at rest and during cell stimulation, is a prerequisite to understand the modulation of a large

variety of physiological events requiring changes in intracellular Ca^{2+} concentration. In this review we will deal primarily with the mechanism of Ca^{2+} handling in the red blood cells (RBCs) of lizards, an interesting model system that has received much attention over the last years by comparative physiologists.

Before entering a detailed description of Ca^{2+} homeostasis in lizard RBCs, we summarize a few general concepts, primarily derived from work on mammalian cells. By necessity this summary is incomplete and the interested reader is referred to the numerous recent reviews published on the topic (Rizzuto and Pozzan, 2006).

All eukaryotic cells display several mechanisms to control and operate calcium, maintaining an important difference between

[☆] This paper is part of the 3rd special issue of CBP dedicated to The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology organized by Marcelo Hermes-Lima (Brazil) and co-edited by Carlos Navas (Brazil), Rene Belebony (Brazil), Rodrigo Stabelli (Brazil), Tania Zenteno-Savín (Mexico) and the editors of CBP. This issue is dedicated to the memory of two exceptional men, Peter L. Lutz, one of the pioneers of comparative and integrative physiology, and Cicero Lima, journalist, science lover and Hermes-Lima's dad.

* Corresponding author. Rua do Matão, travessa 14, 321. CEP 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel./fax: +55 11 30917518.

E-mail address: cgarcia@usp.br (C.R.S. Garcia).

extra and intracellular calcium concentrations (Fig. 1). Those concentrations differ by over 4 orders of magnitude, i.e. around 10^{-7} M/ 10^{-8} M in the cytosol and 10^{-3} M/ 10^{-2} M in the extracellular medium. It has been suggested that very early on during evolution cells developed mechanisms to keep the cytosolic Ca^{2+} concentrations lower than in the extracellular medium because Ca^{2+} has the tendency to form insoluble precipitates with phosphate, which is very abundant in the cytosol. Indeed, the other most abundant divalent cation, Mg^{2+} , is not regulated at very different levels inside and outside the cell (1 mM) possibly because it does not form insoluble complexes with phosphate in the physiological concentration range.

In order to maintain the Ca^{2+} gradient across the plasma membrane, cells have developed several mechanisms to extrude Ca^{2+} from the cytosol such as the plasma membrane Ca^{2+} ATPases (PMCA), which actively pump Ca^{2+} out across the plasma membrane at the expense of ATP hydrolysis and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (and the Na^+/K^+) exchangers, antiporters that exchange Ca^{2+} at the expense of the gradients of monovalent ions and of the membrane potential (they are in fact electrogenic, $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). The PMCA are known to be regulated not only by Ca^{2+} concentration, but also by the Ca^{2+} -binding protein, calmodulin (Carafoli et al., 1996).

Within the cytosol, several proteins act as Ca^{2+} buffers. The best known among these cytosolic Ca^{2+} buffers are: calmodulin (which also controls a multitude of biological processes when it

binds to different protein targets), parvalbumin, calbindin and calretinin (Baimbridge et al., 1992).

Ca^{2+} entry into the cells is mediated by a variety of channels in the plasma membrane which can be grouped according to their gating mechanism, as follows: 1 — voltage-operated channels, activated by membrane depolarization (Mori et al., 1993); 2 — receptor-operated channels which open in response to binding of the agonists; and 3 — second messenger-operated channels, which open in response to the change in concentration of a second messenger within the cells (e.g. cyclic nucleotides, diacylglycerol, etc) and finally 4 — a still largely mysterious group of channels, operationally defined as store-operated channels, that open in response to a decrease of Ca^{2+} within the endoplasmic reticulum with a mechanism called capacitative calcium entry (Putney and Bird, 1994). The molecular mechanism of regulation of these channels is still unknown.

The endoplasmic reticulum plays a central role in the management of calcium in eukaryotic cells, being involved in the transient release and re-uptake of Ca^{2+} (Meldolesi and Pozzan, 1998a,b). This organelle is a network of interlinked membranous tubules and cisternae, spread throughout the cell (Park et al., 2000). A sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) pumps Ca^{2+} into the ER lumen utilizing the energy derived from ATP hydrolysis. The enzyme is highly conserved among species and its cycle has been extensively studied since 1970 (see Wolosker and de Meis, 1995). Like the PMCA, the SERCA

Fig. 1. Calcium handling mechanisms present in eukaryotic cells. The red rectangle represents the mitochondrion, the green oval represents the endoplasmic reticulum, and the yellow hexagon represents an acidic pool. On the plasma membrane, PMCA, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, a calcium channel and a GPCR, responsible for cellular stimulus. In the ER, SERCA pumps calcium to the lumen of the organelle, and this store can be mobilized by IP_3 or ryanodine receptors. In the mitochondrion, Ca^{2+} uniporter and RaM are responsible for the filling of the store. In the acidic pools, the H^+ gradient are required to calcium storage. Calcium can be mobilized from internal stores by second messengers like IP_3 , for example, generated by phospholipase C (PLC) activation via G-protein-coupled receptors (GPCR).

pump has a phosphorylated, acyl-phosphate acid-stable intermediate (E-P) in its cycle (Mathiasen et al., 1993).

A higher density of the SERCA pump was one of the solutions found during evolution to keep up with requirements for a higher rate of Ca^{2+} cycling into and out of the sarcoplasmic reticulum of certain types of muscles which operate at high frequency. One such muscle is found in sonic fibers of the toadfish swimbladder, where Ca^{2+} uptake by SERCA is 50-fold greater than in red fibers (Davis et al., 1997). Another example may be found in the special noise-making muscles rattlesnakes use to warn off predators. The rate at which these muscles function indicates that they might possess features in common with the toadfish swimbladder sonic muscle. These adaptations require an increase in the surface area of the ER as well as in the density of the pump (Davis et al., 1997).

The amount of Ca^{2+} in the ER is a matter of debate. By measuring Ca^{2+} with GFP targeted to specific intracellular organelles, Miyawaki et al. (1997) calculated basal Ca^{2+} concentrations ranging from 60 to 400 μM in the ER. This value is in the middle of previous estimates, which range from 1 to 2000 μM based on Mag-Indo-1, a compartmentalized low-affinity Ca^{2+} indicator (Tse et al., 1994), when measurements of free Ca^{2+} in intact, non-permeabilized cells either with the Ca^{2+} -sensitive photoprotein aequorin engineered to target the ER (Montero et al., 1995), or with the recombinant apoaquorin (Kendall et al., 1996; Bygrave and Benedetti, 1996).

Several proteins can act as Ca^{2+} -binding factors either in the lumen of the endoplasmic or sarcoplasmic reticulum or in the cytosol. Among them are: 1 — calsequestrin (MacLennan and Wong, 1971; Beard et al., 2004) and 2 — calreticulin, which binds Ca^{2+} in the mM range (Fliegel et al., 1989; Gelebart et al., 2005).

The endoplasmic and sarcoplasmic reticulum compartments release stored Ca^{2+} through two families of channels that are structurally and functionally similar, the IP_3 receptors and ryanodine receptors.

1 — *IP_3 receptors*: multiple subtypes of IP_3 receptors ($\text{IP}_3\text{R-1}$, -2 and -3) are expressed in different living systems and implicated in signaling multifarious processes (Berridge, 1993) such as encystment of dinoflagellates (Tsim et al., 1997, 1998), and olfactory transduction in *Drosophila melanogaster* (Yoshikawa et al., 1992; Vazquez-Martinez et al., 2003) and in the catfish *Ictalurus punctatus* (Restrepo et al., 1990; Fabbri et al., 1999), and can induce Ca^{2+} release in *Plasmodium* (Passos and Garcia, 1998). These receptors are homotetramers (Taylor et al., 1999), composed of subunits of 310 kDa with a highly conserved primary structure among widely divergent organisms.

Calcium is released through this intracellular channel when hormones and neurotransmitters coupled to G-protein-linked or tyrosine kinase-linked receptors activate $\text{PLC}\beta$ or $\text{PLC}\gamma$ respectively (Berridge, 1993). The phospholipase then hydrolyzes phosphatidylinositol, generating IP_3 . This second messenger diffuses and binds to its receptor in the endoplasmic or sarcoplasmic reticulum, thus releasing Ca^{2+} . Calcium release by IP_3 is modulated by Ca^{2+} itself. This modulation shows a bell-shaped curve (Bezprozvanny et al., 1991): the receptor is activated by Ca^{2+} up to 300 nM, while higher concentrations

inhibit the channel. This Ca^{2+} dependence of IP_3 receptors is important for the generation of temporal oscillations and propagating waves (Berridge et al., 1988; Berridge, 1990; Petersen and Wakui, 1990; Tsien and Tsien, 1990; Berridge and Moreton, 1991; Meyer, 1991; Thomas et al., 1996; Weissman et al., 2004; Isshiki et al., 2004; Stuyvers et al., 2005). A recently reported new indicator will certainly lead to advances in understanding the role of repetitive Ca^{2+} spikes. A modified version of IP_3 that is membrane permeant and photoactivatable is able to elicit the release of intracellular Ca^{2+} pools in a controlled process (Li et al., 1998). The authors concluded that cells might decode Ca^{2+} signaling by the activation of gene expression.

In this regard, Oancea and Meyer (1998) reported that the temporal coordination of Ca^{2+} and diacylglycerol signals relies on protein kinase C.

Other molecules have been reported to modulate IP_3 channel activity. In rat hepatocytes the IP_3 channel is inactivated by IP_3 itself (Hajnoczky and Thomas, 1994).

2 — *Ryanodine receptors*: This family of receptors contains tetramers of 560 kDa subunits. The existence of ryanodine receptors was first reported in skeletal muscle and they were later found to be expressed in brain and in cardiac and smooth muscles. In skeletal muscles, when the neurotransmitter acetylcholine binds to the muscarinic receptors, it depolarizes the sarcolemma. The voltage change in the membrane is sensed by the dihydropyridine receptors, which are structurally and functionally coupled to ryanodine receptors in the sarcoplasmic reticulum. There is strong evidence for the physical interaction between these two receptors. A change in the conformation of the ryanodine receptors is thought to open the channel, thus resulting in Ca^{2+} release (Dulhunty et al., 2002).

Cyclic ADP ribose was also shown to release calcium in some systems (Galione and White, 1994). This second messenger is synthesized from NAD^+ (nicotinamide adenine dinucleotide).

Other organelles, besides the endoplasmic reticulum also play a role in Ca^{2+} homeostasis. In particular, it has been shown that within microdomains, mitochondria can sense the Ca^{2+} release by IP_3 receptors in the endoplasmic reticulum and therefore store it transiently (Rizzuto et al., 1993). By directly monitoring Ca^{2+} in the lumen of Golgi apparatus of HeLa cells using the specifically targeted Ca^{2+} -sensitive protein aequorin, Pinton et al. (1998) found that the Golgi apparatus releases Ca^{2+} upon stimulation with histamine, an agonist coupled to IP_3 . A Ca^{2+} pool in the acidic compartment in rat pancreatic acinar cells (Thevenod et al., 1989) and in rat parotid glands (1988) that is sensitive to IP_3 has been reported.

1. Calcium handling mechanisms in lizards' RBCs

Lizards' RBCs are an interesting model to study cellular biology, as these cells possess nucleus and membranous organelles, present in the majority of the organisms' erythrocytes, as only the mammals' erythrocytes lose its nucleus and organelles in the maturation process. Lizards are presently admitted as a paraphyletic group of the monophyletic Squamata. Two main squamate lineages are presently admitted. The Iguania, visually oriented and presenting the typical lizard

Fig. 2. Phylogeny of selected families (modified from Pough et al., 1998).

body pattern assembles several families like Iguanidae and Tropiduridae. The chemical oriented Scleroglossa is much more diverse and besides lizards with the typical body form like the Teiidae, includes a highly diverse array of lizards showing varied levels of body elongation and limb reduction, and all snakes and amphisbaenians (Fig. 2). Investigating the calcium handling mechanism in selected lizards families (Iguanidae, Tropiduridae and Teiidae), we found and encountered evidence for different patterns in RBCs signaling that could be due to this basal dichotomy in squamate radiation.

Using the fluorescent calcium probe Fluo-3 AM, we were able to measure intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) in red blood cells (RBC) in Teiidae, Iguanidae and Tropiduridae. By using this method, described comprehensively in Beraldo et al. (2001), we have demonstrated that these cells possess membrane bound calcium pools, and display machinery to control its intracellular calcium concentration. We have found in Teiidae that these cells maintain a nanomolar $[Ca^{2+}]_i$ against a

extracellular $[Ca^{2+}]$ of 1 mM, being 20 nM ($n=3$) and 17 nM ($n=7$) for *Tupinambis merianae* and *Ameiva ameiva*, respectively (Beraldo et al., 2001). In the Tropiduridae, $[Ca^{2+}]_i$ was 51.2 ± 1.7 nM ($n=18$) in *Tropidurus torquatus* (Beraldo and Garcia, unpublished) and 38.8 ± 8.1 nM ($n=14$) in the Iguanid *Iguana iguana*. This values are similar to what it is estimated for other RBCs. The RBCs of all these species possess a sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), denoted by the increase in $[Ca^{2+}]_i$ in response to 5 μ M thapsigargin, a SERCA inhibitor, in the presence and in the absence of extracellular calcium. The addition of 5 μ M of the inhibitor promotes a 23 nM ($n=3$) increase in $[Ca^{2+}]_i$ of *A. ameiva* RBCs and a 26 nM ($n=3$) increase in *T. merianae*, when incubated in 1 mM calcium medium. The response for thapsigargin when added to RBCs in calcium free medium was of similar amplitude, but of shorter duration (Beraldo et al., 2001). *T. torquatus* and *I. iguana* display akin increases in $[Ca^{2+}]_i$ by the addition of thapsigargin, of 18.1 ± 2.1 nM ($n=6$) and 13.7 ± 3.5 nM ($n=3$) (Fig. 3A) respectively, in the presence of 1 mM calcium medium. When the drug was added to the cells in calcium free medium, the results were familiar with those encountered in the teiids studied, with similar amplitude and shorter duration (Fig. 3C) (Beraldo and Garcia, unpublished, for *T. torquatus*).

2. Acidic pools

Besides the ER, other pools can participate in calcium homeostasis of lizards' RBCs. Acidic pools can contribute in calcium storage and mobilization, in a plethora of organisms,

Fig. 3. A–C. Calcium mobilization in Fluo-3 labeled RBCs of *Iguana iguana*. A) Addition of thapsigargin (THG, 5 μ M) and monensin (MON, 25 μ M), in 1 mM calcium medium. B) Addition of MON (25 μ M) and THG (5 μ M), in 1 mM calcium medium. C) Addition of THG (5 μ M) and MON (25 μ M) in a calcium free medium. D–F. Confocal microscopy. Lysosensor Green DND-189 labeled RBCs of *I. iguana*. D) Phase contrast image. E) Fluorescence image. F) Overlay of images A and B.

including bacteria (Seufferheld et al., 2003), malarial parasites (Garcia et al., 1998; Garcia, 1999; Hotta et al., 2000; Varotti et al., 2003; Gazarini et al., 2003; Beraldo et al., 2005), *Toxoplasma gondii*, trypanosomatids, fungi and algae (Docampo and Moreno, 2001). Using ionophores to disrupt the protonic gradient required for these pools to store the ion, we have shown that in the teiids *A. ameiva* and *T. merianae* these pools play an important role. Monensin (25 μM), a Na^+/H^+ ionophore, discharge a 25 nM ($n=5$) increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of RBCs of *A. ameiva* (Fig. 4) and a 31 nM ($n=3$) increase for *T. merianae*, in the presence of extracellular calcium. The K^+/H^+ ionophore nigericin (1 μM) also was able to promote an elevation in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of RBCs of both lizards — 27 nM ($n=3$)

Fig. 4. Confocal microscopy of intact RBCs from the lizard *Ameiva ameiva* incubated with the dye acridine orange. (A) Phase contrast. (B) Fluorescence of RBCs before the addition of monensin (50 μM). (C) Fluorescence after treatment with monensin (50 μM). (D) Fluorescence intensity vs. time after the addition of monensin (from Beraldo et al., 2002).

Fig. 5. Confocal microscopy of intact RBCs from the lizard *Ameiva ameiva* incubated with the dye acridine orange. (A) Phase contrast. (B) Fluorescence of RBCs before addition of nigericin showing that the dye fluorescence is localized either in the nucleus region and in numerous vesicles throughout the cytosol. (C) Fluorescence after treatment with nigericin (20 μM). (D) Fluorescence intensity vs. time after addition of nigericin. The inset indicates the cell region that corresponds to the fluorescence intensity in the graphic. Condition as in Fig. 4 (from Beraldo et al., 2002).

(Fig. 5) and 27 nM ($n=4$), respectively. When those additions were made on RBCs in a calcium free medium, the same pattern of responses was observed, showing that the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was due to internal calcium pools mobilization, and not to cation influx from extracellular medium. Inhibition of the H^+ -pump by NDB-Cl and of the vacuolar H^+ -ATPase by Bafilomycin A1 also promotes a calcium response of the same magnitude as the ionophores, showing that they are truly capable of disrupting the protonic gradient, affecting the acidic pools (Beraldo et al., 2001).

Interestingly, we have encountered evidence that acidic pools do not play a role in calcium homeostasis in RBCs of *I. iguana* and *T. torquatus*. Addition of Ca^{2+} ionophores promote an increase in Fluo-3 labeled RBCs of these two lizards (Fig. 3B for *I. iguana*), although the addition of either monensin (25 μM)

(Fig. 3C) or nigericin (1 μM), in a calcium free medium, does not promote any calcium response, which shows that the fluorescence increase mediated by these drugs were due to calcium influx, and not due to mobilization of internal calcium stores. However, the presence of acidic pools were confirmed by confocal microscopy using acridine orange, a pH indicator, for *T. torquatus* (unpublished, Beraldo and Garcia) and Lysosensor Green DND-189 for *I. iguana* (Fig. 3D–F), demonstrating that the acidic pools are present, but do not play a role in the calcium handling mechanisms in these cells. Although our data are taxonomically restricted to very few squamate families, the striking difference observed between *Scleroglossa* (*A. ameiva* and *T. merianae*) and *Iguania* (*I. iguana* and *T. torquatus*) needs further investigation.

3. Participation of mitochondria in calcium homeostasis in lizards, RBCs

The mitochondrion is another organelle that can store calcium. Nowadays, the organelle has been seen as an important and dynamic calcium pool (Pozzan et al., 2000). The calcium uptake, by mitochondrial potential generated by the electron transport chain, is mainly controlled by the calcium uniporter, besides the contribution of a high affinity transporter, RaM, which participates in cytoplasmic calcium pulses (Gunter et al., 1998). The organelle was investigated in *T. torquatus* erythrocytes. Using the mitochondrial probe Mito Fluor Green and the mitochondrial calcium indicator Rhod-2 AM, we were able to localize this organelle around the cells nucleus. This perinuclear location is similar to what it is encountered for other nucleated

erythrocytes (Moyes et al., 2002). By using uncoupling drugs – antimycin A (5 ng/ml), FCCP (25 μM) and oligomycin (0.01 ng/ml) – we are able to show the role of this store on calcium homeostasis (Beraldo and Garcia, unpublished). By measuring cytoplasmic and mitochondrial calcium simultaneously, a temporal correlation is observed, showing an increase in mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$. The interplay between the mitochondria and ER was first demonstrated by Rizzuto et al. (1993).

4. Purinoceptors: perceiving extracellular messages

The next step was to investigate if those intracellular calcium pools were able to be discharged by membrane receptor stimulation. Purinergic receptors have a major role in mammalian cells, coupling to different signal transductions pathways, including the IP_3 pathway, which mobilizes calcium from internal stores, and their presence is noticed in lizards and snakes (Knight and Burnstock, 2001, 1995). Purinergic agonists have a important role in signaling on nucleated RBCs like volume control in *Necturus* (Light et al., 1999, 2003), activation of transduction pathways in turkey (Berrie et al., 1989; Galas and Harden, 1995). These types of receptors were already described in other nucleated RBCs, as well as in wide spectrum of organisms (for review, see Burnstock, 1996). The purinoceptors are divided into two major groups: P1 and P2. The P1 group binds only to adenosine, whereas the latter binds also to ATP, ADP, UTP, UDP, adenosine polyphosphates, among other, like GTP. The P2 family is classified in P2X, where all members are ionic channels, and P2Y, where all members are G-protein-linked receptors (GPCRs) (for review, Ralevic and Burnstock, 1998).

Fig. 6. Effects of purinergic agonists in Fluo-3 labeled RBCs of *I. iguana*. A) Addition of ATP (50 μM) in a 1 mM calcium medium and calcium free medium. B) Addition of UTP (50 μM) in a 1 mM calcium medium and calcium free medium. C) Addition of GTP (50 μM) in a 1 mM calcium medium and calcium free medium. D) Addition of ionomycin (ION, 10 μM) after ATP (50 μM) addition, in a calcium free medium. This last experiment shows that intracellular stores were capable of ion mobilization.

We have demonstrated that the teiid lizards *A. ameiva* and *T. merianae* possess P2Y receptor, since the addition of 50 μM of ATP elicits a 180 ± 23 nM ($n=4$) and 233 ± 11 nM ($n=4$) increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, respectively, and this response was not extinct when the experiment was performed in a calcium free medium supplemented with Ca^{2+} chelator, EGTA. This evidence shows that the increase in calcium concentration was not due to ionic influx, discarding the possibility for these cells to display P2X purinoceptors (Beraldo et al., 2001). In *A. ameiva* RBCs, a pharmacological characterization of the purinoceptor, evidenced a P2Y₄-like receptor, since UTP, UDP, GTP, ATP γ S evoked a dose-dependent calcium response, and 2MeSATP, 2ClATP, α , β -ATP and ADP failed to promote a elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Sartorello and Garcia, 2005).

In the *I. iguana* and *T. torquatus*, ATP (50 μM), and also UTP (50 μM) and GTP (50 μM), elicits a calcium response, but only when the experiment is carried out in a 1 mM Ca^{2+} medium. For *I. iguana*, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was raised 20.2 ± 1.8 nM ($n=3$), 24.7 ± 2.9 nM ($n=3$) and 21.6 ± 1.7 nM ($n=3$), correspondingly (Fig. 6A–C). *T. torquatus* presents the same behavior, with $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation of 28.2 ± 5.2 nM ($n=4$) for 50 μM UTP addition and 35.8 ± 3.2 nM ($n=4$) for 50 μM GTP addition, in a 1 mM calcium medium (Beraldo and Garcia, unpublished). When the addition of the same drugs was carried out in the absence of extracellular calcium and with EGTA supplementation, no response was detected. Further addition of 10 μM of ionomycin, in both cases, promotes augmentation in Fluo-3 fluorescence, showing that the calcium stores were intact and capable of mobilization (Fig. 6D). This data suggest that RBCs from these two lizards display a P2X-like purinoceptor, and the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promoted by purinergic agonists is due to cationic influx by a ionic channel.

The divergence on RBC's calcium handling mechanisms encountered between these the representative examples of Iguania and Scleroglossa studied suggests that this machinery appeared separately along their evolution.

5. Second messengers in RBC calcium signaling

It is known that purinoceptors coupled to G-proteins can activate the PLC–IP₃ pathway in cells, and this pathway was already demonstrated in turkey nucleated erythrocytes. In these cells, a P2Y purinoceptor is responsible for IP₃ generation by PLC activation (Berrie et al., 1989; Galas and Harden, 1996). In *A. ameiva* RBCs, we have immunolocalized IP₃ receptors, using a polyclonal antibody. These receptors were located in the central region of the cell. This location is consistent with the ER, since the nucleus membrane is an extension of the ER (Beraldo et al., 2002). We investigated if IP₃ could mobilize internal calcium pools. Adding 6.6 μM of the second messenger to permeabilized *A. ameiva* RBCs in a 1 mM Ca^{2+} medium, we found a 10.2 ± 1 nM ($n=3$) increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A posterior administration of thapsigargin showed that the store did not deplete completely. Analysis of the addition of monensin, prior and after the addition of IP₃, showed that acidic pools are not affected by the second messenger (Beraldo et al., 2002). When the calcium stores — IP₃ sensitive were depleted by means of a stepwise addition of the second messenger to a

maximum concentration of 30 μM , the addition of thapsigargin does not elicit a calcium response, and following the addition of monensin promotes a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase of the same magnitude that was reported in the previous assays. This set of data shows that the pool depleted by the second messenger was the ER, and the acidic stores do not participate in the IP₃ response in these cells.

Acknowledgements

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) for funding CRSG and for fellowship to PB. Some of the lizards used in this study were kindly provided by Miguel T. Rodrigues.

References

- Baimbridge, K.G., Celio, M.R., Rogers, J.H., 1992. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15, 303–308.
- Beard, N.A., Laver, D.R., Dulhunty, A.F., 2004. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 85, 33–69.
- Beraldo, F.H., Sartorello, R., Lanari, R.D., Garcia, C.R., 2001. Signal transduction in red blood cells of the lizards *Ameiva ameiva* and *Tupinambis merianae* (Squamata, Teiidae). *Cell Calcium* 29, 439–445.
- Beraldo, F.H., Sartorello, R., Gazzerini, M.L., Caldeira, W., Garcia, C.R., 2002. Red blood cells of the lizards *Ameiva ameiva* (Squamata, Teiidae) display multiple mechanisms to control cytosolic calcium. *Cell Calcium* 31, 79–87.
- Beraldo, F.H., Almeida, F.M., da Silva, A.M., Garcia, C.R., 2005. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J. Cell Biol.* 170, 551–557.
- Berridge, M.J., 1990. Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 265, 9583–9586.
- Berridge, M.J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315–325.
- Berridge, M.J., Moreton, R.B., 1991. Calcium waves and spirals. *Curr. Biol.* 1, 296–297.
- Berridge, M.J., Cobbold, P.H., Cuthbertson, K.S., 1988. Spatial and temporal aspects of cell signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 320, 325–343.
- Berrie, C.P., Hawkins, P.T., Stephens, L.R., Harden, T.K., Downes, C.P., 1989. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in turkey erythrocytes is regulated by P2y purinoceptors. *Mol. Pharmacol.* 35, 526–532.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., Ehrlich, B.E., 1991. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351, 751–754.
- Burnstock, G., 1996. Purinoceptors: ontogeny and phylogeny. *Drug Dev. Res.* 39, 204–242.
- Bygrave, F.L., Benedetti, A., 1996. What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell Calcium* 19, 547–551.
- Carafoli, E., Garcia-Martin, E., Guerini, D., 1996. The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. *Experientia* 52, 1091–1100.
- Davis, R., Burggren, W., French, K., 1997. *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. W. H. Freeman and Co., New York.
- Docampo, R., Moreno, S.N., 2001. The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114, 151–159.
- Dulhunty, A.F., Haarmann, C.S., Green, D., Laver, D.R., Board, P.G., Casarotto, M.G., 2002. Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 79, 45–75.
- Fabbri, E., Buzzi, M., Biondi, C., Capuzzo, A., 1999. Alpha-adrenoceptor-mediated glucose release from perfused catfish hepatocytes. *Life Sci.* 65, 27–35.
- Fliegel, L., Burns, K., MacLennan, D.H., Reithmeier, R.A., Michalak, M., 1989. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264, 21522–21528.

- Galas, M.C., Harden, T.K., 1995. Receptor-induced heterologous desensitization of receptor-regulated phospholipase C. *Eur. J. Pharmacol.* 291, 175–182.
- Galas, M.C., Harden, T.K., 1996. Cyclic AMP-induced desensitization of G-protein-regulated phospholipase C in turkey erythrocyte membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 314, 157–164.
- Galione, A., White, A., 1994. Ca^{2+} release induced by cyclic ADP-ribose. *Trends Cell Biol.* 4, 431–436.
- Garcia, C.R., 1999. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol. Today* 15, 488–491.
- Garcia, C.R., Ann, S.E., Tavares, E.S., Dluzewski, A.R., Mason, W.T., Paiva, F.B., 1998. Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur. J. Cell Biol.* 76, 133–138.
- Gazarini, M.L., Thomas, A.P., Pozzan, T., Garcia, C.R., 2003. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J. Cell Biol.* 161, 103–110.
- Gelebart, P., Opas, M., Michalak, M., 2005. Calreticulin, a Ca^{2+} -binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 260–266.
- Gunter, T.E., Buntinas, L., Sparagna, G.C., Gunter, K.K., 1998. The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 5–15.
- Hajnóczky, G., Thomas, A.P., 1994. The inositol trisphosphate calcium channel is inactivated by inositol trisphosphate. *Nature* 370, 474–477.
- Hotta, C.T., Gazarini, M.L., Beraldo, F.H., Varotti, F.P., Lopes, C., Markus, R.P., Pozzan, T., Garcia, C.R., 2000. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat. cell Biol.* 2, 466–468.
- Isshiki, M., Mutoh, A., Fujita, T., 2004. Subcortical Ca^{2+} waves sneaking under the plasma membrane in endothelial cells. *Circ. Res.* 95, e11–e21.
- Kendall, J.M., Badminton, M.N., Sala-Newby, G.B., Campbell, A.K., Rembold, C.M., 1996. Recombinant apoaequorin acting as a pseudo-luciferase reports micromolar changes in the endoplasmic reticulum free Ca^{2+} of intact cells. *Biochem. J.* 318 (Pt 2), 383–387.
- Knight, G.E., Burnstock, G., 1995. Responses of the aorta of the garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*) to purines. *Br. J. Pharmacol.* 114, 41–48.
- Knight, G.E., Burnstock, G., 2001. Identification of P1 and P2 purinoceptors in the aorta of the lizard (*Agama sp.*). *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 128, 413–423.
- Li, W., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G., Tsien, R.Y., 1998. Cell-permeant caged InsP_3 ester shows that Ca^{2+} spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 392, 936–941.
- Light, D.B., Capes, T.L., Gronau, R.T., Adler, M.R., 1999. Extracellular ATP stimulates volume decrease in *Necturus* red blood cells. *Am. J. Physiol.* 277, C480–C491.
- Light, D.B., Attwood, A.J., Siegel, C., Baumann, N.L., 2003. Cell swelling increases intracellular calcium in *Necturus* erythrocytes. *J. Cell Sci.* 116, 101–109.
- MacLennan, D.H., Wong, P.T., 1971. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 1231–1235.
- Mathiasen, D., Rossum, L.M., Robinson, I.M., Burgoyne, R.D., East, J.M., Møller, M., Rasmussen, H.N., Treiman, M., 1993. Isolation of chromaffin cell thapsigargin-sensitive Ca^{2+} store in light microsomes from bovine adrenal medulla. *Int. J. Biochem.* 25, 641–652.
- Meldolesi, J., Pozzan, T., 1998a. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* 23, 10–14.
- Meldolesi, J., Pozzan, T., 1998b. The heterogeneity of ER Ca^{2+} stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. *J. Cell Biol.* 142, 1395–1398.
- Meyer, T., 1991. Cell signaling by second messenger waves. *Cell* 64, 675–678.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., Tsien, R.Y., 1997. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882–887.
- Montero, M., Brini, M., Marsault, R., Alvarez, J., Sitia, R., Pozzan, T., Rizzuto, R., 1995. Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J.* 14, 5467–5475.
- Mori, Y., Matsubara, H., Folco, E., Siegel, A., Koren, G., 1993. The transcription of a mammalian voltage-gated potassium channel is regulated by cAMP in a cell-specific manner. *J. Biol. Chem.* 268, 26482–26493.
- Moyes, C.D., Sharma, M.L., Lyons, C., Leary, S.C., Leon, M., Petrie, A., Lund, S.G., Tufts, B.L., 2002. Origins and consequences of mitochondrial decline in nucleated erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1591, 11–20.
- Oancea, E., Meyer, T., 1998. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 95, 307–318.
- Park, M.K., Petersen, O.H., Tepikin, A.V., 2000. The endoplasmic reticulum as one continuous Ca^{2+} pool: visualization of rapid Ca^{2+} movements and equilibration. *EMBO J.* 19, 5729–5739.
- Passos, A.P., Garcia, C.R., 1998. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca^{2+} release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 155–160.
- Petersen, O.H., Wakui, M., 1990. Oscillating intracellular Ca^{2+} signals evoked by activation of receptors linked to inositol lipid hydrolysis: mechanism of generation. *J. Membr. Biol.* 118, 93–105.
- Pinton, P., Pozzan, T., Rizzuto, R., 1998. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 17, 5298–5308.
- Pozzan, T., Magalhaes, P., Rizzuto, R., 2000. The comeback of mitochondria to calcium signalling. *Cell Calcium* 28, 279–283.
- Pough, F.H., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitzky, A.H., Wells, K.D., 1998. *Herpetology*. Prentice Hall, New Jersey.
- Putney Jr., J.W., Bird, G.S., 1994. The inositol phosphate–calcium signalling system in lacrimal gland cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 350, 115–119.
- Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.
- Restrepo, D., Miyamoto, T., Bryant, B.P., Teeter, J.H., 1990. Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel catfish. *Science* 249, 1166–1168.
- Rizzuto, R., Pozzan, T., 2006. Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* 86, 369–408.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T., 1993. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744–747.
- Sartorello, R., Garcia, C.R., 2005. Activation of a P_2Y_4 -like purinoceptor triggers an increase in cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ in the red blood cells of the lizard *Ameiva ameiva* (Squamata, Teiidae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 5–10.
- Seufferheld, M., Vieira, M.C., Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O., Moreno, S.N., Docampo, R., 2003. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 278, 29971–29978.
- Stuyvers, B.D., Dun, W., Matkovich, S., Sorrentino, V., Boyden, P.A., ter Keurs, H.E., 2005. Ca^{2+} sparks and waves in canine purkinje cells: a triple layered system of Ca^{2+} activation. *Circ. Res.* 97, 35–43.
- Taylor, C.W., Genazzani, A.A., Morris, S.A., 1999. Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 26, 237–251.
- Thevenod, F., Dehlinger-Kremer, M., Kemmer, T.P., Christian, A.L., Potter, B.V., Schulz, I., 1989. Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive (IsCaP) and -insensitive (IisCaP) nonmitochondrial Ca^{2+} pools in rat pancreatic acinar cells. *J. Membr. Biol.* 109, 173–186.
- Thomas, A.P., Bird, G.S., Hajnoczky, G., Robb-Gaspers, L.D., Putney Jr., J.W., 1996. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.* 10, 1505–1517.
- Tse, F.W., Tse, A., Hille, B., 1994. Cyclic Ca^{2+} changes in intracellular stores of gonadotropes during gonadotropin-releasing hormone-stimulated Ca^{2+} oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9750–9754.
- Tsien, R.W., Tsien, R.Y., 1990. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 715–760.
- Tsim, S.T., Wong, J.T., Wong, Y.H., 1997. Calcium ion dependency and the role of inositol phosphates in melatonin-induced encystment of dinoflagellates. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 12), 1387–1393.
- Tsim, S.T., Wong, J.T., Wong, Y.H., 1998. Regulation of calcium influx and phospholipase C activity by indoleamines in dinoflagellate *Cryptophycinium cohnii*. *J. Pineal Res.* 24, 152–161.
- Varotti, F.P., Beraldo, F.H., Gazarini, M.L., Garcia, C.R., 2003. Plasmodium falciparum malaria parasites display a THG-sensitive Ca^{2+} pool. *Cell Calcium* 33, 137–144.

- Vazquez-Martinez, O., Canedo-Merino, R., Diaz-Munoz, M., Riesgo-Escovar, J.R., 2003. Biochemical characterization, distribution and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* ryanodine and IP3 receptors, and thapsigargin-sensitive Ca²⁺ ATPase. *J. Cell Sci.* 116, 2483–2494.
- Weissman, T.A., Riquelme, P.A., Ivic, L., Flint, A.C., Kriegstein, A.R., 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* 43, 647–661.
- Wolosker, H., de Meis, L., 1995. Ligand-gated channel of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase. *Biosci. Rep.* 15, 365–376.
- Yoshikawa, S., Tanimura, T., Miyawaki, A., Nakamura, M., Yuzaki, M., Furuichi, T., Mikoshiba, K., 1992. Molecular cloning and characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 267, 16613–16619.

Desynchronizing *Plasmodium* Cell Cycle Increases Chloroquine Protection at Suboptimal Doses

Piero Bagnaresi¹, Regina P. Markus¹, Carlos T. Hotta¹, Tulio Pozzan² and Célia R.S. Garcia^{*,1}

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Biomedical Sciences, Viale G. Colombo 3, 35121 Padua, Italy

Abstract: We have previously shown that *in vivo* and *in vitro* the hormone melatonin is responsible for the synchronous development of *Plasmodia*. Melatonin can also mobilize calcium from internal stores in these parasites and this response is abolished by luzindole, a melatonin antagonist. We here demonstrate that *in vivo* alteration of parasite synchronous development, using luzindole, partially improves survival of infected mice and dramatically increases the antimalarial activity of chloroquine. The data presented may lead to a conceptually new paradigm for malaria infection therapy and provide novel evidence suggesting that the malaria parasite uses the cell cycle synchrony as one of the strategies to evade the host immune system.

Keywords: Malaria, Plasmodium, Rhythm, Chloroquine.

INTRODUCTION

Malaria is still the major cause of death in the world. Recent estimates [1] show that *Plasmodium falciparum* infection still affects 515 millions of human beings, and more than 2 billions people are at risk. This number is 50% bigger than the last WHO estimates. In Africa, continent that is most impaired by the burden, severe malaria causes 10% maternal mortality [2], and malaria is the main cause of children death in Angola [3]. Though effective antimalarial therapies are available since a long time, not only the employed drugs have important toxic side effects, but over the last years *Plasmodia* strains resistant to classical treatments have evolved [4, 5].

The parasite has a complex life cycle, involving a vertebrate and a invertebrate host. In human malaria, the *Anopheles* mosquito bite delivers infective sporozoites forms that are taken by lymphatic and blood circulation [6], and reach the liver, where they invade the hepatocytes and mature into merozoites, which go back into circulation in a very particular fashion [7], avoiding the host immune system in the liver sinusoids. These forms are infective to the circulating red blood cells (RBC) (for review, see [8]). Once invaded, these RBCs are highly modified by the parasite, due to intense protein trafficking [9].

One of the most striking features of malaria in humans is its circadian rhythm, as revealed by the regularity of fever peaks, which occur with intervals multiple of 24 hours and are related to the synchronous development of the parasites within red blood cells, RBC, and the paroxysmic release of pyrogens. This in turn depends on the fact that the processes of erythrocyte rupture and new cell invasion is highly synchronous [10].

We have shown that the hormone melatonin, a known circadian marker [11] is able to synchronize the life cycle of *P. chabaudi* and *P. falciparum* *in vitro* and this effect is abolished by luzindole, a melatonin receptor antagonist [12]. The synchronism is also lost *in vivo* in pinealectomized mice (restored by melatonin administration) and upon injection in the animal of luzindole, a melatonin receptor antagonist [12].

As to the molecular mechanism of melatonin action in the parasites we have shown that melatonin can elicit an increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in *Plasmodium* trophozoites [12, 13]. A great number of articles shows the importance of calcium signaling in these parasites [12-24]. In addition, in *Plasmodium falciparum*, we have demonstrated that the melatonin-signaling pathway involves a complex crosstalk between Ca^{2+} and cAMP [15], and further activation of PKA. Proteins kinases are key components in *Plasmodium* signaling pathways [25-27], as other components of transduction pathways, such as proteases [28], which could configure new targets to chemotherapy [29, 30].

In this report we addressed the problem of the evolutionary role of synchronicity by the following approach: using the murine strain *P. chabaudi* we have tested in the live mice whether *Plasmodia* cell cycle desynchronization has any beneficial effects on the development of the disease. The data demonstrate that *in vivo* desynchronization with luzindole has a small, but detectable protective effect against *Plasmodium* toxicity, and most important it dramatically synergizes with classical antimalarial drug in protecting the animal from the infection.

MATERIAL AND METHODS

Parasites

P. chabaudi (strain AJ, clone FIP-Pc1) was maintained in Balb/C mice by transfer of infection. The procedure for collecting blood and removing platelets has been described previously by Hotta *et al.* 2000 [12].

*Address correspondence to this author at the Rua do Matão, travessa 14, n. 321. Cidade Universitária, São Paulo, Brazil, 05508-900; Tel: +55(11)30917518; Fax: +55(11)30918095; E-mail: cgarcia@usp.br

In Vivo Experiments with *P. chabaudi*

Balb/C mice were infected with 10^7 parasites in a photoperiodic regime (12hr light / 12hr dark) at day 0. Chloroquine (1 mg/Kg, 1.5mg/kg, 2mg/Kg and 3mg/Kg i.p) was administered at zeitgeber time 6 (ZT6) and luzindole at ZT12 (15mg/kg i.p.) (ZT0 corresponds to the beginning of the light phase of the daily cycle). The treatment with chloroquine and luzindole started simultaneously. Chloroquine was kept in PBS and Luzindole was diluted in 2% ETOH immediately before administration. On each day, at ZT11, blood samples were collected from tail blood to access parasitemia by counting no less than 1000 cells in Giemsa-stained blood smears. The survival rate was measured at ZT0 and ZT12.

RESULTS

Desynchronizing Plasmodium Cell Cycle Enhances the Protective Effect of Chloroquine In Vivo

Infection with *P. chabaudi* in mice is highly toxic. As shown in Fig. (1), when Balb/C mice were injected with 10^7 parasites, all animals were dead in 7 days. On the contrary, all animal survived the infection when they were treated with 3 mg/Kg of the classical antimalarial drug chloroquine. In Fig. (1), the protective effect of different doses of chloroquine on animal survival was also tested. The dose response is relatively sharp, with no protection at 1 mg/Kg and complete protection by 3 mg/Kg.

Fig. (1). Chloroquine effect on *P. chabaudi* infected animal survival. Balb/C mice were infected with at day 0 with 10^7 parasites in a photoperiodic regime (12hr light / 12 hr dark). Chloroquine (CLQ) was administered at zeitgeber time (ZT) 6. The survival rate was measured everyday, at ZT0 and ZT12. The curves are significantly different by Logrank test ($P = 0.0006$).

In order to test whether *Plasmodia* synchronous development played a role in the development of the infection, in the experiment presented in Fig. (2), the animals were in-

jected together with the parasites with the melatonin antagonist luzindole (15 mg/Kg). The treatment with luzindole continued throughout the duration of the experiments with one injection per day (see Methods). The luzindole treatment resulted in a modest, yet significant protection of the animals from the deadly effect of the parasites, in as much as 20 % of the animals survived at day 10, i.e. at a time where all controls treated with vector alone were dead. In order to further test whether this protective effect of luzindole could represent an additional therapeutic strategy to combat *Plasmodium* infection we tested whether luzindole treatment could act synergistically with suboptimal doses of chloroquine. As shown in Fig. (2), suboptimal dose of chloroquine (1.5mg/Kg) resulted in a small, yet significant, reduction in animal mortality, especially in the first 6 days of treatment. Strikingly, injection of the suboptimal chloroquine dose (1.5 mg/kg) and luzindole (15 mg/kg) strongly inhibited mice mortality, with over 70 % of the animals still alive at day 10.

Fig. (2). Survival of Balb/C mice after infection with *P. chabaudi*. Balb/C mice were infected at day 0 with 10^7 parasites in a photoperiodic regime (12hr light / 12hr dark). Chloroquine was administered at zeitgeber time 6 (ZT6) and luzindole at ZT12 (ZT0 corresponds to the beginning of the light phase of the daily cycle). Every day of the experiment, at ZT11, blood samples were collected from tail blood, and parasitemia was counted on Giemsa-stained smears. Where indicated the animals were also injected with 1.5mg/kg Chloroquine (CLQ) and/or 15 mg/kg Luzindole (LUZ), solvent alone (PBS or ethanol) or no addition (control). 8 animals per group. Typical experiment of three independent trials. The survival rate was measured at ZT0 and ZT12. The curves are different controls with statistical significance by Logrank test ($P = 0.002$).

In order to verify whether luzindole treatment, alone or in combination with chloroquine, exerted its protective effect by reducing the amount of infected cells, parasitemia was measured by counting Giemsa-stained smears 4 days after

Table 1. In vivo parasitemia measured at day 4. Mean of 8 animals. Typical experiment of three independent trials. The parasitemias are statistically different from each other by 1-way ANOVA variance test and Newman-Keuls post test ($P < 0.0001$), except for the pair CLQ 3 mg/Kg vs LUZ 15 mg/Kg + CLQ 1.5 mg/Kg

Treatment	Control	CLQ 1.5 mg/kg	LUZ 15 mg/kg	CLQ 3 mg/kg	LUZ 15 mg/kg CLQ 1.5 mg/kg
Parasitemia	45.75 $\pm$ 2.04	32.63 $\pm$ 0.89	38.61 $\pm$ 1.6	3.20 $\pm$ 0.08	3.62 $\pm$ 0.13

injection of the parasites (Table 1). Mice treated with optimal doses of chloroquine or luzindole + chloroquine (at suboptimal doses) had a drastic reduction in the number of intraerythrocyte parasites. Luzindole and suboptimal doses of chloroquine, when given separately, were not able to significantly inhibit the number of infected cells.

DISCUSSION

The rhythmicity of *Plasmodia* infection, its most distinctive trait, has been studied since the beginning of the XX century (for review, see Garcia *et al.* 2001). Attempts to take advantage of the periodicity of malaria infection have been made in the past, with little success [31, 32]. However, this chronotherapeutic approach has been investigated in a vast number of diseases e.g. cancer, arthritis, heart ischemia [33-36], often with good therapeutical outcomes. The understanding of the parasite's rhythm, and its modulation, could serve malaria treatment by, for instance, enabling the use of lower dosage of antimalarial to clear out the disease.

The question then arises as to the evolutionary advantage for the parasites provided by synchronization of their cell cycle by host produced melatonin. One possible hypothesis is that the synchronous maturation of the *Plasmodia* is a strategy to evade the immune system [12, 16, 19, 37]. Indeed when the parasites synchronously burst the RBCs, they flood the circulation with a huge number of merozoites, overcoming the capacity of the immune system to efficiently deal with the infection. The immune system does kill some parasites, but a sufficient number of merozoites can infect other RBCs, leading the infection to another intraerythrocytic cycle, i.e. away from the host cellular and humoral defenses. Additional roles for synchronicity has been suggested, in particular concerning the efficiency of vector infection. Here we have readdressed the problem, by taking advantage of the demonstration that the rhythmic cycle of *Plasmodia in vitro* and *in vivo* depends on the hormone melatonin. The rationale of the approach is that alteration in the *Plasmodia* synchronicity may favor the capacity of the host defense system that could more efficiently deal with parasites asynchronously bursting the RBC than billions of parasites coming out of the red blood cells all at the same time. The *in vivo* experiments with mice infected with *P. chabaudi* clearly showed that the disruption of the rhythmicity of the *Plasmodium* cell cycle, using luzindol, a melatonin antagonist, has a small beneficial effect on animal survival. It has also been reported that luzindol act as antioxidant [38]. The more striking results, however, has been the discovery that luzindole drastically improves the therapeutic effect of a suboptimal dose of chloroquine. Indeed, the associated treatment of the animals with the melatonin antagonist and 1,5 mg/Kg of chloroquine, a dose that hardly affects animal survival on its own, has a clear synergistic effect on the survival of Balb/C mice. In particular, at day 10, 25 % of the animals treated with either luzindole or chloroquine alone survived, while 75 % were still alive if treated with both drugs. The treatment with luzindole and chloroquine also decreases the parasitemia, measured on the fourth day of infection. It should be stressed that luzindole has no toxic effect on *Plasmodia in vitro* and thus the simplest explanation for its efficacy is that the host defense mechanisms become more effective when the burst of erythrocytes becomes asynchronous.

The current antimalarial drugs possess a large number of adverse effects, which are predominantly dose-dependent. By using a lower dose, combined with a desynchronizing agent, it is expected that these effects would be milder, making the treatment less toxic for the patient. The adverse effects include nausea, headache, pruritus. Toxic effects includes retinal, cardiovascular- hypotension, vasodilatation, arrhythmias, cardiac arrest - and neurological - convulsions and confusion - disorders. The chloroquine cardiovascular toxicity comes from its membrane stabilization properties, direct negative inotropic effects, arterial vasodilatation promotion and manifests as disturbances in cardiac rhythm and conductance, myocardopathy or vasoplegic shocks [39]. Even in normal cases, when the dosage used in current chloroquine therapy is well tolerated by the patient, the concern with these adverse and toxic effects is always taken into account, whether for treatment or chemoprophylaxis.

In conclusion, we here demonstrate that a antagonist of melatonin, luzindole, while having some effects on its own on infected animal survival, is strongly synergistic with a classical antimalarial drug such as chloroquine. We suggest that the desynchronization of *Plasmodia* cell cycle by luzindole is beneficial because it allows the host defense mechanisms to more effectively combat the infection. The present data may be of practical significance. In particular, considering the toxicity of chloroquine (and of other antimalarial drugs) [40], the possibility to reduce the effective dose of these compounds by combining them with a drug such as a melatonin antagonist may represent a novel paradigm in malaria therapy and may turn out to be of advantage in the treatment of parasites that are becoming resistant to current therapies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Fundação de Amparo à pesquisa de São Paulo (Fapesp) for funding CRSG and RPM. We also thank CNPq/MS Neglected Tropical Diseases Grant for funding CRSG. PB received fellowship from FAPESP. We thank Dr. Robert S. Desowitz for the critical review and helpful suggestions.

REFERENCES

- [1] Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005; 434(7030): 214-7.
- [2] Menéndez C, Romagosa C, Ismail MR, *et al.* An autopsy study of maternal mortality in Mozambique: the contribution of infectious diseases. *PLoS Med* 2008; 5(2): e44.
- [3] EA EP, Alves JG. The causes of death of hospitalized children in Angola. *Trop Doct* 2008; 38(1): 66-7.
- [4] Taylor W, White N. Antimalarial drug toxicity: A review. *Drug Saf* 2004; 27(1): 25-61.
- [5] Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(1): 235-54.
- [6] Amino R, Thiberge S, Martin B, *et al.* Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 2006; 12(2): 220-4.
- [7] Sturm A, Amino R, van de Sand C, *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006; 313(5791): 1287-90.
- [8] Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 2006; 124(4): 755-66.

- [9] Przyborski JM, Lanzer M. Protein transport and trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitology* 2005; 130(Pt 4): 373-88.
- [10] Cooke BM, Lingelbach K, Bannister LH, Tilley L. Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol* 2004; 20(12): 581-9.
- [11] Pevet P, Agez L, Bothorel B, *et al.* Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol Int* 2006; 23(1-2): 39-51.
- [12] Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, *et al.* Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol* 2000; 2(7): 466-8.
- [13] Hotta CT, Markus RP, Garcia CR. Melatonin and N-acetylserotonin cross the red blood cell membrane and evoke calcium mobilization in malarial parasites. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(11): 1583-7.
- [14] Varotti FP, Beraldo FH, Gazarini ML, Garcia CR. *Plasmodium falciparum* malaria parasites display a THG-sensitive Ca²⁺ pool. *Cell Calcium* 2003; 33(2): 137-44.
- [15] Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, Garcia CR. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol* 2005; 170(4): 551-7.
- [16] Beraldo FH, Garcia CR. Products of tryptophan catabolism induce Ca²⁺ release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res* 2005; 39(3): 224-30.
- [17] Garcia CR. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol Today* 1999; 15(12): 488-91.
- [18] Gazarini ML, Garcia CR. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca²⁺ fluctuations. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(1): 138-44.
- [19] Gazarini ML, Thomas AP, Pozzan T, Garcia CR. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol* 2003; 161(1): 103-10.
- [20] Passos AP, Garcia CR. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245(1): 155-60.
- [21] Passos AP, Garcia CR. Characterization of Ca²⁺ transport activity associated with a non-mitochondrial calcium pool in the rodent malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 42(5): 919-25.
- [22] Lew VL, Tiffert T. Is invasion efficiency in malaria controlled by pre-invasion events? *Trends Parasitol* 2007; 23(10): 481-4.
- [23] Nagamune K, Sibley LD. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol Biol Evol* 2006; 23(8): 1613-27.
- [24] 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; 281(37): 27126-33.
- [25] Doerig C, Billker O, Pratt D, Endicott J. Protein kinases as targets for antimalarial intervention: Kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1754(1-2): 132-50.
- [26] Doerig C, Meijer L. Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(3): 279-90.
- [27] Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics* 2004; 5(1): 79.
- [28] Drew ME, Banerjee R, Uffman EW, Gilbertson S, Rosenthal PJ, Goldberg DE. Plasmodium food vacuole plasmepsins are activated by falcipains. *J Biol Chem* 2008.
- [29] Doerig C. Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1697(1-2): 155-68.
- [30] Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol* 2003; 206(Pt 21): 3735-44.
- [31] Cambie G, Caillard V, Beaute-Lafitte A, Ginsburg H, Chabaud A, Landau I. Chronotherapy of malaria: identification of drug-sensitive stage of parasite and timing of drug delivery for improved therapy. *Ann Parasitol Hum Comp* 1991; 66(1): 14-21.
- [32] Landau I, Lepers JP, Ringwald P, Rabarison P, Ginsburg H, Chabaud A. Chronotherapy of malaria: improved efficacy of timed chloroquine treatment of patients with *Plasmodium falciparum* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86(4): 374-5.
- [33] Levi F, Focan C, Karaboue A, *et al.* Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(9-10): 1015-35.
- [34] Portaluppi F, Lemmer B. Chronobiology and chronotherapy of ischemic heart disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(9-10): 952-65.
- [35] Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, *et al.* Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(9): 3407-12.
- [36] Buttgerit F, Doering G, Schaeffler A, *et al.* Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 371(9608): 205-14.
- [37] Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78(3): 687-721.
- [38] Mathes AM, Wolf B, Rensing H. Melatonin receptor antagonist luzindole is a powerful radical scavenger *in vitro*. *J Pineal Res* 2008.
- [39] AlKadi HO. Antimalarial drug toxicity: a review. *Chemotherapy* 2007; 53(6): 385-91.
- [40] Garcia CRS, Azevedo MF, Wundelich G, Budu A, Young JA, Bannister L. Plasmodium in the post genomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. *Inter Rev Cell Mol Biol* 2008; 266(3): 85-156.

Received: April 10, 2008

Revised: May 28, 2008

Accepted: June 03, 2008

© Bagnaresi *et al.*; Licensee Bentham Open.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin.

Piero Bagnaresi¹, Eduardo Alves¹, Henrique Borges da Silva¹, Sabrina Epiphany², Maria M. Mota² and Célia R. S. Garcia¹

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Unidade de Malária, Instituto de Medicina Molecular, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Corresponding author: Célia Regina da Silva Garcia - Rua do Matão, travessa 14, n. 321. Cidade Universitária, São Paulo, Brazil. - 05508-090- Phone: +55(11)30917518 Fax: +55(11)30918095. E-mail: cgarcia@usp.br

Keywords: Malaria, Calcium, Melatonin, Cell Cycle, Rhythm, Sporozoite

Running title: Lack of melatonin action on *P. berghei* and *P. yoelii*

Abstract

We have previously reported that *Plasmodium chabaudi* and *P. falciparum* sense the hormone melatonin and this could be responsible for the synchrony of malaria infection. In *P. chabaudi* and *P. falciparum*, melatonin induces calcium release from internal stores, and this response is abolished by U73122, a phospholipase C inhibitor, and luzindole, a melatonin-receptor competitive antagonist. Here we show that, *in vitro*, melatonin is not able to modulate cell cycle, nor to elicit an elevation in intracellular calcium concentration of the intraerythrocytic forms of *P. berghei* or *P. yoelii*, two rodent parasites that show an asynchrononous development *in vivo*. Interestingly, melatonin and its receptor do not seem to play a role during hepatic infection by *P. berghei* sporozoites either. These data strengthen the hypothesis that host-derived melatonin does not synchronize malaria infection caused by *P. berghei* and *P. yoelii*. Moreover, these data explain why infections by these parasites are asynchronous, contrary to what is observed in *P. falciparum* and *P. chabaudi* infections.

1. Introduction

Malaria, caused by the parasite of genus *Plasmodium*, represents a major public health issue due to the growing resistance to current anti-malarial drugs (Snow et al 2005). The World Health Organization (WHO) estimates that 300 to 500 million people are infected annually, and the number of deaths exceeds 1 million. The periodical fever peaks, which occur generally in 24-hour multiple intervals are the most striking trait of the malarial infection. This observation suggests that the erythrocyte rupture and reinvasion process is an extremely synchronized event. When a RBC is infected by *Plasmodium*, its spectrin network is changed by the parasite (Garcia et al 1997). This RBC modification is only one of many operated by the parasite during its life cycle, due to, for example, intercellular protein trafficking (Przyborski and Lanzer 2005).

In 1929, Boyd demonstrated that the life cycle of the chicken parasite *P. cathemerium* changed in accordance with changes in the light / dark cycles to which the host was submitted. Taliaferro and Taliaferro, in 1934, delayed the schizogony of the monkey parasite *P. brazilianum* by 12 hours only by altering the host's photoperiod. This evidence stressed the importance of the photoperiod on the parasite's life cycle. Stauber, in 1939, reported that incident light on the host's body surface or shone directly over the parasites does not alter the development of the infection. The light has to be perceived by the host for the synchronization signal to be delivered to the parasites in the bloodstream. The stimulus has to be perceived by the retinohypothalamic tract for the light signal be transduced.

In 1970, Hawking – studying *P. vivax* infected patients – suggested that the fever results from a burst in the number of merozoites in the host's bloodstream, and concluded that the parasites display a synchronous development to produce this population increase.

Trager and Jensen, in 1976, successfully maintained *P. falciparum* in culture, and observed that the parasites lost their synchrony. This observation suggested an involvement of the host's physiology in the maintenance of the infection rhythm. The host's temperature was suggested to perform a role in this phenomenon, as there is a conspicuous period between the fever peaks (Pavithra et al 2004). However, this possibility was rejected based on several lines of evidence, such as the variation of the schizogony times between different *Plasmodium* species (Hawking et al 1968b; Garcia et al 2001).

A periodicity is also observed during the sexual stage of *Plasmodium*'s life cycle. This observation was initially made by Shah, in 1934, who encountered a peak in *P. cathemeruim* gametocyte number at 18:00hrs. Similar results were reported by Gambrell (Gambrell 1937) and Hawking and collaborators (Hawking et al 1968a). In 1970, Hawking showed that production of gametocytes of the monkey parasite *P. knowlesi* depends on the host's circadian rhythm, increasing significantly during the night. This phenomenon has since been reported for several *Plasmodium* species (for a review, please see Gautret and Motard 1999). The appearance of the invertebrate-infective forms in the bloodstream at a time close to the feeding period of the vector is a very important adaptive feature, which ensures the propagation of the infection. This cyclic and precise

temporization of the appearance of gametocytes, coinciding with the vector's feeding pattern was called the "Hawking Phenomenon" by Garnham and Powers (please see Madeira et al 2001 for a review on this subject).

Melatonin, a hormone secreted in a rhythmic fashion by the pineal gland, is a highly conserved molecule, as its presence can be observed in organisms ranging from archaeobacteria to vertebrates (Vivien-Roels 1988; Di Mascio et al 2000).

We have shown that the hormone melatonin is able to synchronize the life cycle of *P. chabaudi* and *P. falciparum in vitro* and that this effect is abolished by luzindole, a melatonin receptor antagonist (Hotta et al 2000). The synchronism is also lost *in vivo* in pinealectomized mice and upon injection of luzindole. Furthermore, synchronism in pinealectomized mice can be restored by melatonin administration.

The question then arises as to the evolutionary advantage for the parasites of cell cycle synchronization by host-produced melatonin. A hypothesis is that synchronous maturation might be a strategy to evade the host's immune system (Hotta et al 2000; Gazarini et al 2003; Beraldo and Garcia 2005).

As to the molecular mechanism of melatonin action in the parasites we have shown that melatonin can elicit an increase in intracellular calcium concentration in *Plasmodium* trophozoites. In addition, in *P. falciparum*, we have demonstrated that the melatonin-signaling pathway involves a complex crosstalk between Ca^{2+} and cAMP (Beraldo et al 2005), and further activation of PKA. Protein kinases are key components in *Plasmodium* signaling pathways (Ward et al 2004; Doerig et al 2005; Doerig and Meijer

2007). Plasmodia genomes encode machinery for the both second messengers (Gardner et al 2002; Carlton et al 2002). Additionally several reports support the importance of calcium signaling in parasites (Passos and Garcia 1997; Passos and Garcia 1998; DoCampo and Moreno 2001; Kirk 2001; Farias et al 2004; Gazarini and Garcia 2003; Varotti et al 2003; Gazarini et al 2004; Nagamune and Sibley 2006; Vaida and Sharma 2006). Calcium also plays a crucial role on invasion events, inducing proper apical alignment of the merozoite (Lew and Tiffert 2007)

In addition, *Anopheles* mosquitoes feeding habits occur during darkness (Elliot 1972, Das et al 2003; Wanji et al 2003; Shililu et al 2004), a period during which the levels of melatonin are the highest.

In this report we addressed the problem of the evolutionary role of synchrony by comparing *in vitro* the effects of melatonin on cell cycle and Ca^{2+} levels in parasites that *in vivo* have a highly synchronous development (*P. chabaudi*) with the strains *P. berghei* and *P. yoelii* that develop asynchronously *in vivo* (Desowitz and Barnwell 1976; Barnwell and Desowitz 1977; Desowitz 1989; Desowitz et al 1999).

The data demonstrate that *in vitro* the asynchronous strain of *P. berghei* and *P. yoelii* melatonin is devoid of any effect on either Ca^{2+} signaling or cell cycle control on the blood stage and that melatonin does not produce any effect in *P. berghei* infection of mice and infected primary hepatocytes.

Here we present evidence that *P. berghei* and *P. yoelii*, both of which lead to asynchronous infections, do not respond to melatonin, strengthening

the evidence that melatonin plays a major role in determining the rhythm of *Plasmodium* infection.

2. Materials and Methods

2.1. Parasites

P. berghei NK65 and *P. yoelii* were maintained in BALB/c mice by infection passaging. The procedure for collecting blood and removing platelets has been described previously by Hotta *et al.*, 2000.

P. berghei ANKA sporozoites were obtained from the salivary glands of infected *Anopheles stenphensi* mosquitoes and used to perform *ex vivo* and *in vivo* liver stage infection experiments.

2.2. In vivo experiment with *P. berghei*

Wistar rats, with a body weight of approximately 300g, were inoculated with 10^7 erythrocytes infected with *P. berghei* NK65 parasites. The rats were maintained with food and water *ad libitum*, in a 12 hours light / 12 hours dark photoperiodic regime. Every day, at Zeitgeber Time 11, blood samples were collected from tail blood, to measure parasitemia by counting no less than 1000 cells in Giemsa-stained blood smears. Zeitgeber Time starts with the beginning of light phase.

In hepatic stage assays, 6-10 weeks old male C3H mice, which have a high physiological concentration of melatonin (Vivien-Roels *et al* 1998), were maintained in a 12 hours light / 12 hours dark photoperiodic regime.

Luzindole (Sigma-Aldrich) treatment was performed by intravenous injection through the retro-ocular plexus at midnight under dim red light on 3 consecutive days. The drug was administered in 100 μ l of 20% ethanol in PBS 1x at 15mg/kg. Mice were infected with 20,000 sporozoites in 200 μ l of RPMI medium at day 2 of luzindole treatment.

2.3. Fluorescent Ca^{2+} determinations

To obtain isolated parasites, 10^8 infected RBC per ml were briefly treated with saponin (10 mg/ml) and washed twice in buffer A (116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgSO_4$, 5.5 mM D-Glucose, 50 mM MOPS and 1 mM $CaCl_2$, pH 7.2) and resuspended in the same buffer supplemented with 2.8 mM probenecid (Sigma-Aldrich), an organic anion transport inhibitor (Di Virgilio et al 1990). The cell suspension was then incubated for 50 min at 37°C with 6 μ M Fluo-3 AM (Molecular Probes) and washed three times with buffer A, for removal of extracellular probe. All the experiments and incubations were carried out in the presence of protease inhibitors: leupeptin, pepstatin A, antipain, chymostatin (20 μ g/ml) and 0.5 mM benzamidine.

Fluorescence was measured at 37°C with a Shimadzu RF-5301PC Spectrofluorimeter, with an excitation wavelength of 505 ± 5 nm and an emission wavelength of 530 ± 5 nm. Calcium concentration was assessed as described in Hotta et al 2000.

2.4. In vitro experiments

Parasites were maintained in RPMI 1640 with 25 mM HEPES, supplemented with 50% FCS. Melatonin was added at different concentrations, and incubated for 18 hours. Analyses of Giemsa-stained smears were performed, counting no less than 1000 cells per smear for parasitemia and life form distribution assessment. Triplicate smears were prepared for each experimental condition. Results are presented as the mean of three independent experiments.

2.5. Infection quantification ex vivo

Mouse primary hepatocytes were isolated by perfusion of mouse liver lobules with liver perfusion medium (Gibco/Invitrogen) and purified using a 1.12 g/ml; 1.08 g/ml and 1.06 g/ml Percoll gradient. Cells (5×10^4 per well) were cultured in William's E medium containing 4% FCS, 1% penicillin/streptomycin, in Lab-Tek™ chamber slides (Nunc™). Hepatocytes were maintained in culture at 37°C and 5% CO₂.

Primary hepatocytes were incubated with 400nM melatonin for 30 minutes and infected with 20.000 *P. berghei* sporozoites.

Infection was determined 45 hours after sporozoite addition by counting the number of exoerythrocytic forms (EEFs) detected by immunostaining. Cells were fixed with ice-cold methanol for 10 minutes and then incubated for 30 minutes in a blocking solution containing 3% BSA, 100 mM glycine and 10% bovine serum in PBS. Parasites were stained with anti-Hsp70 mouse monoclonal antibody (2E6) for 1 hour (Tsuji et al 1994) and an AlexaFluor488 labeled goat anti-mouse secondary antibody (1:400) (Molecular Probes/Invitrogen) for 45 minutes.

2.6. Infection quantification by qRT-PCR

The determination of liver parasite load *in vivo* was performed according to Bruna-Romero *et al.*, 2001. Livers were collected and homogenized in denaturing solution (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7, 0.5 % sarcosyl and 0.7 % β Mercaptoethanol in DEPC-treated water), 40 h after sporozoite injection. Total RNA was extracted using Qiagen's RNeasy Mini kit, following the manufacturer's instructions. RNA for infection measurements was converted into cDNA using Roche's Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit, according to the manufacturer's protocol. The qRT-PCR reactions were carried out using Applied Biosystems' Power SYBR Green PCR Master Mix and were performed according to the manufacturer's instructions on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems). PbA-specific primer sequences were 5'- AAG CAT TAA ATA AAG CGA ATA CAT CCTTAC – 3' and 5' - GGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT G – 3'.

2.7 Statistical Analysis

The cells counts were analysed by One Way ANOVA test, and Newman-Keuls post test, and data were considered statistical different when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. $[Ca^{2+}]_i$ pools in *P. berghei* and *P. yoelii*

A large number of cellular events in both low and high eukaryotes employ Ca^{2+} -based signaling pathways. Extensive work on Ca^{2+}

homeostasis and signaling has provided evidence for the major role of the endoplasmic reticulum in these processes as well of the participation of other organelles such as mitochondria, lysosomes and Golgi in Ca^{2+} storage in mammalian cells (Berridge et al 2003).

P. berghei possesses calcium handling mechanisms, such as the SERCA sensitive endoplasmic reticulum-like pool and acidic pools. To investigate the role of intracellular Ca^{2+} pools in these parasites we have isolated *P. berghei* from red blood cells and loaded the parasites with Fluo-3 AM calcium dye. Fig 1a shows the effect of addition of $5\mu\text{M}$ thapsigargin (THG), a SERCA inhibitor (Thastrup et al 1990; Lytton et al 1991), on isolated *P. berghei* parasites. THG promotes an increase in the cytosolic calcium concentration, ($205 \pm 32.85 \text{ nM}$) thus confirming that these cells can store the Ca^{2+} ion in the endoplasmic reticulum (ER). We further investigate whether acidic pools could also play a role in Ca^{2+} homeostasis in *P. berghei*. Fig 1b shows that monensin, a Na^+/H^+ ionophore ($25\mu\text{M}$) elicits an $265 \pm 30.96 \text{ nM}$ increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of *P. berghei*.

P. yoelii also possesses mechanisms to handle calcium. Addition of THG to isolated parasites results in a $248 \pm 52.61 \text{ nM}$ ($n=8$) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation (data not shown), showing that the ER is able to participate in calcium homeostasis. Acidic pools are also present and can be mobilized, as addition of monensin ($20 \mu\text{M}$) promotes a $291.4 \pm 65.70 \text{ nM}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase (Fig 1E).

3.2. Melatonin does not elicit an increase in Ca^{2+} concentration in *P. berghei* and *P. yoelii*

In order to further analyze the importance of melatonin in the control of Plasmodia cell cycle, we sought to investigate its effects on *P. berghei*, a strain of *Plasmodium* that, unlike the vast majority of mammalian *Plasmodium* species (Garcia et al 2001), has an asynchronous development in the live mouse.

The simplest *in vitro* test to address the sensitivity of *P. berghei* and *P. yoelii* to melatonin is to determine whether the hormone can increase the cytoplasmic Ca^{2+} concentration, a well established early event caused by melatonin in *P. chabaudi* and *P. falciparum* (Hotta et al 2000, Gazarini et al 2003, Beraldo et al 2005). Fig 2 shows that addition of up to 20 μM melatonin did not lead to an increase in Ca^{2+} concentration in *P. berghei* or *P. yoelii*, regardless of whether calcium was present or not in the medium. The experiment shown in Fig. 2 (panel a) shows that, equally to what found in other Plasmodia (Hotta et al 2000, Varotti et al 2003), thapsigargin (THG), addition to *P. berghei* after melatonin elicited a $205 \pm 32.85 \text{ nM}$ ($n=3$) increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, showing that the calcium pools were capable of mobilization. THG is an inhibitor of the sarco-endoplasmic reticulum ATPase (Thastrup 1990; Lytton et al 1991). In accordance with these results, panel b shows that monensin, a Na^+/H^+ ionophore, that can induce the release of Ca^{2+} from an acidic pool in other Plasmodia strains, also elicits a strong increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $265 \pm 30.96 \text{ nM}$ $n=3$ in *P. berghei*. *P. yoelii* also lacks response for melatonin, while still have calcium pools that are capable of mobilization (Fig. 2C and 2D). Taken together, these results most likely reflect the absence of a melatonin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization

rather than a unique characteristic of *P. berghei* or *P. yoelii* Ca^{2+} homeostasis.

3.3. Melatonin does not interfere with *P. berghei* and *P. yoelii* life cycle

Melatonin receptors might couple to other signaling pathways (e.g. cAMP). In order to test whether in *P. berghei* melatonin could affect the cell cycle through a Ca^{2+} independent mechanism, we tested whether the hormone could synchronize *in vitro* *P. berghei* life cycle as is the case with *P. chabaudi* and *P. falciparum* (Hotta et al 2000; Beraldo et al 2005; Beraldo and Garcia 2005). Again, hormone concentrations up to 100-fold higher than those capable of strongly affecting Plasmodia development in the other strains were totally ineffective in synchronizing either *P. berghei*'s or *P. yoelii*'s life cycle. (Fig. 3), or in modulating the parasitemia (Fig 4).

P. berghei can infect both rats and mice. In C57BL/6 mice, *P.berghei* primarily causes a severe syndrome known as cerebral malaria (Hearn et al 2000). We thus checked whether the lack of *in vitro* sensitivity to melatonin of *P. berghei* may be due to an artifact of these artificial culture conditions or of the specificity of the disease in mice. Wistar rats were inoculated with 10^7 *P. berghei* infected erythrocytes and the distribution of life forms on the fifth day after infection was investigated in blood smears. Figure 5 shows that also in rats *P. berghei* does not display a synchronous development. Indeed the percentage of rings and trophozoites are very similar (unlike in the mouse infected with *P. chabaudi* where trophozoites largely predominate at this time). Schizonts are hardly observed in infected rats as

already reported by Desowitz et al., presumably due to sequestration of the RBC containing parasites at this stage in the microvasculature (Desowitz and Barnwell 1976).

3.4. Melatonin does not modify the *P. berghei* liver infection load

The inhibition of melatonin receptor does not affect the parasite load in the livers of mice infected with *P. berghei* ANKA sporozoites. In addition, we did not observe a significant difference between the *P. berghei* infection levels of melatonin-treated mouse primary hepatocytes and that of control hepatocytes (Fig. 6).

We have also considered the possibility that other stages of *P. berghei* might sense melatonin. Addition of melatonin to *P. berghei* gametocyte is not able to elicit an increase of calcium levels (Bilker O, personal communication) as is the case when xanthurenic acid is added (Bilker et al 2004).

4. Discussion

The spectrofluorimetry results obtained show that *P. berghei* and *P. yoelii* display mechanisms that sustain the $[Ca^{2+}]_i$ against an extracellular calcium concentration in the milimolar range. By using isolated parasites loaded with fluorescent dyes we showed here that the endoplasmatic reticulum plays a role in the $[Ca^{2+}]_i$ maintenance. The storage of the calcium ion is mediated by a SERCA, since thapsigargin inhibits this enzyme, and promotes and $[Ca^{2+}]_i$ increase. The experiments involving the Na^+/H^+ ionophore monensin have shown that an acidic pool also participates

in calcium homeostasis, as the ionophore also elicits an $[Ca^{2+}]_i$ increase. The presence of intracellular calcium pools in *P. berghei* was previously demonstrated by Marchesini et al 2000.

In 2000, Hotta et al showed that melatonin could mobilize calcium from internal stores in isolated *P. chabaudi* and that this hormone is responsible for synchronization of the infection. The use of the phospholipase C inhibitor U73122 or of the melatonin receptor competitive antagonist luzindole abolished the melatonin-mediated calcium response, suggesting that a calcium pathway is involved in the transduction of the hormone signal. This pattern is also observed in *P. falciparum*, as reported by Beraldo et al., 2005 using isolated parasites and infected RBCs.

Strikingly, melatonin does not induce an elevation in $[Ca^{2+}]_i$ of *P. berghei* or *P. yoelii*, both of which lead to an unsynchronized infection. This observation prompted the question of whether melatonin was able to synchronize these infections, as we previously reported to be the case with both *P. chabaudi* and the human malaria parasite *P. falciparum*. To evaluate whether, despite not promoting calcium mobilization, melatonin was able to synchronize *P. berghei* and *P. yoelii*, we incubated parasites with various melatonin concentrations. The analysis of Giemsa-stained smears has shown that the hormone was not able to synchronize the infection of these rodent parasites at a maximum concentration of 1 μ M for *P. berghei*, and 250 μ M for *P. yoelii*, in contrast to that is found in *P. chabaudi*, whose cell cycle can be modulated by 10 nM of melatonin (Hotta et al 2000).

Here we show that melatonin does not elicit a calcium response nor does it affect the distribution of *P. berghei* and *P. yoelii* life forms, which display an unsynchronized infection *in vivo*. These data strengthen the hypothesis that *Plasmodium* utilizes melatonin to synchronize its life cycle (Hotta et al 2000; Gazarini et al 2003; Beraldo et al 2005), and, in the case of *P. berghei* and *P. yoelii*, we suggest that the non-response to melatonin is one of the reasons that this infection is unsynchronized.

While the physiology of malaria parasites seems similar, all displaying maturation stages such as ring, trophozoite and schizont, the molecular machinery is distinct for different parasite strains. It is known that 80% of rodent malaria genes do possess an ortholog in *P. falciparum* (Hall 2005).

According to Guha et al 2007 melatonin inhibits hepatocyte apoptosis and liver damage induced during *P. yoelii* infection. In addition, *P. berghei*-infected hepatocytes are protected against apoptosis and this protection seems to be triggered by both host and parasite molecules (Leirião et al 2005). However, our results suggest that melatonin is not involved in hepatic infection by *Plasmodium berghei* ANKA sporozoites.

The molecular nature of the melatonin receptor in Plasmodia is currently under investigation. However, the complete absence of any functional effect of melatonin on *P. berghei in vitro* and its *in vivo* asynchronous development even in rats (that have a strong circadian melatonin production rhythm) suggests that this strain of *Plasmodium* does not perceive the melatonin signal as *P. chabaudi* and *P. falciparum*.

Taken together these data add important novel support to the hypothesis that melatonin is responsible for the *in vivo* synchrony in this

parasites, as we previously shown that melatonin-sensitive parasites have a synchronized life cycle (Hotta et al 2000; Gazarini et al 2003; Beraldo et al 2005), and suggest that the lack of response to melatonin is one of the reasons why the *in vivo* cell cycle of *P. berghei* and *P. yoelii* is unsynchronized.

Finally the work presented here provides a clear link between the importance of host melatonin and synchronization of malaria parasites thus showing that the distribution of *P. berghei* and *P. yoelii* life forms is not affected by melatonin whereas, in contrast, it exerts a marked biological effect on *P. chabaudi* and *P. falciparum*, as previously reported (Hotta et al 2000; Gazarini et al 2003; Beraldo et al 2005).

Acknowledgements

We thank Fundação de Amparo à pesquisa de São Paulo (Fapesp) and CNPq for funding CRSG and Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) of the Portuguese Ministry of Science (grant POCTI/SAU-MMO/60930/2004 to MMM. PB received fellowship from FAPESP. SE was supported by FCT fellowships (SFRH/BPD/31598/2006). We thank Dr. Robert S. Desowitz for the critical review and helpful suggestions.

References

Barnwell JW, Desowitz RS. 1977. Studies on parasitic crisis in malaria: I. Signs of impending crisis in *Plasmodium berghei* infections of the white rat. *Ann Trop Med Parasitol*, 71:429-433.

Beraldo FH, Almeida FM, da Silva AM, et al. 2005. Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J Cell Biol*, 170:551-557.

Beraldo FH, Garcia CR. 2005. Products of tryptophan catabolism induce Ca^{2+} release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Pineal Res*, 39:224-230.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick MD. 2003. Calcium Signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Mol. Cel. Bio. Rev.* 4(7):517-529.

Billker O, Dechamps S, Tewari R., et al. 2004. Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*, 117:503-514.

Boyd GH. 1929. Induced variations in the asexual cycle of *Plasmodium cathemerium*. *Am. J. Hyg.*, 9:181-187.

Bruna-Romero O, Hafalla JC, Gonzalez-Aseguinolaza G. et al. 2001. Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single *Anopheles* mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int J Parasitol*, 31:1499-1502.

Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*, 419:512-519.

- Das MK, Nagpal BN, Srivastava A, et al. 2003. Bioecology of *An. philippinensis* in Andaman group of islands. *J Vector Borne Dis*, 40:43-48.
- Desowitz RS, Barnwell JW. 1976. *Plasmodium berghei*: deep vascular sequestration of young forms in the heart and kidney of the white rat. *Ann Trop Med Parasitol*, 70:475-476.
- Desowitz RS, Shida KK, Pang L, et al. 1989. Characterization of a model of malaria in the pregnant host: *Plasmodium berghei* in the white rat. *Am J Trop Med Hyg*, 41:630-634.
- Desowitz RS. 1999. *Plasmodium berghei* in the white rat: severe malaria of pregnancy does not occur in the progeny of mothers infected during gestation. *Ann Trop Med Parasitol*, 93:415-417.
- Di Mascio P, Dewez B, Garcia CR. 2000. Ghost protein damage by peroxynitrite and its protection by melatonin. *Braz J Med Biol Res*, 33:11-17.
- Di Virgilio F, Steinberg TH, Silverstein SC. 1990. Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium*, 11:57-62.
- Docampo R, Moreno SN. 2001. The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol*, 114:151-159.
- Doerig, C., Billker, O., Pratt, D., Endicott, J., 2005. Protein kinases as targets for antimalarial intervention: Kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1754, 132-150.

Doerig C, Meijer L, 2007. Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases. *Expert Opin Ther Targets*, 11:279-290.

Elliott R. 1972. The influence of vector behavior on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*, 21:755-763.

Farias SL, Gazarini ML, Melo RL, et al. Cysteine-protease activity elicited by Ca²⁺ stimulus in Plasmodium. *Mol Biochem Parasitol*, 141:71-79.

Gambrell WE. 1937. Variations in gametocyte production in avian malaria. *Am. J. Trop. Med.* 17:689-727.

Garcia CR, Takeuchi M, Yoshioka K, et al. 1997. Imaging Plasmodium falciparum-infected ghost and parasite by atomic force microscopy. *J Struct Biol*, 119:92-98.

Garcia CR, Markus RP, Madeira L. 2001. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. *J Biol Rhythms*, 16:436-443.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, 419:498-511.

Gautret P, Motard A. 1999. Periodic infectivity of Plasmodium gametocytes to the vector. A review. *Parasite*, 6:103-111.

Gazarini ML, Garcia CR. 2003. Interruption of the blood-stage cycle of the malaria parasite, Plasmodium chabaudi, by protein tyrosine kinase inhibitors. *Braz J Med Biol Res*, 36:1465-1469.

Gazarini ML, Thomas AP, Pozzan T, et al. 2003. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. *J Cell Biol*, 161:103-110.

- Gazarini ML, Garcia CR. 2004. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca²⁺ fluctuations. *Biochem Biophys Res Commun*, 321:138-144.
- Hall N, Carlton J. 2005. Comparative genomics of malaria parasites. *Curr Opin Genet Dev*, 15:609-613.
- Hawking F, Worms MJ, Gammage K. 1968. Host temperature and control of 24-hour and 48-hour cycles in malaria parasites. *Lancet*, 1:506-509.
- Hawking F, Worms MJ, Gammage K. 1968. 24- and 48-hour cycles of malaria parasites in the blood; their purpose, production and control. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 62:731-765.
- Hawking F, 1970. The clock of the malaria parasite. *Sci Am*. 222:123-131.
- Hearn J, Rayment N, Landon DN, et al. 2000. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun*, 68:5364-5376.
- Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, et al. 2000. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol*, 2:466-468.
- Kirk K. 2001. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev*, 81:495-537.
- Leiriao P, Mota MM, Rodriguez A. 2005. Apoptotic Plasmodium-infected hepatocytes provide antigens to liver dendritic cells. *J Infect Dis*, 191:1576-1581.
- Lew VL, Tiffert T. 2007. Is invasion efficiency in malaria controlled by pre-invasion events? *Trends Parasitol*, 23:481-484.

Lytton J, Westlin, M, Hanley MR. 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 266:17067-17071.

Marchesini N, Luo S, Rodrigues CO, et al. 2000. Acidocalcisomes and a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in malaria parasites. *Biochem J* 347 Pt 1: 243-253.

Nagamune K, Sibley LD. 2006. Comparative genomic and phylogenetic analyses of calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa. *Mol Biol Evol*, 23:1613-1627.

Passos AP, Garcia CR. 1997. Characterization of Ca²⁺ transport activity associated with a non-mitochondrial calcium pool in the rodent malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Mol Biol Int*, 42:919-925.

Passos AP, Garcia CR. 1998. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi*. *Biochem Biophys Res Commun*, 245:155-160.

Pavithra SR, Banumathy G, Joy O, et al. 2004. Recurrent fever promotes *Plasmodium falciparum* development in human erythrocytes. *J Biol Chem* 279:46692-46699.

Przyborski JM, Lanzer M. 2005. Protein transport and trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Parasitology* 130:373-388.

Shililu J, Ghebremeskel T, Seulu F, et al. 2004. Seasonal abundance, vector behavior, and malaria parasite transmission in Eritrea. *J Am Mosq Control Assoc*, 20:155-164.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, et al. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434:214-217.

Stauber LA. 1939. Factors influencing the asexual periodicity of avian malarias. *Journal of Parasitology*, 95-116.

Taliaferro WH, Taliaferro LG. 1934. Morphology, periodicity and course of infection of *Plasmodium brasilianum* in Panamanian monkeys. *Am. J. Hyg.*, 20:1-49.

Thastrup O. 1990. Role of $\text{Ca}^{2(+)}\text{-ATPases}$ in regulation of cellular Ca^{2+} signalling, as studied with the selective microsomal $\text{Ca}^{2(+)}\text{-ATPase}$ inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions*, 29:8-15.

Trager W, Jensen JB, 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193:673-675.

Tsuji M, Mattei D, Nussenzweig RS, et al. 1994. Demonstration of heat-shock protein 70 in the sporozoite stage of malaria parasites. *Parasitol Res*, 80:16-21.

Vaid A, Sharma P. 2006. 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*, 281:27126-27133.

Varotti FP, Beraldo FH, Gazarini ML, et al. 2003. *Plasmodium falciparum* malaria parasites display a THG-sensitive Ca^{2+} pool. *Cell Calcium*, 33:137-144.

Wanji S, Tanke T, Atanga SN, et al. 2003. Anopheles species of the mount Cameroon region: biting habits, feeding behaviour and entomological inoculation rates. *Trop Med Int Health* 8:643-649.

Ward P, Equinet L, Packer J, et al. 2004. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics*, 5:79.

Legend to the figures

Fig. 1. Calcium mobilization in Fluo-3 labeled *P. berghei* isolated parasites. A) Addition of Thapsigargin (THG, 5 μ M) in 1mM calcium medium. B) Addition of 25 μ M monensin (MON) to medium containing 1mM calcium. C) Addition of 5 μ M THG to calcium-free medium. D) Addition of 25 μ M MON to calcium-free medium. E) Addition of 20 μ M MON to *P. yoelii* parasites, in 1mM calcium medium.

Fig. 2. Effects of melatonin addition in isolated, Fluo-3 labeled, *P. berghei* and *P. yoelii* parasites. A) Addition of 20 μ M melatonin (MEL) to *P. berghei* in medium containing 1mM calcium. B) Addition of 20 μ M MEL to *P. berghei* in calcium-free medium. C) Addition of 50 μ M melatonin (MEL 50) followed by 25 μ M monensin to *P. yoelii* in medium containing 1mM calcium . D)

Addition of 40 μ M melatonin (MEL 40) followed by THG (5 μ M) to *P. yoelii* in medium containing 1mM calcium.

Fig. 3. *In vitro* culture of *P. berghei* (A) and *P. yoelii* (B) incubated with different melatonin concentrations. The figure shows the distribution of *P. berghei* and *P. yoelii* life forms after 18 or 13 hours incubation, respectively, with different melatonin concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM and 1 μ M). R stands for ring, T for trophozoites and S for schizonts. There are no statistical differences in the distribution. The results are presented as the mean of three independent experiments $\pm$ s.e.m..

Fig. 4. *In vitro* culture of *P. berghei* (A) and *P. yoelii* (B) incubated with different melatonin concentrations. The figure shows *P. berghei*- and *P. yoelii*-infected Red Blood Cells (iRBC) after 18 or 13 hours incubation, respectively, melatonin concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM and 1 μ M). There are no statistical differences in the number of iRBC. The results are presented as the mean of three independent experiments $\pm$ s.e.m..

Fig. 5. Distribution of *P. berghei* in infected Wistar rats, 5 days after inoculation of 10^7 infected erythrocytes. R stands for rings, T for trophozoites and S for schizonts. To assess life forms distributions, no less than 1000 cells were counted in Giemsa-stained smears. No statistical differences were observed between the percentage of rings and

trophozoites. Schizonts were not present in peripheral bloodstream due to microvasculature sequestration. Error bars represent s.e.m..

Fig. 6. A. Effect of inhibition of melatonin receptor in C3H mice infected by *P. berghei* sporozoites. Liver infection load was measured by qRT-PCR analysis of *P. berghei* 18S rRNA in liver extracts taken 40 h after sporozoite i.v. injection, and plotted as a percentage of the mean of negative control samples. The plot represents 3 independent experiments (n=18). No statistical significances were observed. B. Effect of 400nM melatonin on infection of mouse primary hepatocytes by *P. berghei* sporozoites. Infection rates were calculated for each sample well as the number of EEFs, plotted as a percentage relative to the mean of negative control samples. Results are expressed as the mean $\pm$ s.d. of triplicate in 3 independent experiments.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 5

Figure 6