Laura Nogueira da Cruz

Estudos de fisiologia comparativa de modelos de malária em roedor

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientação: Prof[a]. Dr[a]. Célia Regina da Silva Garcia

SÃO PAULO
2010

Cruz, L.N. **Estudos de fisiologia comparativa de modelos de malária em roedor**. 2010 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

RESUMO

Malária é um dos principais problemas de saúde nos países em desenvolvimento. Causado pelo protozoário do gênero *Plasmodium* o mesmo induz atividade proteolítica durante o ciclo celular. Já o Ca^{2+} é um sinalizador celular ubiquitário que parece regular a atividade proteolítica através de mudanças na concentração intracelular enquanto purinas atuam através de receptores purinérgicos e representam uma das mais antigas estratégias de sinalização de diferentes filos. Proteases são fundamentais para o desenvolvimento do *Plasmodium*, mas a função do Ca^{2+} e da sinalização purinérgica ainda não foi totalmente compreendida.

No presente trabalho foi investigada a função do Ca^{2+} e da sinalização purinérgica na modulação proteolítica entre diferentes espécies de *Plasmodium* de roedor. Utilizando peptídeos com apagamento intracelular de fluorescência (FRET) verificamos a atividade proteolítica ativada por Ca^{2+} liberado do retículo endoplasmático (ER) através de estímulo com tapsigargina (inibidor de SERA) ou de compartimentos ácidos com nigericina (trocador K^+/H^+) ou monensina (trocador Na^+/H^+). As diferentes classes de proteases foram investigadas com os inibidores PMSF, E64 e Pesptatina A e a importância do Ca^{2+} verificada através do quelante de Ca^{2+} intracelular (BAPTA/AM). Em experimentos e*x vivo* realizado em *P. berghei* e *P. yoelii* o Ca^{2+} liberado do ER ativa a hidrólise dos peptídeos FRET, indicando importância do íon na modulação proteolítica observada, enquanto tratamento com BAPTA/AM seguido de tapsigargina eleva a ativação da hidrólise peptídica em *P. yoelii*, mas não em *P. berghei*. O efeito dos inibidores de protease também foi diferente entre as espécies estudadas. Pepstatina A e PMSF aumentam a resposta induzida por tapsigargina em *P.berghei*, mas diminuem em *P. yoelii*. Já o inibidor E64 diminui a proteólise em *P. berghei,* mas a estimula em *P. yoelii*. Os resultados indicam importantes diferenças na resposta proteolítica ativada por Ca^{2+} entre as espécies de *Plasmodium*.

Utilizando os peptídeos FRET foram também investigados os efeitos de ATP, adenosina e GTP extracelular na proteólise de malária de roedor. Observamos que ATP e adenosina ativam a proteólise sendo esta resposta inibida pela presença do quelante extracelular de Ca^{2+} (EGTA) ou dos antagonistas suramina e PPADS em *P. yoelii* e *P. berghei*, respectivamente. Parasitas isolados e marcados com Fluo4-AM apresentam aumento de Ca^{2+} citosólico após tratamento com ATP e adenosina, mas a presença do inibidor de P2X (TNP-ATP) não inibiu o aumento de Ca^{2+} citosólico

em *P. yoelii*. Conclui-se que receptores purinérgicos estão envolvidos na habilidade do parasita ativar proteólise intracelular através da sinalização de moléculas presentes em meio extracelular.
Na terceira parte da tese foi estabelecido um novo modelo para analisar a relação *Plasmodium*-hospedeiro através de vias de sinalização de Ca^{2+}. Sabe-se que células transfectadas com siRNA para o receptor InsP3R tipo II reduzem a apoptose celular enquanto que a proteína PfRACK causa diminuição de Ca^{2+} citosólico. No presente trabalho propõe-se que a inibição de apoptose em hepatócitos infectados ocorra através da interação do receptor InsP3R tipo II e a proteína PbRACK do parasita. Para estabelecer o modelo nocaute foram utilizados fígado e hepatócitos de camundongos controle (WT) e nocaute (KO) para o receptor InsP3R2 em ensaios de *western blots*, imunofluorescência e experimentos de sinalização de Ca^{2+} no microscópio confocal. Verificou-se que o receptor InsP3R2 está concentrado na região canalicular de camundongos WT e ausente nos fígados de camundongos KO, enquanto a expressão e a localização do receptor InsP3R1 foram mantidas, e do InsP3R3 é ausente nos camundongos WT e KO. A amplitude e o tempo de resposta dos sinais de Ca^{2+} induzidos por ATP ou vasopressina é alterada em hepatócitos que não possuem o receptor InsP3R2. Através de microscopia confocal e anticorpos policlonais para a RACK de *Plasmodium* foi observada a presença de PbRACK/PcRACK na região citosólica de parasitas nos estágios mais jovens de desenvolvimento intraeritrocítico, enquanto em esquizontes maduros a proteína se encontra próxima à membrana do eritrócito em *P. berghei*. Finalmente, o modelo de camundongo nocaute parece ser uma eficiente ferramenta para investigar a relação *Plasmodium*-hospedeiro nas vias de sinalização de Ca^{2+}.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium berghei*. *Plasmodium yoelii*. Atividade proteolítica. Modulação por Ca^{2+}. Sinalização purinérgica. FRET.

Cruz, L.N. **Comparative phisiological studies of rodent malaria models**. 2010 127 p. Ph. D. Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

ABSTRACT

Malaria is still a major health problem in developing countries. It is caused by the protist parasite *Plasmodium,* in which proteases are activated during the cell cycle. Ca^{2+} is a ubiquitous signaling ion that appears to regulate protease activity through changes in its intracellular concentration while purines acts through purinoceptors and represent the most ancient signaling strategy among different phyla. Proteases are crucial to *Plasmodium* development, but the role of Ca^{2+} and purinergic signaling in their activity is not fully understood. Here we investigate the role of Ca^{2+} and purines in protease modulation among rodent *Plasmodium* species. Using fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptides, we verified protease activity elicited by Ca^{2+} from the endoplasmatic reticulum (ER) after stimulus with thapsigargin (SERCA inhibitor) and from acidic compartments by stimulation with nigericin (K^+/H^+ exchanger) or monensin (Na^+/H^+ exchanger). Classes of affected proteases were investigated with protease inhibitors PMSF, E64 and Pepstatin A after thapsigargin treatment. Intracellular Ca^{2+} chelator (BAPTA/AM) was used to chelate intracellular Ca^{2+}. In *ex vivo* measurements of protease activity in *P. berghei* and *P. yoelii* Ca^{2+} released from the ER activated proteolysis of FRET peptides, indicating a fundamental role for calcium in modulating proteolysis. However parasite intracellular Ca^{2+} chelator led to greater FRET activation in *P. yoelii,* but not in *P. berghei.* The effects of protease inhibitors on thapsgargin-induced proteolysis also differed between both species. Pepstatin A and PMSF increased thapsigargin-induced proteolysis in *P.berghei*, but decreased it in *P. yoelii.* Conversely, E64 reduced proteolysis in *P. berghei* but stimulated it in *P.yoelii.* The data points out key differences in proteolytic responses to calcium between species of *Plasmodium.*

Using FRET peptides assay we also investigated the effects of extracellular ATP, adenosine and GTP on triggering proteolysis in rodent malária parasites. We analyzed the protease activity induced by ATP or adenosine and observed that activity is blocked when the same experiments were performed in the presence of the calcium chelator EGTA or the antagonists suramine or PPADS in *P. yoelli* and *P. berghei,* respectively. Isolated parasites loaded with Fluo4-AM and addition of ATP or adenosine in a calcium medium leads to an increase in cytosolic calcium but the presence of P2X inhibitor (TNP-ATP) did not impairs the cytosolic calcium rise triggered by ATP in *P. yoelii.* The data presented here lead us to conclude the purinergic receptor is involved in the ability of the parasite to activate intracellular proteolysis by sensing external signaling molecules.

The third part of the thesis established a model to analyze *Plasmodium* –host interaction thought Ca^{2+}signaling pathways. It has been shown that cells transfected with InsP3R type II siRNA has a decrease in apoptosis level while PfRACK cause a reduction in cytossolic Ca^{2+}. Here we propose that inhibition of apoptosis in infected hepatocytes occur thought interaction of the InsP3r type II receptor and PbRACK. To establish the knockout model we used liver and hepatocytes from wild type (WT) and knockout $InsP_3R2$ (KO) mice for western blots, confocal immunofluorescence, and time-lapse confocal imaging of Ca^{2+}. We verified that $InsP_3R2$ is concentrated in the canalicular region of WT mice but absent in livers of $InsP_3R2$ KO animals, while expression and localization of $InsP_3R1$ was preserved, and $InsP_3R3$ was absent from both WT and KO livers. Amplitude and rise time of Ca^{2+} signals induced by either ATP or vasopressin were impaired in hepatocytes lacking $InsP_3R2$. By using confocal microscopy and policlonal antibodies against *Plasmodium* Rack we have found the presence of PbRACK/PcRACK in the cytossol of early intraeritrocytic stages while at late squizonts the protein was found in close proximity with the erythrocyte membrane in *P. berghei*. Finally, the murine knockout model could be a useful tool to investigate *Plasmodium*-host interactions in Ca^{2+} signal pathways.

Keywords: Malaria. *Plasmodium berghei*. *Plasmodium yoelii*. Protease activity. Calcium modulation. Purinergic signaling. FRET.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da malária

A malária é a mais importante infecção por protozoários no mundo causando entre 300 a 600 milhões de casos com mais de 1 milhão de mortes anualmente (SNOW *et al.*, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (2009) descreve a existência de 108 países endêmicos, 43 na região africana que comportou 89% dos casos de morte em 2008. Dos países africanos mais da metade dos casos se concentram na Nigéria, República Democrática do Congo, Etiópia, República da Tanzânia e Quênia. Entre os casos ocorridos fora da região africana os países mais afetados são Índia, Sudão, Myanmar, Bangladesh, Indonésia, Papua Nova Guiné e Paquistão (Figura 1).

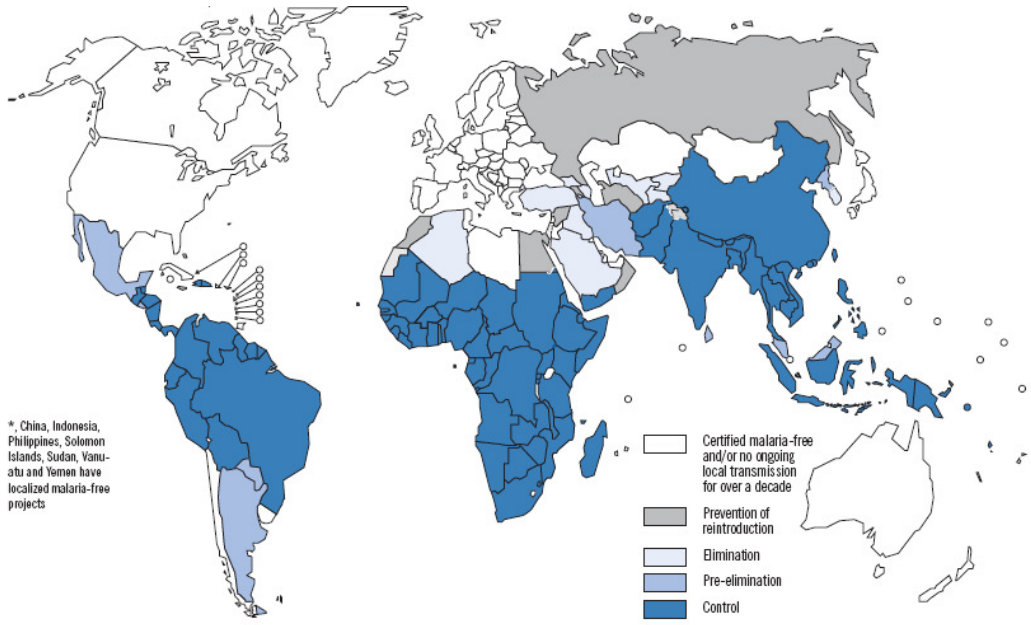

Figura 1 - Mapa de distribuição e controle global de malária (OMS, 2009).
Fonte: <http://www.who.int/malária/publications/atoz/9789241563901/en/index.html>

No Brasil, a OMS descreve que no período de 2001-2007 mais de 350.000 casos foram reportados anualmente, sendo o número máximo em 2005, com mais de 600.000 casos. Em 2008 os casos foram reduzidos para

315.642 sendo 15% devido a infecção por *P. falciparum* (OMS, 2009) (Figura 2A).

A transmissão ocorre principalmente na Região da Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão) onde 10-15% da população está em risco (Figura 2B).

A **B**

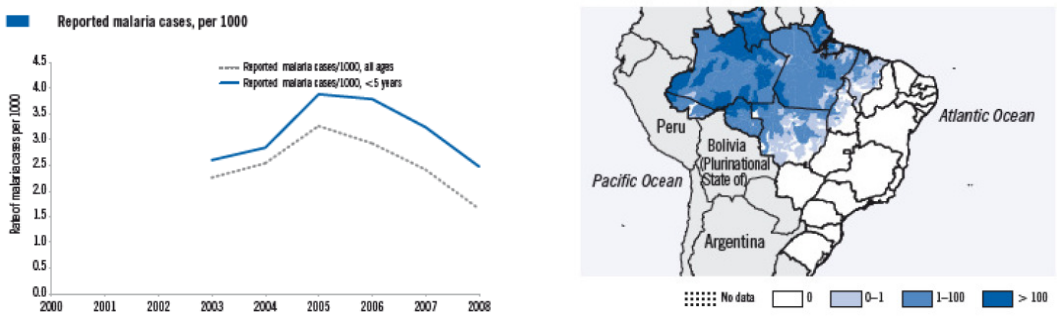

Figura 2 - Mapa de distribuição de malária (A); número de casos estimados de malária no Brasil (B) (OMS, 2009).
Fonte:<http://www.who.int/malária/publications/atoz/9789241563901/en/index.htm>

O investimento financeiro do Governo do Brasil para o combate da doença foi crescente nos últimos anos e embora o apoio financeiro internacional seja crescente ainda é bastante baixo.

A combinação atual de métodos indicados para combater a malária inclui redes tratadas com inseticida de ação prolongada, tratamento utilizando multi medicamentos para diminuir a seleção de parasitas resistentes a determinada droga, pulverização intradomiciliária com inseticida e tratamento preventivo intermitente na gravidez (OMS, 2009).

1.2 Combate à malária

Nos últimos cinquenta anos muitas pesquisas foram realizadas fomentando o desenvolvimento de drogas sintéticas antimaláricas, mas a incidência da doença ainda aumenta em determinadas áreas endêmicas. Tal fato ocorre devido a diversos fatores como mudanças climáticas globais que

afetam a distribuição e desempenho de animais ectodérmicos (exemplo, mosquito vetor da malária), aumento das áreas com atividade extrativa mineral descontrolada, desmatamento e ao deslocamento da população em direção às cidades.

Os deslocamentos nacionais e internacionais ocasionam aumento das zonas endêmicas, além da distribuição das cepas de *Plasmodium* resistentes à cloroquina, ampliando um grande problema no combate a malária, pois esta droga era utilizada como primeira linha em tratamento por sua baixa toxicidade, efetividade contra todas as formas da malária, estabilidade química e baixo custo (OLLIARO *et al.*, 1996; NUWAHA, 2001).

Limitações da quimioterapia no controle da malária demonstram a necessidade de novas drogas, preferencialmente contra novos alvos (MCKERROW *et al.*, 1993; ROSENTHAL, 1998); pois apesar de todas as pesquisas e informações adicionais o número de casos de malária vem aumentando e uma vacina eficiente provavelmente não estará disponível no futuro próximo (HOFFMAN e MILLER, 1996). Além disso os esforços para controlar o mosquito *Anopheles* tiveram pouco sucesso (ALONSO *et al.*, 1991).

1.3 Ciclo de vida do *Plasmodium*

Em 1846, o fisiologista italiano, Giovanni Rasori associou sintomas da malária à presença de um parasita, mas apenas em 1880 parasitas vivos foram observados no sangue retirado de um soldado do exército francês pelo médico Charles Louis Alphone Laveran.

Após descrição parcial das fases intraeritrocíticas do parasita da malária, Camillo Golgi observou que o início da febre coincidia com a ruptura das hemácias e liberação dos parasitas. Em 1897, os parasitas foram encontrados no estômago de mosquitos e posteriormente confirmado por Ronald Ross que a transmissão da doença ocorre através dos mesmos.

Atualmente é conhecido que em vertebrados, a infecção se inicia pela picada do mosquito *Anopheles*, fêmea, que retira 3 a 4 microlitros de sangue, enquanto injeta a saliva contendo anticoagulante e alguns esporozoítos. Os

parasitas podem então se movimentar na derme até encontrarem um vaso sanguíneo (AMINO *et al.*, 2006). Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos invadem os hepatócitos e se desenvolvem para o estágio assexuado de merozoíto. Durante este período a infecção é assintomática e cada esporozoito sofre multiplicação assexuada formando 30.000 merozoítos (MOTA *et al.*, 2001; BANNISTER *et al.*, 2003). Estes entram novamente na corrente sanguínea, invadem os eritrócitos e amadurecem passando pelos estágios de anel, trofozoíto e esquizonte. Por um processo ainda desconhecido, alguns merozoítos não invadem os eritrócitos e se diferenciam em gametócitos, a forma infectante do mosquito (BANNISTER *et al.*, 2000; GARCIA *et al.*, 2001).

Os gametócitos masculinos (microgametócito) e femininos (macrogametócito) são ingeridos pelo mosquito *Anopheles* durante a picada e se unem no trato digestivo do inseto para formar o zigoto. Ao se desenvolver, este se torna móvel (oocineto) e invade a parede do intestino médio formando o oocisto. O oocisto cresce e se rompe liberando esporozoítos que migram até a glândula salivar e serão transmitidos ao hospedeiro vertebrado (ENSERINK, 2000).

Uma ilustração do ciclo do *Plasmodium* em humanos pode ser observada na figura 3.

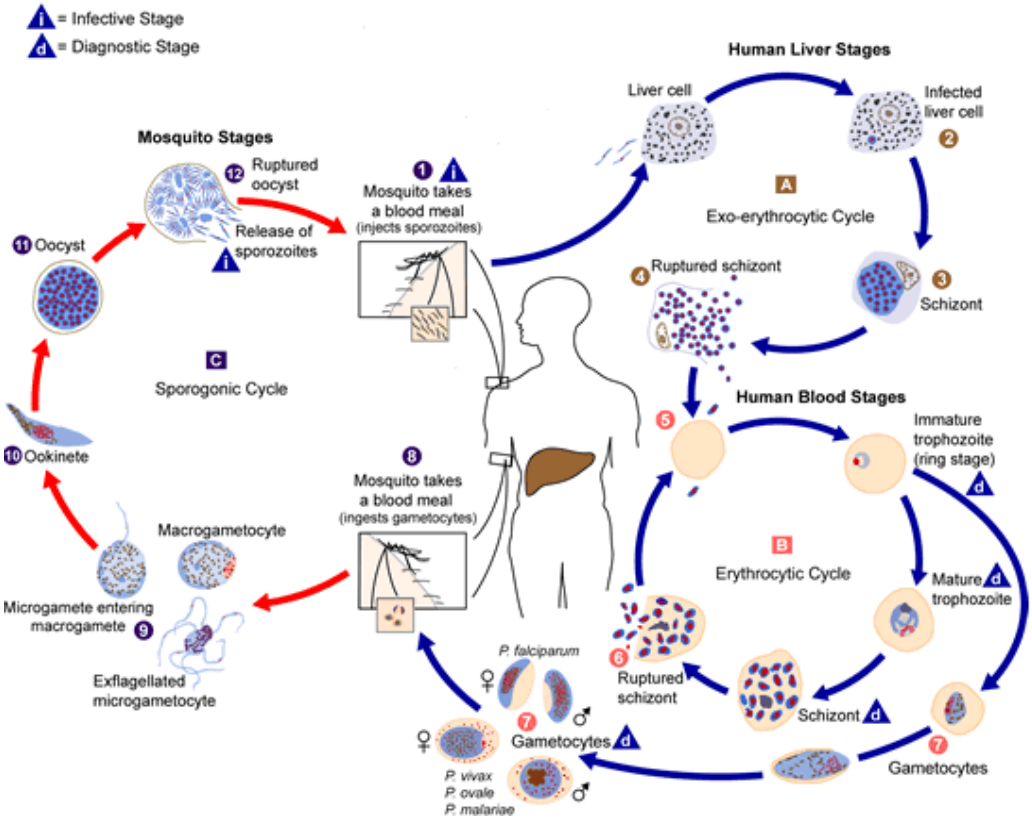

Figura 3 - Ciclo de vida da malária em humanos
Fonte: <http://www.cdc.gov/malária/biology/life_cycle.htm>.

Durante o desenvolvimento intraeritrocítico, o parasita adquire formato mais globular e com alta taxa metabólica. Ocorre, então a síntese de novas proteínas exportadas para a membrana eritrocitária, dentre elas PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein* 1) em *P. falciparum* (MARTI *et al.*, 2004).

A função da PfEMP1 é promover o aumento da aderência dos eritrócitos infectados aos vasos sanguíneos retardando a passagem e eliminação dessas células pelo baço. Sabe-se que os parasitas da malária exportam proteínas além de sua membrana plasmática e modificam extensivamente o citosol e membrana plasmática do eritrócito.

A natureza do mecanismo, em que o *Plasmodium* gradativamente altera a membrana plasmática eritrocitária e viabiliza tanto a passagem de nutrientes quanto a eliminação de metabólitos, ainda é uma área de conclusões controversas. O nome NPP (*New Permeation Pathways*) dado atualmente à tal mudança induzida pelo parasitismo reflete a incerteza de se tratar de uma via

de canal único ou múltiplo (LAUER *et al.*, 1997). Há ainda o questionamento sobre o tamanho limite das macromoléculas que acessam o interior do parasita e se há fusão real ou apenas justaposição entre a membrana do vacúolo parasitóforo e a membrana do eritrócito.

O parasita portanto modifica radicalmente as propriedades da membrana plasmática da célula hospedeira, inserindo proteínas que geram NPP ou estão envolvidas com mecanismos imunológicos de invasão.

Há ainda crescente evidência que *Maure´s clefts* (estruturas membranosas derivadas do parasita presente no citoplasma da célula hospedeira) tenham papel crucial como compartimento intermediário para o tráfico de proteínas através da membrana citoplasmática do parasita e a membrana do eritrócito (LANZER *et al.*, 2006).

Maure´s clefts estão ancorados no citoesqueleto do eritócito parasitado sendo formados no início do ciclo intraeritrocítico, após invasão (LANZER *et al.*, 2006).

1.4 Papel da melatonina no ciclo do *Plasmodium*

Como citado acima, o ciclo eritrocítico é o responsável por toda manifestação clínica na malária, sendo na ruptura do eritrócito infectado e consequente liberação do parasita para infecção de novas células que ocorrem febre e tremedeira, típicas da doença (HAWKING e GAMMAGE, 1970). Dependendo da espécie de parasita, estes sintomas ocorrem em intervalos distintos – 3 ou 4 dias para *P. falciparum* e *P. vivax*, respectivamente (GARCIA *et al.*, 2001).

A transição do estágio intraeritrocítico, bem como o processo de invasão *in vivo* e a produção de gametócitos são processos altamente sincronizados (HAWKING e GAMMAGE, 1970). A tabela 1 demonstra o período intraeritrocítico de diversas espécies de *Plasmodium*, podendo ser observado que parasitas de mamíferos e aves seguem ciclos múltiplos de 24 h.

Tabela 1 – Período do ciclo intraeritrocítico de diversas espécies de *Plasmodium*.

Parasita	Hospedeiro vertebrado	Período do ciclo intraeritrocítico
P. knowlesi	Primata	24 h
P. cathemerium	Pássaro	24 h
P. vinckei	Roedor	24 h
P. chabaudi	Roedor	24 h
P. berghei	Roedor	24 h
P. yoelii	Roedor	18 h
P. gallinaceum	Galinha	36 h
P. falciparm	Homem	48 h
P. vivax	Homem	48 h
P. cynomolgi	Primata	48 h
P. coatneyi	Primata	48 h
P. malériae	Homem	72 h
P. inui	Pássaro	72 h
P. brasilianum	Primata	72 h

Fonte: Garcia *et al.* (2001), adaptado com autorização.

Em 2000, foi proposto que o parasita da malária subverte o sistema endócrino do hospedeiro e utiliza o hormônio melatonina para sincronizar o ciclo celular (HOTTA *et al.*, 2000). Em infecções *in vitro*, *P. chabaudi* teve o número de células invadidas aumentado com o aumento da concentração de melatonina no meio. É conhecido que a ruptura dos eritrócitos infectados (e portanto sincronização na invasão de novas células) ocorre entre meia noite e 3 h da manhã (CAMBIE *et al.*, 1990) coincidindo com a secreção de melatonina nos vertebrados (KLEIN *et al.*, 1983).

Bagnaresi *et al.* (2009) observaram que parasitas de roedores diferem em características relacionadas uma vez que os parasitas *P. berghei* e *P. yoelii* são menos sincrônicos do que *P. chabaudi* e não respondem ao hormônio melatonina (BAGNARESI *et al.*, 2009).

A melatonina tem grande espectro de atuação (vertebrados, plantas e protozoários) podendo ser sintetizada em vários tecidos, porém sua síntese rítmica é confinada primariamente à retina e à glândula pineal. Este hormônio é

sintetizado a partir de serotonina, que está presente em grande quantidade na glândula pineal (SKENE *et al.*, 1991; DUBBELS *et al.*, 1995; HARDELAND *et al.*, 1995).

A conversão da serotonina para melatonina envolve duas enzimas (N-acetil transferase e hidroxindole-O-metiltransferase) (KLEIN *et al.*, 1983) sendo a melatonina e seu precursor N-acetilserotonina (NAS) liberados na corrente sanguínea (PANG *et al.*, 1980). O esquema de produção de melatonina em humanos pode ser observado na figura 4.

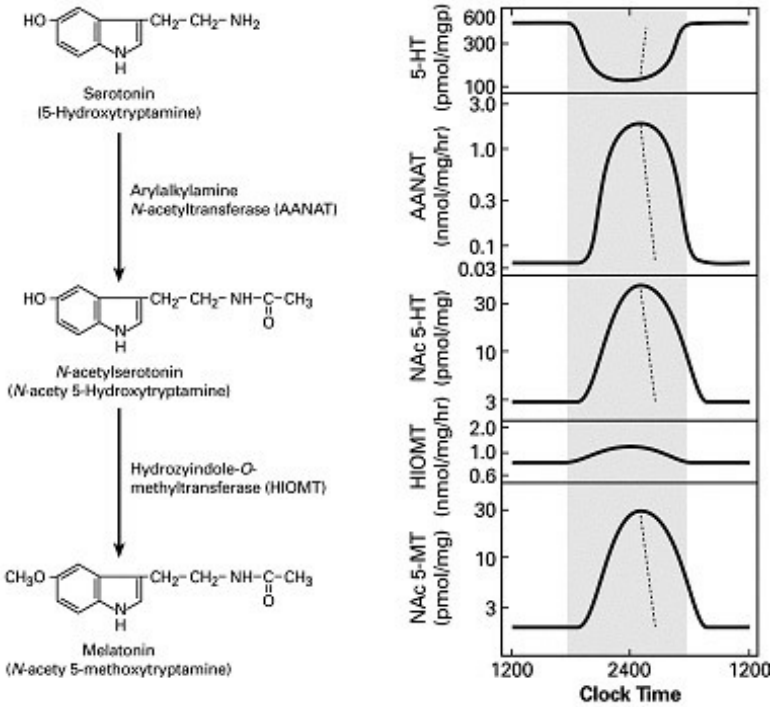

Figura 4 – Modelo da síntese de melatonina.
Fonte: <http://2001annualreport.nichd.nih.gov/ldn/sne.html>.

Hotta *et al.* (2000) reportaram que, em *Plasmodium*, a melatonina é capaz de ativar a cascata da fosfolipase C que, por sua vez, ativa a via de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e libera Ca^{2+} do retículo endoplasmático (ER), demonstrado na figura 5 (HOTTA *et al.*, 2000). Quando o ER é previamente

depletado de Ca^{2+} com tapsigargina, a adição de melatonina não promove um aumento de Ca^{2+} (HOTTA *et al.*, 2000).

Outros autores descrevem que a melatonina induz a geração de IP3 em diferentes sistemas biológicos como célula do melanoma (EISON e MULLINS, 1993), cérebro de galinha (POPOVA e DUBOCOVICH, 1995) e em dinoflagelados (TSIM *et al.*, 1997).

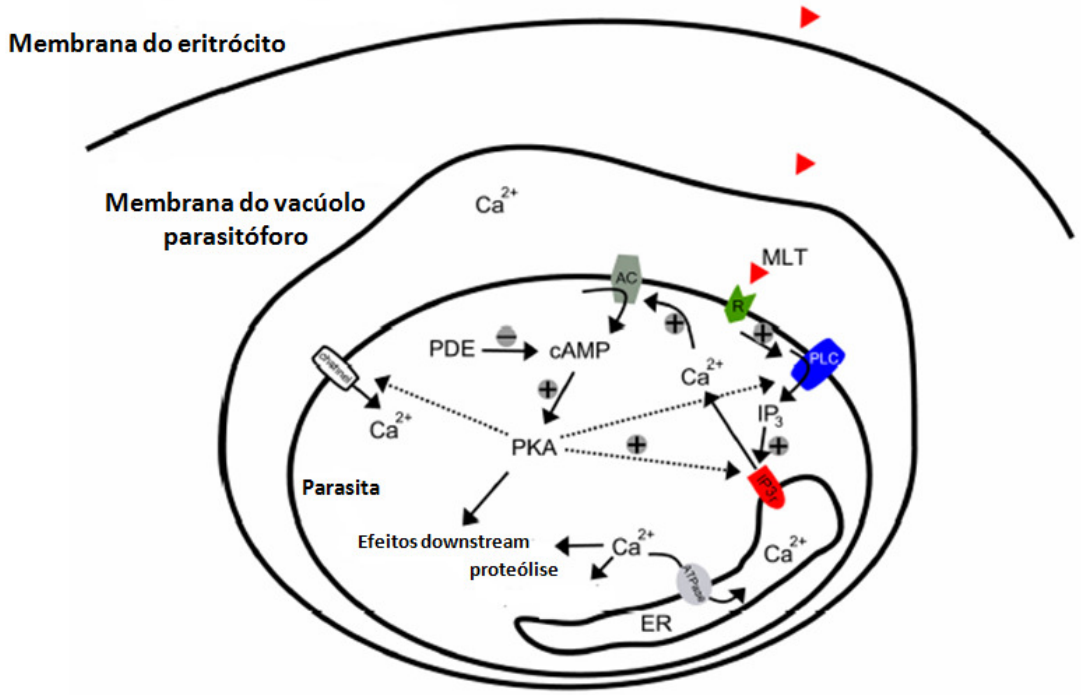

Figura 5 – Modelo esquemático dos eventos de sinalização pela melatonina em *Plasmodium*. R, hipotético receptor para melatonina; MLT, melatonina; AC, adenilil ciclase; PLC, fosfolipase C; PDE, fosfodiesterase; PKA, proteína quinase A; ER, retículo endoplasmático.
Fonte: Beraldo *et al.*(2005), modificado com autorização.

Além do *Plasmodium*, outros organismos utilizam sinais moleculares externos como moduladores da diferenciação. As amebas, por exemplo, modulam o encistamento através da presença de hormônios derivados de catecolaminas (COPPI *et al.*, 2002) e fungos induzem a diferenciação celular através de moléculas secretadas (KUGLER *et al.*, 2000). Em muitos casos a sensibilização ao ambiente externo e consequente transdução de sinal intracelular ocorre através de receptores acoplados à membrana que ativam

cascatas de reações através de segundos mensageiros e moléculas efetoras (KOYAMA *et al.*, 2009).

A mais ampla família conhecida de receptores é a GPCR (*G-protein coupled receptors*) sendo o Ca^{2+} e cAMP (adenosina monofosfato cíclico) importantes segundos mensageiros, promovendo diversas respostas intracelulares (KOYAMA *et al.*, 2009).

1.5 Homeostasia e sinalização por cálcio

Variações na concentração de cálcio intracelular exercem papel fundamental em muitos processos biológicos de células eucarióticas, como organização do citoesqueleto, divisão e diferenciação celular (BERRIDGE e IRVINE, 1984; CARAFOLI, 1987; PUTNEY e BIRD, 1993).

Respostas rápidas são reguladas por aumento rápido e localizado de Ca^{2+}, enquanto respostas lentas são controladas por transientes gerais repetitivos ou ondas intracelulares de cálcio como a exocitose, que ocorre em microsegundos, a transcrição de genes e a proliferação celular, que podem demorar de minutos a horas (BERRIDGE *et al.*, 2000; BERRIDGE *et al.*, 2003).

O cálcio utilizado nestes processos pode ser derivado de compartimentos internos ou do meio externo. As células eucarióticas possuem mecanismos para manter a homeostasia de Ca^{2+}. Estes mecanismos incluem uma bomba de cálcio na membrana plasmática, no retículo endoplasmático, além de trocadores em organelas intracelulares (PASSOS e GARCIA, 1997; GARCIA *et al.*, 1998).

Especificamente, para o parasita da malária foi demonstrada a existência de três compartimentos de Ca^{2+}: o clássico retículo endoplasmático (GARCIA *et al.*, 1996; PASSOS e GARCIA, 1997; VAROTTI *et al.*, 2003), o compartimento ácido (GARCIA *et al.*, 1998; VAROTTI *et al.*, 2003) e a mitocôndria (GAZARINI e GARCIA, 2004).

Sabe-se que, em *Plasmodium falciparum*, o Ca^{2+} extracelular é indispensável no processo de invasão do eritrócito pelo parasita (MCCALLUM-DEIGHTON e HOLDER, 1992) e estudos fisiológicos mostram envolvimento da

sinalização de Ca^{2+} no processo de maturação do parasita (HOTTA *et al.*, 2000; GAZARINI *et al.*, 2003).

Como qualquer célula eucariótica, o citoplasma do eritrócito possui baixa concentração de cálcio (100 nM), sendo que o ambiente extracelular encontrado pela maior parte das células eucarióticas situa-se ao redor de 1 mM. A ausência de Ca^{2+} extracelular é normalmente incompatível com as funções normais da célula e sua sobrevivência.

Em 2003, foi proposto que a solução para este problema seria a invaginação que ocorre na membrana citoplasmática do eritrócito no momento da infecção. Neste momento ocorre a formação do vacúolo parasitóforo (VP) que inverte a polaridade da Ca^{2+} ATP*ase* da membrana, bombeando ativamente Ca^{2+} para o interior do VP e mantendo, deste modo, o ambiente de alta concentração de Ca^{2+} necessário ao desenvolvimento do parasita. (GAZARINI *et al.*, 2003). Como pode ser observado em modelo esquemático da figura 6.

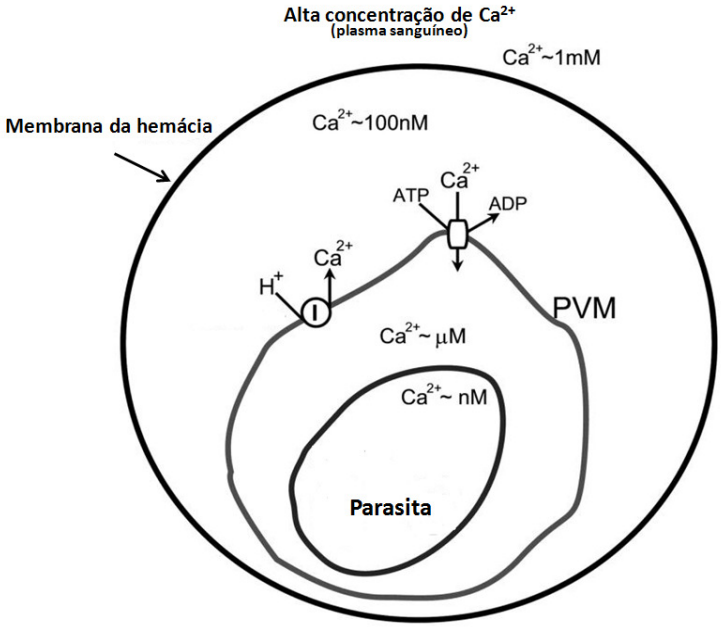

Figura 6 – Modelo esquemático da compartimentalização do cálcio em eritrócito de mamífero infectado com *Plasmodium*.
Fonte: Gazarini *et al.* (2003), modificado com autorização.

1.6 Enzimas proteolíticas em *Plasmodium*

Enzimas proteolíticas desempenham funções importantes no ciclo de vida dos protozoários causadores da leshmaniose, doença de Chagas, toxoplasmose, giardíase e malária (ROSENTHAL, 1999).

Várias proteases foram identificadas e caracterizadas como sendo utilizadas pelos protozoários em diferentes funções, tais como: invasão de células e tecidos do hospedeiro, degradação de mediadores da resposta imune e hidrólise de proteínas para suprir necessidades nutricionais do parasita (ROSENTHAL, 1999).

Até recentemente, as proteases foram classificadas em quatro classes sendo três delas (serina, cisteína e aspartil proteases) assim denominadas pela existência de sítio de aminoácido chave e a metaloprotease, pela necessidade do íon metálico para catálise (NEURATH, 1989; BARRETT, 1994) Em 1995 e 2004 foram adicionados, respectivamente, as treoninas e o ácido glutâmico à classificação (SEEMULLER *et al.*, 1995; FUJINAGA *et al.*, 2004).

De acordo com o banco de dados MEROPS *the peptidase database*, as treoninas foram classificadas pela presença de resíduos terminais de treonina para a catálise (SEEMULLER *et al.*, 1995) enquanto, até o momento, as proteases classificadas como glutâmicas foram apenas descritas em bactérias, arqueobactérias e fungos (FUJINAGA *et al.*, 2004).

Em *Plasmodium falciparum* foram identificadas, a partir de sequências homólogas, 92 proteases putativas pertencentes a 26 famílias diferentes. Destas, análises de *microarray* indicam que pelo menos 83 sejam transcritas durante o ciclo celular e 67 majoritariamente transcritas na fase assexuada (WU *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2008).

Os mecanismos de transporte em proteínas de *Plasmodium* têm sido objeto de estudo de diversos laboratórios (BINDER e KIM, 2004; DAHL e ROSENTHAL, 2005; HALDAR *et al.*, 2006; DASARADHI *et al.*, 2007). Em 2004, dois grupos independentes identificaram uma curta sequência de

aminoácidos que seria o sinal codificador para exportar a proteína do parasita para o citosol do eritrócito (HILLER *et al.*, 2004; MARTI *et al.*, 2004).

Várias proteases estão localizadas no vacúolo digestório que pode ser considerado um lisossomo especializado responsável pela degradação da hemoglobina. As moléculas de hemoglobina são retiradas do citosol do eritrócito e levadas para o vacúolo digestório (VD). Este vacúolo tem características de pH ácido e contém proteases (LANZER, 2007).

Um dos aspectos fisiológicos importantes do *Plasmodium* é, portanto, a utilização de hemoglobina como fonte de aminoácido livre. Sua capacidade de síntese é limitada e a quantidade de aminoácido livre no eritrócito não é suficiente para as necessidades metabólicas do parasita (SCHEIBEL, 1988). O grupo heme, resultante da degradação da hemoglobina, é polimerizado formando os cristais de hemozoína.

Estudos de genes nocauteados para diversas proteases envolvidas na degradação da hemoglobina sugerem também que o parasita possa compensar parcialmente a clivagem da hemoglobina através de influxo de aminoácidos externos (LIU *et al.*, 2006).

O *Plasmodium falciparum* digere até 80% da hemoglobina da célula hospedeira durante a fase intraeritrocítica do ciclo celular (LEW *et al.*, 2004). Proteases de diversas classes parecem estar envolvidas na digestão de hemoglobina no vacúolo digestório incluindo quatro proteases aspárticas (plasmepsina PfPM1, PfPM2, PfHAP e PfPM4), três cisteíno proteases (falcipaína PfFP2, PfFP2' e PfP3) e a metaloprotease falcilisina (BONILLA *et al.*, 2007).

De todas as cisteíno proteases descritas no genoma, apenas as falcipaínas 1, 2, 3 foram isoladas e estão comprovadamente presentes na forma ativa no *Plasmodium* (ROSENTHAL, 2004).

O gene das falcipaína 1 encontra-se no cromossomo 14, um pouco distante das demais falcipaínas (que se encontram no cromossomo 11), possui a sequência nucleotídica bem conservada nos genes de *Plasmodium* (ROSENTHAL, 2002) fazendo deste um alvo interessante para o

desenvolvimento de drogas nas quatro espécies de *Plasmodium* que infectam humanos (GLENN *et al.*, 2006).

A falcipaína 1 presente nos estágios de anel e merozoíto (GREENBAUM *et al.*, 2002), relaciona-se à invasão eritrocitária, e o seu bloqueio, através de inibidores específicos, impede a invasão de novos eritrócitos do hospedeiro. Estudo realizado em parasitas que não expressam a falcipaína 1 demostrou que não há diferença em relação aos parasitas normais no que se refere à ruptura dos esquizontes, tempo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, ou a multiplicação do parasita (EKSI *et al.*, 2004; SIJWALI *et al.*, 2004).

As falcipaínas 2 e 2' têm sequências quase idênticas (97,5% aminoácidos com identidade entre as proteases maduras) (SHENAI *et al.*, 2000) e são semelhantes em muitos aspectos incluindo hidrólise da hemoglobina e inibição por potentes inibidores (SINGH *et al.*, 2006).

As funções da falcipaína 2 e 2' podem ser parecidas mas são expressas de maneira diferente durante o ciclo eritrocítico, sendo que a disrupção do gene da falcipaína 2 não foi complementado pelo aumento da expressão da falcipaína 2' (SIJWALI e ROSENTHAL, 2004). Parasitas nocautes para a falcipaína 2 apresentam alterações nos estágios inicias de desenvolvimento e lenta hidrólise de hemoglobina, enquanto parasitas nocautes para falcipaína 2' não apresentam alterações.

A falcipaína 3 possui sequência bastante similar a falcipaína 2 (domínio catalítico 68% idêntico) (SIJWALI *et al.*, 2001) e parece ter papel fundamental na hidrólise da hemoglobina pois as tentativas de nocautear a falcipaína 3 não funcionaram sugerindo função essencial desta protease no ciclo do parasita (SIJWALI *et al.*, 2006).

Sugere-se que a falcipaína 2 e 3 sejam sintetizadas como proteínas integrais de membrana, levadas ao vacúolo digestório através da clássica via retículo endoplasmático/Golgi, e processada por auto-hidrólise (DAHL e ROSENTHAL, 2005; DASARADHI *et al.*, 2007).

Em relação às proteases aspárticas, existem dez plasmepsinas no genoma de *P. falciparum* (plasmepsina 1-4, 5, 9 e 10) que são expressas nos estágios intraeritrocíticos. Destas, quatro são as proteases aspárticas mais

importantes do vácuolo digestivo: PM I, II, IV e HAP (histoaspártico protease ou PM III) (BINDER e KIM, 2004).

Plasmepsinas e falcipaínas são relacionadas com a liberação de parasitas da célula hospedeira, pois clivam as proteínas do citoesqueleto da membrana do eritrócito (BINDER e KIM, 2004).

Parasitas nocautes simples e duplos para plasmepsinas (PM) foram construídos eliminando cada uma das quatro proteases aspárticas. Demonstrou-se que as plasmepsinas individualmente não são essenciais ao estágio intraeritrocítico do parasita (OMARA-OPYENE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005; BONILLA *et al.*, 2007). Sugere-se que o parasita possua redundância nesta via, embora não descartada a possibilidade de cada enzima ter função única (BONILLA *et al.*, 2007).

O nocaute das quatro plasmepsinas do vacúolo digestório demonstrou que as proteases de outras classes são capazes de digerir hemoglobina suficiente para a sobrevivência do parasita, embora os parasitas nocautes cresçam e produzam hemozoína mais lentamente (BONILLA *et al.*, 2007).

Dasaradhi *et al.* (2007) reportaram que as plasmepsinas, assim como as falcipaínas, sejam proteínas do tipo II integral de membrana com domínio que parecem ter importante função no tráfico para o vacúolo digestório; entretanto o tráfego das proteínas/proteases para o vacúolo digestório ainda é pouco compreendido (DASARADHI *et al.*, 2007).

Já as serinoproteases são importantes na retirada de proteínas de superfície do merozoíto durante e após a invasão (O'DONNELL e BLACKMAN, 2005). Este processo é realizado por diferentes serino proteases sendo importante citar o grupo das rombóides que parece ter ação necessária para que o parasita prossiga ao estágio de anel (SINGH *et al.*, 2007).

Em *Plasmodium falciparum* a proteína AMA1 (*apical membrane antigen 1*) é encontrada nos merozoítos em micronemas sendo que a única protease identificada na clivagem desta proteína é a PfROM1 (*Plasmodium falciparum rhomboid 1*) (BAKER *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2007).

Outro grupo desta classe de proteases inclui as SERAs (s*erine repeat antigens*) que em *P. falciparum* possui oito genes (SERA 1-8) no cromossomo

2 e um no cromossomo 9 (SERA 9). Todos os genes de SERA são transcritos durante a forma intraeritrocítica do *Plasmodium,* mas apenas SERA 5 e 6 parecem ser essenciais para o desenvolvimento do parasita (MILLER *et al.*, 2002; HODDER *et al.*, 2003; BLACKMAN, 2008).

SERA 5 é a mais abundante em *Plasmodium falciparum,* presente no vacúolo parasitóforo e na membrana do merozoíto. Acredita-se que esteja envolvida na liberação do parasita do eritrócito e na subsequente invasão de merozoítos (MILLER *et al.*, 2002; HODDER *et al.*, 2003; BLACKMAN, 2008).

O número de genes e a expressão da SERA variam entre as diferentes espécies de *Plasmodium*, mas todos parecem conter pelo menos uma SERA (ARISUE *et al.*, 2007).

As metalo proteases são muito pouco estudadas quando comparadas com aspartico e cisteíno proteases (GARCIA *et al.*, 2008). A falcilisina, por exemplo, que é ativa em pH 5,2 e 7,2, foi inicialmente considerada apenas presente no vacúolo digestório e envolvido na quebra de hemoglobina (MURATA e GOLDBERG, 2003).

Em 2007, através da construção de falcilisina fusionada com GFP (green fluorescent protein), observou-se que a enzima está presente no apicoplasto e pode alterar as vias das proteínas exportadas para esta organela (PONPUAK *et al.*, 2007).

Outra metalo protease estudada é a DPAP1 (*dipeptidyl aminopeptidase 1*) presente no vacúolo digestório no momento da degradação da hemoglobina e ativa em pH ácido, parece ter função essencial pois estudos de nocaute inviabilizaram o parasita (KLEMBA *et al.*, 2004).

Tem sido, portanto, difícil compreender as funções específicas das enzimas em *Plasmodium* sendo que proteases do próprio hospedeiro também podem ter função no ciclo do *Plasmodium* (ROGGWILLER *et al.*, 1997; GARCIA *et al.*, 2008).

1.7 Proteases ativadas por cálcio

As calpaínas, família pertencente à classe de cisteína proteases, ocorrem em diferentes sistemas incluindo eucariotos inferiores e plantas (SORIMACHI *et al.*, 1997; MARGIS e MARGIS-PINHEIRO, 2003). Esta família de proteases é regulada por cálcio intracelular e participa em processos celulares chaves como diferenciação, apoptose, motilidade celular e ciclo celular (SORIMACHI *et al.*, 1997; SORIMACHI e SUZUKI, 2001; GLADING *et al.*, 2002).

Existem duas formas de calpaína, a µ-calpaína e a m-calpaína, que são heterodímeros com a subunidade regulatória de 28 kDa em comum. A outra subunidade com 80 kDa difere entre as formas na concentração de cálcio necessária para induzir a atividade. Em pesquisas *in vitro* a m-calpaína necessita de cálcio em concentrações milimolar, enquanto a µ-calpaína o necessita em concentrações micromolares (PERRIN e HUTTENLOCHER, 2002).

Estudos demonstraram que anquirina de eritrócito é substrato de µ-calpain, podendo haver relação entre a anquirina, quebra da proteína 4.1 e liberação do merozoíto (HALL e BENNETT, 1987). É importante ressaltar que µ-calpain (do eritrócito) é dispensável para o desenvolvimento do parasita (HANSPAL *et al.*, 2002).

No genoma do *Plasmodium falciparum* foi identificado apenas um gene para calpaína (MAL 13P1.310) com similaridade à calpaína 7 de *C. elegans* (E= 2e-35) (WU *et al.*, 2003), localizado no cromossomo 13 sendo a ORF (*open reading frame*) predita 6.1 kb, correspondendo a uma proteína de 2048 aa (MW 242 kDa) (MITCHELL e BELL, 2003; WU *et al.*, 2003).

Em 2009, análises filogenéticas demonstraram que as diversas espécies de *Plasmodium* possuem uma calpaína com homologia no domínio N terminal encontrado apenas em *Apicomplexa* e outros *alveolates* (RUSSO *et al.*, 2009).

Ao analisar o perfil de expressão da calpaína de *P. falciparum* na fase assexuada, observou-se que o pico de expressão ocorre entre os estágios de

anel e trofozoíto maduro sendo que parasitas com expressão de calpaína reduzida apresentam atraso na formação de trofozoíto (RUSSO *et al.*, 2009). Os esforços para nocautear a calpaína de *P. falciparum* não funcionaram, sugerindo função essencial desta proteína no ciclo do parasita (RUSSO *et al.*, 2009).

A diferença entre as calpaínas de mamífero e de *Apicomplexa*, e a importância da calpaína no ciclo do parasita a tornam um importante alvo para síntese de novas drogas.

1.8 Receptores purinérgicos

Em 1929, as ações extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos foram primeiro descritas por Drury e Szent-György[1] (*apud* BURNSTOCK, 2007), pois adenosina trifosfato (ATP) era apenas reconhecido como fonte de energia intracelular envolvido nas vias metabólicas.

A sinalização purinérgica parece ter surgido relativamente cedo na escala evolutiva e está envolvida em muitos processos, incluindo secreção exócrina e endócrina, resposta imune, inflamação, proliferação celular, diferenciação entre outros (BURNSTOCK, 1996).

Purinas (adenosina, adenosina difosfato-ADP e ATP) e pirimidinas (uridina difosfato-UDP e uridina trifosfato-UTP) extracelulares são, portanto, importantes moléculas sinalizadoras. Estas moléculas mediam diversos efeitos biológicos via receptores de membranas celulares os quais são designados receptores purinérgicos (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

Existem duas principais famílias de receptores purinérgicos: adenosina ou receptores P1 e receptores P2 reconhecendo primariamente ATP, ADP, UTP e UDP. Estes receptores possuem sete domínios transmembrânicos de aminoácidos hidrofóbicos e acredita-se que sejam constituídos de uma alfa-hélice de aproximadamente 21 a 28 aminoácidos (BURNSTOCK, 2007).

---

[1] DRURY A.N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J. Physiol.,** v.68, p.213–237, 1929.

Receptores do tipo P2 podem reconhecer ATP, ADP, UTP e UDP e polifosfatos, além de outros agonistas. Baseado nas diferenças das estruturas moleculares e mecanismos de transdução de sinal, estes receptores são subdivididos em duas famílias: receptores de canal iônico e receptores acoplados à proteína G, chamados de receptores P2X e P2Y, respectivamente (RALEVIC e BURNSTOCK, 1998).

Os receptores tipo P2X mediam uma rápida (cerca de 10 ms) passagem de cátions (Na^+, K^+, Ca^{2+}) através da membrana plasmática resultando num aumento de Ca^{2+} e despolarização (DUBYAK e EL-MOATASSIM, 1993). A passagem direta de Ca^{2+} através do canal constitui uma importante maneira de se aumentar o Ca^{2+} citossólico.

Tabela 2 – Famílias de receptores purinérgicos

	Receptores P1	**Receptores P2**	
Ligantes exógenos	Adenosina	ATP, ADP, UTP, UDP e dinucleotídeos de adenina	
Subgrupo	A	P2X	P2Y
Tipo de receptor	Acoplados à proteína G	Canal iônico	Acoplados à proteína G
Subtipos	A1, A2a, A2b, A3	P2X1-7; P2Xn	P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12
Efetores	InsP3, Ca^{2+}, AMPc	Na^+, K^+ e Ca^{2+}	InsP3, Ca^{2+}, AMPc e DAG

Fonte: Adaptado de Ralevic e Burnstock (1998).

No geral existem evidências farmacológicas suficientes para acreditar na existência das duas subclasses de receptores: uma seletiva para adenosina e outra para ATP em invertebrados e vertebrados inferiores. É especulado que o receptor P2Y atua via adenilato ciclase em paralelo com receptores P1 que apenas posteriormente divergiram para atuar via IP3 como segundos mensageiros (BURNSTOCK, 2007).

Com relação ao papel do ATP em *Plasmodium*, Rangachari *et al.* (1986), mostraram que *P. falciparum* não é capaz de invadir eritrócitos depletadas de ATP (RANGACHARI *et al.*, 1986). Recentemente foi reportado que eritrócitos

infectados com *P. falciparum* apresentam aumento da concentração de ATP no citossol, indicando um papel relevante deste nucleotídeo na infecção por *Plasmodium* (AKKAYA *et al.*, 2009).

1.9 Proteínas adaptadoras RACK em *Plasmodium*

Receptores de quinase C, RACK (*Receptor for Activated C Kinase*), são proteínas que agem como âncora em diversas vias de sinalização, interagindo com proteínas diversas tais como PKC (*Protein Kinase C*), subunidade beta da proteína G, receptor de InsP3R e outros (SCHECHTMAN e MOCHLY-ROSEN, 2001; CHEN *et al.*, 2004; PATTERSON *et al.*, 2004).

Foi demonstrado em célula de mamífero que RACK1 age como proteína âncora que coordena a ligação tanto da PKC ativada quanto de proteínas contendo domínios pleckstrina (PH), algumas das quais são substratos de PKCm (RODRIGUEZ *et al.*, 1999). Esta ligação simultânea constitui um meio de trazer PKC para a proximidade com seus substratos, permitindo maior eficiência na fosforilação do substrato.

A figura 7 apresenta um modelo da ativação da PKC pela RACK. A PKC em sua forma inativa apresenta-se numa conformação fechada que esconde o sítio de ligação da RACK, a qual é formada devido à existência de um domínio auto-inibitório na própria PKC que se liga ao domínio de ligação ao substrato. A presença de ativadores de PKC, como fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DG) e $Ca^{2+,}$ provoca uma mudança conformacional na PKC, exibindo o domínio de ligação à RACK. Esta liga-se então à PKC, e altera sua estrutura para um estado com atividade ainda maior (RON e MOCHLY-ROSEN, 1995).

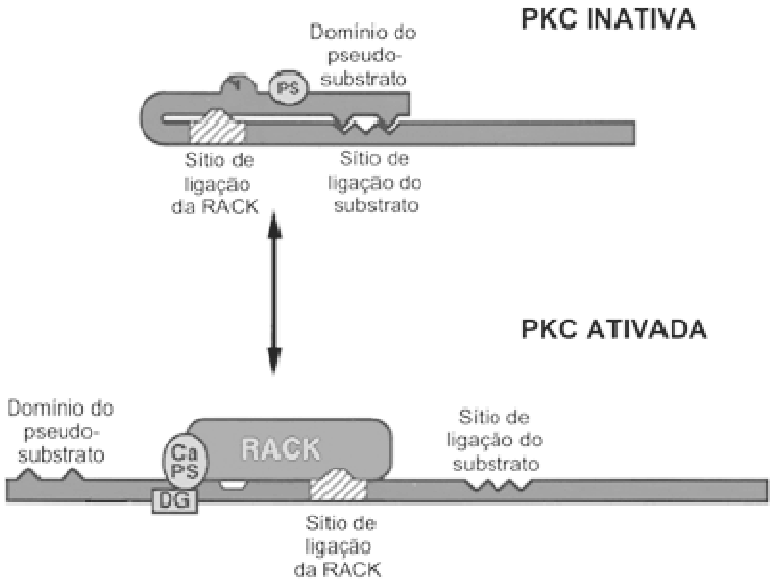

Figura 7 – Receptor de quinase C ativada e domínios de interação proteína-proteína.
Fonte: Adaptado de Mochly-Rosen e Gordon (1998).

.

A PfRACK (*Plasmodium falciparum receptor for activated C kinase*) possui domínios conservados para a ligação de PKC, o que sugere sua função celular. Porém, não foi detectada atividade de PKC em P*. falciparum* (HALL *et al.*, 1997) e análises genômicas levaram à conclusão de que o parasita não possui nenhuma quinase desta classe (WARD *et al.*, 2004; ANAMIKA, Srinivasan *et al.*, 2005).

Em células de eucariotos as PKCs estão envolvidas na regulação de muitas funções, como diferenciação, crescimento e secreção celular, ativando várias vias de transdução de sinal pela fosforilação de proteínas alvo (LIU, 1996). A ausência de PKC em *P. falciparum* parece ser explicada pela presença da PfPKB (*Plasmodium falciparum protein kinase B*) que possui 65% de homologia com a PKC de mamíferos, além disso são encontradas diferenças bioquímicas significativas em relação a PKB (*protein kinase B*) de mamíferos (KUMAR *et al.*, 2004).

Vaid e Sharma (2006) identificaram a calmodulina como regulador *upstream* da atividade da PfPKB. Nesta nova via de sinalização proposta para *P. falciparum* as incubações com inibidores de fosfolipase C (U73122)

bloqueiam a sinalização via IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) e previne a liberação de cálcio, inibindo a atividade da PfPKB. Deste modo o cálcio parece ser modulador da atividade PfPKB (VAID e SHARMA, 2006).

Em 2003, nosso laboratório identificou, clonou e expressou o ortólogo de RACK em *P. falciparum* (MADEIRA *et al.*, 2003). Dando contínuidade ao trabalho, experimentos funcionais demonstraram que a presença da PfRACK inibe a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático em células de mamífero transfectadas (SARTORELLO *et al.*, 2009).

Deste modo o aumento citoplasmático de Ca^{2+} após estímulo com o nucleotídeo ATP é reduzido na presença de PfRACK (SARTORELLO *et al.*, 2009) e sugere o envolvimento do receptor InsP3R, presente no retículo endoplasmático, como alvo de interação da proteína.

1.10 Receptores InsP3R

Hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento iniciam a sinalização celular através de mecanismos variados (BERRIDGE, 1993). Sabe-se que o receptor localizado no retículo endoplamático InsP3R (receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato) aumenta a concentração de Ca^{2+} citoplasmático após a ligação de InsP3 (Figura 8) (BERRIDGE, 2008). Existem três isoformas do receptor InsP3R (tipo I, II ou III) e diferenças na expressão e distribuição celular de acordo com o tecido, sugerindo diferenças nas funções dos mesmos.

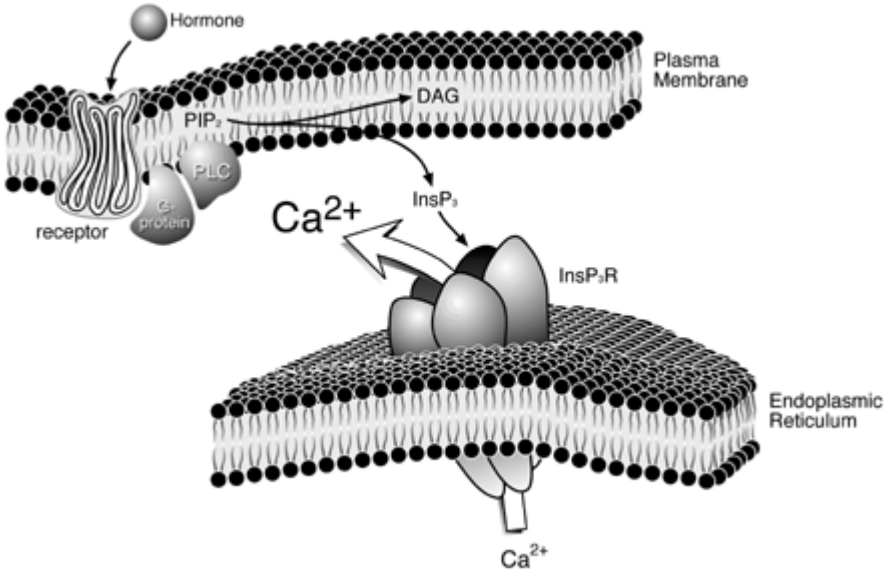

Figura 8 – Modelo da sinalização de Ca^{2+} através dos receptores de InsP3R.
Fonte: <http://www.cellbiology.yale.edu/faculty/nathanson_m/nathanson_m.html>

Os receptores InsP3R possuem aproximadamente 2000 aminoácidos que incluem sítios de fosforilação por quinase como proteína quinase A (PKA), cGMP-quinase dependente (PKG), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase II calmodulina-cálcio dependente (CamKII).

A atividade de InsP3R é modulada por adenosina trifosfato (ATP), proteínas acessórias como fosfoinositol bifosfato (PIP2) e Ca^{2+} (LUPU *et al.*, 1998; HAGAR e EHRLICH, 2000). Sinais de Ca^{2+} podem variar em tempo e espaço de acordo com o tipo celular estudado. Em células epiteliais ocorrem ondas polarizadas ou específicas de Ca^{2+} para determinadas regiões subcelulares (KASAI e AUGUSTINE, 1990; KASAI *et al.*, 1993; THORN *et al.*, 1993).

Sabe-se ainda que o aumento de Ca^{2+} intracelular é tipicamente iniciado na membrana apical, local onde o receptor InsP3R do tipo II encontra-se concentrado. Esta localização apical indica a importância desta isoforma de receptor InsP3R na fase inicial da sinalização de Ca^{2+} (NATHANSON *et al.*, 1994).

Um importante evento mediado por Ca^{2+} que pode ser influenciado pelo InsP3R é a apoptose (KHAN *et al.*, 1996; HIROTA *et al.*, 1999; ASSEFA *et al.*,

2004) que morfologicamente causa condensação da cromatina e fragmentação do DNA (KERR *et al.*, 1972).

Em 2005, foi demonstrado que as isoformas InsP3R tipo I, II e III podem induzir apoptose em proporções variadas e acredita-se que esta variação seja devido à distância do receptor em relação à mitocôndria (MENDES *et al.*, 2005).

Sabe-se que a presença de merozoíto no fígado diminui o número de hepatócitos que entram em apoptose (HEUSSLER *et al.*, 2006; STURM *et al.*, 2006) e sugere-se que isto ocorra devido ao bloqueio de liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático através do receptor InsP3R na presença da proteína RACK do parasita.

1.11 Efeitos funcionais de sinais de Ca^{2+} em hepatócitos: secreção biliar

Ca^{2+} regula a secreção em diferentes tipos de epitélios (NATHANSON, 1994) e já foi demonstrado que diversos agonistas de Ca^{2+} como o hormônio vasopressina, o inonóforo A123187 e o inibidor de Ca^{2+} ATPase *t*BuBHQ diminuem a secrecão biliar em hepatócitos (NATHANSON, 1994).

Acredita-se que o Ca^{2+} possa inibir a secreção biliar, em parte, devido ao aumento da permeabilidade de *tight junction* que permite o refluxo da bile no espaço sinosóico. Ondas de Ca^{2+} polarizadas ocorrem em hepatócitos, mas os efeitos dessas ondas ainda não foram totalmente estabelecidos (NATHANSON *et al.*, 1994).

O transportador orgânico MRP2 (*Multidrug Resistence Protein 2*) é responsável pela secreção biliar de diversos ânions orgânicos. Para a secreção biliar ocorrer de maneira adequada o transportador utlliza-se de vesículas para migrar da região basolateral para a região apical da membrana do hepatócito (SOROKA *et al.*, 1999).

Na região apical do hepatócito o transportador MRP2 localiza-se próximo ao receptor InsP3R tipo II. Foi anteriormente demonstrado que a presença de cAMP influência a redistribuição deste transportador em hepatócitos (ROELOFSEN *et al.*, 1998) e acredita-se que a distribuição do transportador

seja regulada pela liberação de Ca^{2+} a partir do receptor InsP3R tipo II (CRUZ *et al.*, no prelo).

6 CONCLUSÕES

A partir do uso de peptídeos com apagamento intramolecular de fluorescência foi possível concluir que a atividade proteolítica observada é induzida pela presença de Ca^{2+} proveniente do retículo endoplasmático em *Plasmodium berghei* e *P. yoelii*

Utilizando-se o inibidor de SERCA tapsigargina e o quelante de Ca^{2+} (Bapta-AM), sugere-se que a atividade de proteases moduladas pela ausência de Ca^{2+} é maior que a atividade de proteases ativadas pelo íon em *P. yoelii*. Já a mobilização de Ca^{2+} a partir de organelas ácidas através dos ionóforos nigericina e monensina não demonstraram envolvimento destas organelas na proteólise observada em *P. berghei*.

Os inibidores das diferentes classes de proteases (E64, PMSF ou pesptatina A) mostram que a modulação proteolítica ocorre de maneira distinta para cada espécie de *Plasmodium*, sendo as vias de proteólise complexas e com possível redundância.

Conclui-se, também, que o hormônio melatonina não modifica a atividade proteolítica em *P. berghei* e não altera a expressão relativa dos genes PFB0360c (cisteíno protease, putativa), PFB0335c (cisteíno protease, putativa) e PFB0345c (cisteíno protease, putativa) em *P. falciparum* no estágio trofozoíto.

Na segunda parte da tese, indica-se através dos fármacos ATP e adenosina a presença de receptor purinérgico em *Plasmodium berghei e P. yoelii*. Os antagonistas suramina e PPADS inibem a atividade proteolítica observada em *P. yoelii* e *P. berghei,* respectivamente, mas devido à sua falta de especificidade ainda não é possível determinar qual(is) receptor(es) purinégico(s) está(ão) presente(s) nas espécies de *Plasmodium* estudadas.

Utilizando-se o quelante intracelular e extracelular de Ca^{2+} (Bapta-AM e EGTA), indica-se ainda que a atividade do possível receptor purinérgico depende de Ca^{2+} externo em *P. yoelii*.

Foi então verificado que a adição de adenosina (10 µM) e ATP (50, 70 e 200 µM) no meio extracelular promove aumento de Ca^{2+} citossólico em *P.*

yoelii, mas o antagonisma TNP-ATP (50 µM) não bloqueia a liberação de Ca^{2+} intracelular observada após adição de ATP (50 µM).

A terceira parte da tese, realizada no laboratório sob responsabilidade do Dr. Michael H. Nathanson na *Yale University* (New Haven, CT) teve como objetivo padronizar o modelo murino nocaute do receptor InsP3 tipo II, pois este estudo abre perspectivas novas para investigar mecanismos de sinalização de Ca^{2+} em *Plasmodium*.

Nesta direção nossos resultados com a proteína PbRACK mostraram que esta é expressa em *P. berghei* e *P. chabaudii* e encontra-se na região citoplasmática do parasita durante os diferentes estágios intraeritrocíticos. Em *P. berghei* a proteína encontra-se na membrana do eritrócito durante a fase esquizonte.

No modelo murino, observa-se, através de *Western Blot* e ensaio de imunofluorescência, que os camundongos nocaute para o receptor InsP3R tipo II não expressam este receptor enquanto a expressão das isoformas InsP3R tipo I e III não foi alterada.

Após utilizar o marcador Fluo4-AM observa-se, em hepatócitos de camundongos nocaute para o receptor InsP3R tipo II, que a liberacão de Ca^{2+} intracelular é menor, com tempo de resposta mais lento, e menor porcentagem de células responde ao estímulo de ATP (100 µM) e vasopressina (100 nM).

O peso do fígado do camundongo nocaute (KO) para o receptor InsP3R tipo II é menor quando comparado ao camundongo controle (WT), embora o peso total do animal, volume de secreção biliar e concentração total de bilirubina no plasma não sejam diferentes.

Através de ensaio de imunofluorescência, foi observada a presença do transportador aniônico MRP2 nos camundongos controle (WT) e nocaute (KO) para o receptor InsP3R tipo II na região apical dos hepatócitos, sendo que o mesmo encontra-se próximo ao receptor InsP3R tipo II.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[2]

AKKAYA, C. *et al.* The Plasmodium falciparum-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. **Pflugers. Arch.**, v.457, n.5, p.1035-47, 2009.

ALONSO, P. L. *et al.* The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. **Lancet**, v.337, n.8756, p.1499-502, 1991.

ALVES, L. C. *et al.* Synthesis of N alpha-protected aminoacyl 7-amino-4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. **Pept. Res.**, v.9, n.2, p.92-6, 1996.

AMINO, R. *et al.* Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nat. Med.**, v.12, n.2, p.220-4, 2006.

ANAMIKA, N. *et al.* A genomic perspective of protein kinases in Plasmodium falciparum. **Proteins**, v.58, n.1, p.180-9, 2005.

ARASTU-KAPUR, S. *et al.* Identification of proteases that regulate erythrocyte rupture by the malária parasite Plasmodium falciparum. **Nat. Chem. Biol.**, v.4, n.3, p.203-13, 2008.

ARISUE, N. *et al.* Phylogeny and evolution of the SERA multigene family in the genus Plasmodium. **J. Mol. Evol.**, v.65, n.1, p.82-91, 2007.

ASSEFA, Z. *et al.* Caspase-3-induced truncation of type 1 inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-

[2] De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

independent calcium release during apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.41, p.43227-36, 2004.

BAGNARESI, P. *et al*. Unlike the synchronous Plasmodium Falciparum and P. chabaudi infection, the P. berghei and P. yoelii asynchronous infections are not affected by melatonin. **Int. J. Gen. Med.**, v.2, p.47-55, 2009.

BAKER, R. P. *et al.* Two Plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malária. **PLoS Pathog.**, v.2, n.10, p.e113, 2006.

BANNISTER, L. H. *et al.* Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. **J. Cell. Sci.**, v.116, n.18, p.3825-34, 2003.

BANNISTER, L. H. Ultrastructure of rhoptry development in Plasmodium falciparum erythrocytic schizonts. **Parasitology**, v.121, p.273-87, 2000.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases In: _____. **Methods in enzymology.** California: Academic Press, 1994. p.1-15.

BERALDO, F. H. *et al.* Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of Plasmodium falciparum cell cycle. **J. Cell. Biol.**, v.170, n.4, p.551-7, 2005.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v.361, n.6410, p.315-25, 1993.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1793(6), p.933-40, 2009. Review.

BERRIDGE, M. J. *et al.* Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.4, p.517-29, 2003.

BERRIDGE, M. J.; R. F. IRVINE. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature**, v.312, n.5992, p.315-21, 1984.

BERRIDGE, M. J. *et al.* The versatility and universality of calcium signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.1, n.1, p.11-21, 2000.

BINDER, E. M.; K. KIM. Location, location, location: trafficking and function of secreted proteases of Toxoplasma and Plasmodium. **Traffic**, v.5, n.12, p.914-24, 2004.

BLACKMAN, M. J. Malárial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade. **Cell. Microbiol.**, v.10, n.10, p.1925-34, 2008.

BONILLA, J. A. *et al.* Critical roles for the digestive vacuole plasmepsins of Plasmodium falciparum in vacuolar function. **Mol. Microbiol.**, v.65, n.1, p.64-75, 2007.

BURNSTOCK, G. Development and perspectives of the purinoceptor concept. **J. Auton. Pharmacol.**, v.16, n.6, p.295-302, 1996.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, v.87, n.2, p.659-797, 2007.

CAMBIE, G. *et al.* Timing niches of 3 species of Plasmodium coexisting in a rodent in Central Africa. **C. R. Acad. Sci. III**, v.310, n.5, p.183-8, 1990.

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annu. Ver. Biochem.**, v.56, p.395-433, 1987.

CARMONA, A. K. *et al.* The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. **An. Acad. Bras. Cienc.,** v.81, n.3, p.381-92, 2009.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **Ciclo de vida da malária em humanos**. Disponível em <http://www.cdc.gov/malária/biology/life_cycle.htm> Acesso em: 08 fev.2010.

CHEN, S., *et al.* RACK1 regulates specific functions of Gbetagamma. **J. Biol. Chem**., v.279, n.17, p.17861-8, 2004.

COPPI, A., *et al.* The enteric parasite Entamoeba uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.10, p.8083-90, 2002.

CRUZ, L. N. *et al*. Regulation of Mrp2 by calcium signalling. **Hepatology**. 2010. No prelo.

DAHL, E. L.; ROSENTHAL, P.J. Biosynthesis, localization, and processing of falcipain cysteine proteases of Plasmodium falciparum. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.139, n.2, p.205-12, 2005.

DAME, J. B. *et al.* Plasmepsin 4, the food vacuole aspartic proteinase found in all Plasmodium spp. infecting man. **Mol. Biochem. Parasitol**., v.130, n.1, p.1-12, 2003.

DASARADHI, P. V. *et al.* Food vacuole targeting and trafficking of falcipain-2, an important cysteine protease of human malária parasite Plasmodium falciparum. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.156, n.1, p.12-23, 2007.

DUBBELS, R. *et al.* 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, 1995.

DUBYAK, G. R.; ELl-MOATASSIM, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. **Am. J. Physiol.**, v.265, n.3, p.C577-606, 1993.

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.PL393-8, 1993.

EKSI, S. *et al.* Targeted disruption of Plasmodium falciparum cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth. **Mol. Microbiol.**, v.53, n.1, p.243-50, 2004.

ENSERINK, M. Mosquito engineering. Building a disease-fighting mosquito. **Science**, v.290, n.5491, p.440-1, 2000.

ERSMARK, K. *et al.* Plasmepsins as potential targets for new antimalárial therapy. **Med. Res. Rev.**, v.26, n.5, p.626-66, 2006.

FARIAS, S. L. *et al.* Cysteine-protease activity elicited by Ca2+ stimulus in Plasmodium. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.141, n.1, p.71-9, 2005.

FiIELDS, R. D.; Burnstock, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.7, n.6, p.423-36, 2006.

FUJINAGA, M. *et al.* The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from Scytalidium lignicolum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.10, p.3364-9, 2004.

GARCIA, C. R. *et al.* Acidic calcium pools in intraerythrocytic malária parasites. **Eur. J. Cell. Biol.**, v.76, n.2, p.133-8, 1998.

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

GARCIA, C. R. *et al.* Calcium homeostasis in intraerythrocytic malária parasites. **Eur. J. Cell. Biol.**, v.71, n.4, p.409-13, 1996.

GARCIA, C. R. *et al.* Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malárial infection. **J. Biol. Rhythms.**, v.16, n.5, p.436-43, 2001.

GAZARINI, M. L.; GARCIA, C. R. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca2+ fluctuations. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.321, n.1, p.138-44, 2004.

GAZARINI, M. L. *et al.* Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malária parasite solves the problem. **J. Cell. Biol.**, v.161, n.1, p.103-10, 2003.

GLADING, A. *et al.* Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. **Trends Cell. Biol.**, v.12, n.1, p.46-54, 2002.

GLENN, M. P. *et al.* Structurally simple, potent, Plasmodium selective farnesyltransferase inhibitors that arrest the growth of malária parasites. **J. Med. Chem.**, v.49, n.19, p.5710-27, 2006.

GRAF, J. *et al.* Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, n.20, p.6516-20, 1984.

GREENBAUM, D. C. *et al.* A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malária parasite. **Science**, v.298, n.5600, p.2002-6, 2002.

HAGAR, R. E.; EHRLICH, B. E. Regulation of the type III InsP(3) receptor by InsP(3) and ATP. **Biophys. J.**, v.79, n.1, p.271-8, 2000.

HALDAR, K. Intracellular trafficking in Plasmodium-infected erythrocytes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.1, n.4, p.466-71, 1998.

HALDAR, K. S. *et al.* Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.4, n.12, p.922-31, 2006.

HALL, B. S. *et al.* Modulation of protein kinase C activity in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Blood**, v.89, n.5, p.1770-8, 1997.

HALL, T. G.; BENNETT, V. Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.22, p.10537-45, 1987.

HANSPAL, M. *et al.* Erythrocyte calpain is dispensable for malária parasite invasion and growth. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.122, n.2, p.227-9, 2002.

HARDELAND, R. *et al.* 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.104-11, 1995.

HAWKING, F.; GAMMAGE, K. The timing of the asexual cycles of Plasmodium lophurae and of P. cathemerium. **J. Parasitol.**, v.56, n.1, p.17-26, 1970.

HEUSSLER, V. *et al.* Regulation of host cell survival by intracellular Plasmodium and Theileria parasites. **Parasitology**, v.132, p.S49-60, 2006.

HILLER, N. L. *et al.* A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malárial infection. **Science**, v.306, n.5703, p.1934-7, 2004.

HIRATA, K. *et al.* The type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor can trigger Ca2+ waves in rat hepatocytes. **Gastroenterology**, v.122, n.4, p.1088-100, 2002.

HIROTA, J. *et al.* Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is a substrate for caspase-3 and is cleaved during apoptosis in a caspase-3-dependent manner. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.48, p.34433-7, 1999.

HODDER, A. N. *et al.* Enzymic, phylogenetic, and structural characterization of the unusual papain-like protease domain of Plasmodium falciparum SERA5. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.48, p.48169-77, 2003.

HOFFMAN, S. L.; MILLER L. H. Perspectives on malária vaccine development. In: HOFFMAN S. L. (Ed.). **Malaria vaccine development:** a multi-immune response approach. Washington: The American Society for Microbiology Whashington; 1996. p.1-13.

HOTTA, C. T. *et al.* Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malárial parasites. **Nat. Cell. Biol.**, v.2, n.7, p.466-8, 2000.

KASAI, H.; AUGUSINE, J. Cytosolic Ca2+ gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. **Nature**, v.348, n.6303, p.735-8, 1990.

KASAI, H. *et al.* Subcellular distribution of Ca2+ release channels underlying Ca2+ waves and oscillations in exocrine pancreas. **Cell**, v.74, n.4, p.669-77, 1993.

KERR, J. F. *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v.26, n.4, p.239-57, 1972.

KHAN, A. A. *et al.* Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **Science**, v.273, n.5274, p.503-7, 1996.

KLEIN, D. C. *et al.* Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.80, n.2, p.599-603, 1983.

KLEMBA, M. *et al.* A Plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.41, p.43000-7, 2004.

KLEMBA, M.; GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annu. Rev. Biochem.**, v.71, p.275-305, 2002.

KLEMBA, M. Characterization of plasmepsin V, a membrane-bound aspartic protease homolog in the endoplasmic reticulum of Plasmodium falciparum. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.143, n.2, p.183-91, 2005.

KOYAMA, F. C. *et al.* Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in Plasmodium. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.165, n.1, p.1-7, 2009.

KUGLER, S. T. *et al.* Phenotypic variation and intracellular parasitism by histoplasma Capsulatum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, n.16, p.8794-8, 2000.

KUHN, Y. *et al.* Quantitative pH measurements in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes using pHluorin. **Cell. Microbiol.**, v.9, n.4, p.1004-13, 2007.

KUMAR, A. *et al.* PfPKB, a novel protein kinase B-like enzyme from Plasmodium falciparum: Identification, characterization, and possible role in parasite development. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.23, p.24255-64, 2004.

LANZER, M. *et al.* Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Int. J. Parasitol.**, v.36, n.1, p.23-36, 2006.

LANZER, M. Subcellular pH and Ca2+ in Plasmodium falciparum: Implications for understanding drug resistance mechanisms. **Current Science**, v.92, n.11, p.1561-70, 2007.

LAUER, S. A. *et al.* A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malária parasite. **Science**, v.276, n.5315, p.1122-5, 1997.

LEW, V. L. *et al.* Excess haemoglobin digestion by malária parasites: a strategy to prevent premature host cell lysis. **Blood Cells Mol. Dis.**, v.32, n.3, p.353-9, 2004.

LIU, J. *et al.* The role of Plasmodium falciparum food vacuole plasmepsins. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.2, p.1432-7, 2005.

LIU, J. *et al.* Plasmodium falciparum ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, n.23, p.8840-5, 2006.

LIU, J. P. Protein kinase C and its substrates. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.116, n.1, p.1-29, 1996.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8, 2001.

LUPU, V. D. *et al.* Functional coupling of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.23, p.14067-70, 1998.

MADEIRA, L. *et al.* Human malária parasites display a receptor for activated C kinase ortholog. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.306, n.4, p.995-1001, 2003.

MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Phytocalpains: orthologous calcium-dependent cysteine proteinases. **Trends Plant Sci.**, v.8, n.2, p.58-62, 2003.

MARTI, M. *et al.* Targeting malária virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. **Science**, v.306, n.5703, p.1930-3, 2004.

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.317-23, 1992.

MCKERROW, J. H. *et al.* The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.47, p.821-53, 1993.

MENDES, C. C. *et al.* The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca2+ signals into mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.49, p.40892-900, 2005.

MEROPS. **The peptidase database.** Disponível em <http://merops.sanger.ac.uk/>. Acesso em: 08 fev.2010.

MILLER, S. K. *et al.* A subset of Plasmodium falciparum SERA genes are expressed and appear to play an important role in the erythrocytic cycle. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.49, p.47524-32, 2002.

MITCHELL, D.; BELL, A. PEST sequences in the malária parasite Plasmodium falciparum: a genomic study. **Malar. J.**, v.2, p.16, 2003.

MOCHLY-ROSEN, D.; GORDON, A. S. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. **Faseb. J.**, v.12, n.1, p.35-42, 1998.

MOTA, M. M. *et al.* Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. **Science**, v.291, n.5501, p.141-4, 2001.

MURATA, C. E.; GOLDBERG, D. E. Plasmodium falciparum falcilysin: a metalloprotease with dual specificity. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.39, p.38022-8, 2003.

NATHANSON, M. H. Cellular and subcellular calcium signaling in gastrointestinal epithelium. **Gastroenterology**, v.106, n.5, p.1349-64, 1994.

NATHANSON, M. H. *et al.* Multistep mechanism of polarized Ca2+ wave patterns in hepatocytes. **Am. J. Physiol.**, v.267, n.3 Pt 1, p.G338-49, 1994.

NEURATH, H. **The diversity of proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989.

NUWAHA, F. The challenge of chloroquine-resistant malária in sub-Saharan Africa. **Health Policy. Plan.**, v.16, n.1, p.1-12, 2001.

O'DONNELL, R. A.; BLACKMAN, J. The role of malária merozoite proteases in red blood cell invasion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.8, n.4, Aug, p.422-7. 2005.

OLLIARO, P. *et al.* Malária, the submerged disease. **Jama**, v.275, n.3, p.230-3, 1996.

OMARA-OPYENE, A. L. *et al.* Genetic disruption of the Plasmodium falciparum digestive vacuole plasmepsins demonstrates their functional redundancy. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.52, p.54088-96, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Mapa de distribuição e controle global de malária**. Disponível em <http://www.who.int/malária/publications/atoz/9789241563901/en/index.html > Acesso em: 08 fev. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Mapa de distribuição de malária e número de casos estimados de malária no Brasil**. Disponível em <http://www.who.int/malária/world_malária_report_2009/all_mal2009_profiles.pdf> Acesso em: 08 fev. 2010.

PANG, S. F. *et al.* Diurnal rhythms of immunoreactive N-acetylserotonin and melatonin in the serum of male rats. **Acta. Endocrinol.**, v.95, n.4, p.571-6, 1980.

PASSOS, A. P.; GARCIA, C. R. Characterization of Ca2+ transport activity associated with a non-mitochondrial calcium pool in the rodent malária parasite P. chabaudi. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.42, n.5, p.919-25, 1997.

PATTERSON, R. L. *et al.* RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca2+ release. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.8, p.2328-32, 2004.

PERRIN, B. J.; HUTTENLOCHER, A. Calpain. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.34, n.7, p.722-5, 2002.

PONPUAK, M. *et al.* A role for falcilysin in transit peptide degradation in the Plasmodium falciparum apicoplast. **Mol. Microbiol.**, v.63, n.2, p.314-34, 2007.

POPOVA, J. S.; DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptor-mediated stimulation of phosphoinositide breakdown in chick brain slices. **J. Neurochem.**, v.64, n.1, p.130-8, 1995.

PUTNEY, J. W.; BIRD, G. S. The signal for capacitative calcium entry. **Cell**, v.75, n.2, p.199-201, 1993.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v.50, n.3, p.413-92, 1998.

RAMBAUT, A. *et al.* Bi-De: an application for simulating phylogenetic processes. **Comput. Appl. Biosci.**, v.12, n.6, p.469-71, 1996.

RANGACHARI, K. *et al.* Control of malárial invasion by phosphorylation of the host cell membrane cytoskeleton. **Nature**, v.324, n.6095, p.364-5, 1986.

RODRIGUEZ, M. M. *et al.* RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. **Biochemistry**, v.38, n.42, p.13787-94, 1999.

ROELOFSEN, H. *et al.* Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. **J. Cell. Sci.**, v.111, p.1137-45, 1998.

ROGGWILLER, E. *et al.* Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malária merozoites from infected erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.86, n.1, p.49-59, 1997.

ROHRBACH, P. *et al.* Quantitative calcium measurements in subcellular compartments of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.30, p.27960-9, 2005.

RON, D.; MOCHLY-ROSEN, D. An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, n.2, p.492-6, 1995.

ROSENTHAL, P. J. Proteases of malária parasites: new targets for chemotherapy. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, n.1, p.49-57, 1998.

ROSENTHAL, P. J. Proteases of protozoan parasites. **Adv. Parasitol.**, v.43, p.105-59, 1999.

ROSENTHAL, P. J. Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malária parasites. **Curr. Opin. Hematol.**, v.9, n.2, p.140-5, 2002.

ROSENTHAL, P. J. Cysteine proteases of malaria parasites. **Int. J. Parasitol.**, v.34, n.13-14, p.1489-99, 2004.

RUSSO, I. *et al.* A calpain unique to alveolates is essential in Plasmodium falciparum and its knockdown reveals an involvement in pre-S-phase development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.106, n.5, p.1554-9, 2009.

SARTORELLO, R. *et al.* The plasmodium receptor for activated C kinase protein inhibits Ca2+ signaling in mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.389, n.4, p.586-92, 2009.

SCHECHTMAN, D.; MOCHLY-ROSEN, D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. **Oncogene**, v.20, n.44, p.6339-47, 2001.

SCHEIBEL, L. A. S. Plasmodium metabolism and related organellar function during various stages of life-cycle: Proteins, lipids, nucleic acids and vitamins. In: WERNSDORFER, W. H.; McGREGOR, I. (Ed.). **Malaria, principles and practice of malariology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988. p.219-252.

SEEMULLER, E. *et al.* Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease. **Science**, v.268, n.5210, p.579-82, 1995.

SHENAI, B. R. *et al.* Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of Plasmodium falciparum. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.37, p.29000-10, 2000.

SIJWALI, P. S. *et al.* Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malária parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.23, p.8721-6, 2004.

SIJWALI, P. S. *et al.* Gene disruptions demonstrate independent roles for the four falcipain cysteine proteases of Plasmodium falciparum. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.150, n.1, p.96-106, 2006.

SIJWALI, P. S; ROSENTHAL, P. J. Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by Plasmodium falciparum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, n.13, p.4384-9, 2004.

SIJWALI, P. S. *et al.* Expression and characterization of the Plasmodium falciparum haemoglobinase falcipain-3. **Biochem. J.**, v.360, n.2, p.481-9, 2001.

SINGH, N. *et al.* Plasmodium falciparum: biochemical characterization of the cysteine protease falcipain-2'. **Exp. Parasitol.**, v.112, n.3, p.187-92, 2006.

SINGH, S. *et al.* Mononeme: a new secretory organelle in Plasmodium falciparum merozoites identified by localization of rhomboid-1 protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.104, n.50, p.20043-8, 2007.

SKENE, D. J. *et al.* 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.405-11, 1991.

SNOW, R. W. *et al.* The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malária. **Nature**, v.434, n.7030, p.214-7, 2005.

SORIMACHI, H. *et al.* Structure and physiological function of calpains. **Biochem J.**, v.328, p.721-32, 1997.

SORIMACHI, H.; SUZUKI, K. The structure of calpain. **J. Biochem.**, v.129, n.5, p.653-64, 2001.

SOROKA, C. J. *et al.* Canalicular export pumps traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.37, p.26416-24, 1999.

STAMATAKIS, A. *et al.* A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. **Syst. Biol.**, v.57, n.5, p.758-71, 2008.

STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malária parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v.313, n.5791, p.1287-90, 2006.

Thompson, J. D. *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids. Res.**, v.25, n.24, p.4876-82, 1997.

THORN, P. *et al.* Local and global cytosolic Ca2+ oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. **Cell**, v.74, n.4, p.661-8, 1993.

TSIM, S. T. *et al.* Calcium ion dependency and the role of inositol phosphates in melatonin-induced encystment of dinoflagellates. **J. Cell Sci.**, v.110, p.1387-93, 1997.

VAID, A.; SHARMA, P. PfPKB, a protein kinase B-like enzyme from Plasmodium falciparum: II. Identification of calcium/calmodulin as its upstream activator and dissection of a novel signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v.281, n.37, p.27126-33, 2006.

VAROTTI, F. P. *et al.* Plasmodium falciparum malária parasites display a THG-sensitive Ca2+ pool. **Cell Calcium**, v.33, n.2, p.137-44, 2003.

VON KUGELGEN, I.; WETTER, A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v.362, n.4-5, p.310-23, 2000.

WARD, P. *et al.* Protein kinases of the human malária parasite Plasmodium falciparum: the kinome of a divergent eukaryote. **BMC Genomics**, v.5, n.1, p.79, 2004.

WU, Y. *et al.* Data-mining approaches reveal hidden families of proteases in the genome of malária parasite. **Genome Res.**, v.13, n.4, p.601-16, 2003.

ZIMMERNAN, M. *et al.* A new fluorogenic substrate for chymotrypsin. **Anal Biochem.**, v.70, n.1, p.258-62, 1976.