LUCAS BORGES PEREIRA

Caracterização da apirase do parasita *P.* falciparum e análise do papel do Ca²⁺ no egresso de *T. gondii*

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

São Paulo 2015

LUCAS BORGES PEREIRA

Caracterização da apirase do parasita *P.* falciparum e análise do papel do Ca²⁺ no egresso de *T. gondii*

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Célia Regina da Silva Garcia

Versão original

São Paulo 2015 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pereira, Lucas Borges.

Caracterização da apirase do parasita P. falciparum e análise do papel do Ca²⁺ no egresso de *T. gondii /* Lucas Borges Pereira. – São Paulo, 2015.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia celular e molecular de parasitas.

Versão do título para o inglês: Characterization of *P. falciparum* apyrase and analysis of the role of Ca²⁺ in *T. gondii* egress.

1. Plasmodium falciparum 2. Toxoplasma gondii 3. Apirase 4. Cálcio 5. Egresso 6. GCaMP3 I. Garcia, Profa. Dra. Célia Regina da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0189/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Lucas Borges Pereira.
Título da Tese:	Caracterização da apirase do parasita <i>P. falciparum</i> e análise do papel do Ca ²⁺ no egresso de <i>T. gondii.</i>
Orientador(a):	Profa. Dra. Célia Regina da Silva Garcia.
A Comissão J	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
públi	ca realizada a, considerou
	() Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Of.CEPSH. 034.11 PMAZ/mcgn

São Paulo, 29 de março de 2011.

Prezada Senhora,

Em adendo ao Projeto "*Expressão heteróloga e caracterização bioquímica de aspirase do parasita Plasmodium falciparum*" sob a responsabilidade do aluno LUCAS **BORGES PEREIRA,** informo que houve uma reanalise e que o mesmo foi considerado *isento por não existir manipulação diretamente com seres humanos.*

Atenciosamente,

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

Ilma Sra. Profa. Dra. CÉLIA REGINA DA SILVA GARCIA Departamento de Parasitologia Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

À minha mãe e à memória do meu amado irmão Thiago

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram e estiveram presentes ao meu lado durante este doutorado.

À Professora Célia Garcia o meu muito obrigado. Gostaria de poder escrever o quanto importante foi sua orientação, paciência e cumplicidade por todos estes anos, mas acho que isso seria tema para outro trabalho. Obrigado por aceitar aquele jovem estudante inexperiente vindo do interior de Minas e dar a ele a oportunidade de ingressar em uma das melhores universidades brasileiras.

Agradeço à minha mãe. Meu porto seguro. A vida não foi fácil com a gente não é mesmo? Mas aqui estamos. Sem ela essa caminhada teria sido impossível. Obrigado por estar sempre ao meu lado.

Ao meu pai e meus familiares. Obrigado pelo apoio, mensagens e por cuidarem tão bem de mim.

Aos meus "irmãos" Tonielli e Douglas. Vocês são os irmãos que a vida me deu.

Aos meus amigos. E tenho a sorte de dizer que são muitos. Obrigado!

Aos amigos e companheiros de laboratório, atuais ou ausentes. Obrigado pelos ensinamentos e pelas risadas durante a pesquisa. Em especial a Myna, Miriam, Fahyme, Alexandre, Maneesh, Laura, Mateus, Pedro, Giu e Kênia.

À Professora Silvia Moreno. Obrigado pelo incentivo e por acreditar em mim quando eu mesmo não acreditava.

Ao Professor Rosário Rizzuto e sua equipe, em especial a Professora Anna Rafaello a quem posso hoje chamar de amiga.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

"Não sabendo que era impossível, foi lá e fez."

Jean Cocteau

RESUMO

BORGES-PEREIRA, L. **Caracterização da apirase do parasita** *P. falciparum* **e análise do papel do Ca²⁺ no egresso de** *T. gondii*. 2015. 139 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) -. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Plasmodium falciparum é o agente etiológico da forma mais grave da malária em humanos. Apesar dos inúmeros esforços para a erradicação da malária, este parasita ainda faz milhares de vítimas fatais todos os anos. E-NTPDases (apirases) são enzimas capazes de degradar nucleotídeos extracelulares em seus constituintes bi e monofosfatados. A presença destas enzimas em parasitas já foi relatada, relacionando sua ação a mecanismos de evasão do sistema imune e captação de purinas pelo parasita. Em *P .falciparum* a presença e atividade da apirase ainda não foram relatadas, apesar de estudos de bioinformática revelarem a presença de uma ORF codificante para este gene no genoma do parasita. Nesta tese demonstramos pela primeira vez a presença de um membro desta família de enzimas em P. falciparum, o qual foi capaz de degradar ATP extracelular em taxas detectáveis. Ainda neste sentido, análises por RT-qPCR revelaram a expressão da apirase durante todo o ciclo intraeritrocítico. A adição de inibidores desta classe de enzimas foi capaz de prejudicar o desenvolvimento dos parasitas e a invasão de novas hemácias pelos merozoitos, sugerindo assim um papel da apirase nestes processos. A via de sinalização por Ca²⁺ é universal e vital para todas as células. Para melhor entender a fisiologia celular de P. falciparum construímos uma nova linhagem de parasitas transgênicos, PfGCaMP3, que nos tornam capazes de monitorar a dinâmica de Ca²⁺ nestas células sem o uso de protocolos invasivos de marcação. Estes parasitas serão especialmente importantes no estudo das oscilações de Ca²⁺ durante o desenvolvimento do parasita no interior das hemácias, como também no screening de novas drogas capazes de interferir nessa via de sinalização essencial para o parasita. Toxoplasma gondii é o protozoário parasita causador da toxoplasmose. Junto com P. falciparum, T. gondii é classificado no filo Apicomplexa, que inclui protozoários que possuem um complexo apical em algum estágio de seu desenvolvimento. Nesta tese utilizamos uma nova linhagem de T. gondii expressando de forma estável o indicador de Ca²⁺ GCaMP3 para estudar o papel deste íon no egresso do parasita. Nossos resultados demonstram que T. gondii possui o Ca²⁺ necessário para promover este processo, entretanto Ca²⁺ extracelular age como um fator intensificador neste passo essencial do ciclo lítico. A utilização de tampões em que os íons Na⁺, K⁺, Cl⁻ ou Ca²⁺ estavam ausentes e variações na concentração extracelular de K⁺ não foram capazes de bloquear o egresso de T. gondii. Estes dados demonstram que este processo ocorre mesmo na ausência destes íons do meio, sugerindo que o gatilho para o egresso possa ser independente de variações na concentração K⁺.

Palavras-chave: *Plasmodium falciparum. Toxoplasma gondii.* Apirase. Cálcio. Egresso. GCaMP3.

ABSTRACT

BORGES-PEREIRA, L. Characterization of *P. falciparum* apyrase and analysis of the role of Ca²⁺ in *T. gondii* egress. 2015. 139 p. Ph. D. thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Plasmodium falciparum is the etiological agent of the most severe form of malaria in humans. Despite numerous efforts to eradicate this disease, P. falciparum still cause thousands of deaths every year. E-NTPDases (apyrases) are enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides into its bi and monophosphate constituents. The presence of these enzymes in parasites has been reported. Their action was linked with evasion mechanisms from the immune system and purines uptake by the parasite. In *P* .falciparum the presence and activity of apyrase have not been reported vet, although bioinformatics analysis reveal the presence of a ORF coding for this gene in parasite genome. In this thesis we demonstrate for the first time the presence of a member from the apyrase family in *P. falciparum*, that was able to hydrolyze extracellular ATP at detectable rates. In addition, RT-qPCR analysis revealed the expression of apyrase throughout the intraerythrocytic cycle. Addition of apyrase inhibitors was able to impair the development of P. falciparum and the invasion of new erythrocytes by merozoites, thus suggesting a role of apyrase in these processes. Calcium signaling is universal and vital to all cells. To better understand the cellular physiology of P. falciparum we construct a new strain of transgenic parasites named PfGCaMP3. These new tool enable us monitor the Ca²⁺ dynamics in *P. falciparum* without invasive protocols. These parasites are particularly important in the study of Ca²⁺ oscillations during *P. falciparum* development within the erythrocyte. In addition could also be used in the screening of new drugs capable of interfering with this essential signaling pathway. Toxoplasma qondii is the causative agent of toxoplasmosis. Together with P. falciparum, T. gondii is classified in the phylum Apicomplexa. This phylum includes protozoans that show an apical complex at some stage in their development. In this thesis we used a new strain of T. gondii that stably express the Ca²⁺ indicator GCaMP3 to study the role of this ion in parasite egress. Our results show that *T. gondii* has the Ca²⁺ required to exit the cell. However, extracellular Ca²⁺ acts as an enhancer factor in this step of the lytic cycle. The absence of Na⁺, K⁺, Cl⁻ and Ca²⁺ and variations in the extracellular K⁺ concentration were unable to block T. gondii egress. These data demonstrate that this process occurs even in the absence of these ions the medium, suggesting that the trigger of egress could be independent of variations in the K^+ concentration.

Keywords: *Plasmodium falciparum. Toxoplasma gondii.* Apyrase. Calcium. Egress. GCaMP3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial de casos de malária. Na figura são representadas as áreas de risco de transmissão da malária onde cerca de 40% da população vive sob o risco de contágio. Fonte: <i>World Malaria Report 2013, National malaria control programme report</i>
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i> Ciclo intraeritrocítico, hepático e no mosquito. Fonte: <i>National Institutes of Health (NIH).</i>
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> . Ciclo sexuado e assexuado, envolvendo os felinos como hospedeiros definitivos e mamíferos e aves como hospedeiros intermediários. Adaptado de Black e Boothroyd (2000)21
Figura 4: Predição de região transmembrana para o gene da apirase de <i>Plasmodium falciparum.</i> Ilustração feita com o software TMRPres2D, evidenciando duas possíveis regiões transmembrana, uma localizada no N terminal e outra no C terminal da proteína. A porção extracelular da enzima foi omitida para melhor visualização
Figura 5: Isolamento da região codificante da porção solúvel da apirase de <i>P. falciparum.</i> Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultra-violeta. A canaleta PM apresenta o marcador de pares de base 1kb plus DNA ladder (invitrogen). As canaletas 1 a 5 representam condições experimentais em que não conseguimos sucesso na amplificação. A canaleta 6 representa a amplificação do gene da apirase com aproximadamente 2,4 kb
Figura 6 : Confirmação da clonagem da porção solúvel da apirase de <i>P. falciparum</i> . Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultra-violeta. A canaleta PM apresenta o marcador de pares de base 1kb plus DNA ladder (invitrogen). A canaleta 1 apresenta PCR usando como molde DNA plasmidial. A canaleta 2 apresenta reação de digestão com as enzimas Xhol e Sall do DNA plasmidial.

Figura 11: Perfil de expressão da apirase de *P. falciparum* (cepa 3D7) durante o ciclo intraeritrocítico. Fonte: Plasmodb......60

Figura 17: Egresso de *T. gondii* GCaMP₃ é relacionada com aumento intracelular de Ca²⁺. Taquizoítos intracelulares foram expostos a 1 μ M de ionomicina, em (A) observamos as células em respouso momentos antes da adição da droga, (B) um claro aumento na fluorescência indica um aumento na concentração de Ca²⁺ do parasita, (C) os parasitas começam a egressar, (D) parasitas completamente extracelulares após o tratamento com ionomicina. Barra de escala = 10 μ M.69

Figura 21: Histamina 100 μ M não é capaz de estimular aumento na fluorescência de *T. gondii* GCaMP₃. 100 μ M de histamina foi adicionada a taquizoítos extracelulares expressando GCaMP₃ e nenhum aumento de fluorescência foi observado. A adição de 1 μ M de ionomicina causou resposta indicando a viabilidade dos parasitas.......74

Figura 22: Histamina 100 μ M não é capaz de estimular a egresso de *T. gondii* GCaMP₃ via aumento citosólico de Ca²⁺. (A) células em repouso antes da adição da droga, (B) adição de 100 μ M de histamina causa um aumento na fluorescência das células HeLa infectadas e não infectadas, mas não nos parasitas (C-D) a ausência de resposta nos parasitas permanece mesmo após maiores intervalos de tempo. Em (E) temos a quantificação das alterações da fluorescência durante o experimento. Os valores foram obtidos através do software ImageJ. Barra de escala = 10 μ M.....75

Figura 26: Tampões com diferentes composições iônicas não afetam o egresso de *T. gondii*. Células HeLa infectadas foram permeabilizadas com α-toxina para estimular a saída dos parasitas na presença de diferentes tampões. (A) tampão padrão, (B) tampão Ca²⁺ free, (C) tampão Na⁺ free, (D) tampão K⁺ free, (E) tampão Cl⁻ free, (F) tampão padrão intracelular. Barra de escala=10µm......82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO1	7
1.1Doenças humanas causadas por protozoários do filo Apicomplexa:Malária e Toxoplasmose1	7
1.1.1 Malária	7
1.1.2 Toxoplasmose	0
1.2 Ectonucleotidases	2
1.3 Homeostasia de Ca ²⁺ em parasitas apicomplexas2	7
1.4 Indicadores de Ca ²⁺ geneticamente codificados	6
2 OBJETIVOS	9
3 MÉTODOS	0
3.1 Plasmodium falciparum	0
3.1.1 Cultivo e sincronização de Plasmodium falciparum4	D
3.1.2 Isolamento de Plasmodium falciparum4	0
3.1.3 Avaliação da atividade ecto-ATPásica de P. falciparum em cultura4	0
3.1.4 Clonagem da apirase de P. falciparum (cepa 3D7)4	1
3.1.5 Códon-otimização e síntese do gene da apirase de Plasmodium falciparum4	3
3.1.6 Análise da expressão da apirase de Plasmodium falciparum durante as diferentes fases do ciclo intra-eritrocítico43	3
3.1.7 Ação de inibidores de apirases durante o ciclo intraeritrocítico de P. falciparum (cepa 3D7)44	4
3.1.8 Leitura em citômetro de fluxo	4
3.1.9 Construção de Plasmodium falciparum transgênico expressando o indicador de Ca ²⁺ geneticamente codificado GCaMP34	5
3.1.10 Análise da resposta de Ca ²⁺ dos parasitas PfGCaMP34	6
3.2 Toxoplasma gondii4	7
3.2.1 Cultivo de Toxoplasma gondii4	7
3.2.2 Ensaios de invasão <i>in vitro</i> 4	7
3.2.3 Ensaios de egresso <i>in vitro</i> 44	8
4 RESULTADOS	D
4.1 Clonagem da apirase de <i>P. falciparum</i> (cepa 3D7)50	D
4.2 Códon-otimização e síntese do gene da apirase de Plasmodium falciparum	-
	4

4.3 Avaliação da atividade ecto-ATPásica de <i>P. falciparum</i> em cultura55
4.4 Adição de inibidores de apirases durante o ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i> (cepa 3D7)56
4.5 Análise da expressão da apirase de <i>Plasmodium falciparum</i> durante as diferentes fases do ciclo intra-eritrocítico60
4.6 Construção e análise da resposta de Ca ²⁺ de parasitas PfGCaMP361
 4.7 Papel do íon Ca²⁺ na invasão e saída da célula hospedeira por <i>Toxoplasma gondii</i>
5 1 Clonagom da aniraso do Plasmodium falcinarum
5.1 Cionageni da apliase de <i>Flasinoulum laicipal um</i>
5.2 Availação da atividade ecto-A i Pasica de <i>P. faiciparum</i> em cultura
5.3 Adição de inibidores de apirases durante o ciclo intraeritrocítico de <i>Plasmodium falciparum</i> (cepa 3D7)86
5.4 Análise da expressão da apirase de <i>Plasmodium falciparum</i> durante as diferentes fases do ciclo intra-eritrocítico87
5.5 Construção e análise da resposta de Ca ²⁺ de parasitas PfGCaMP387
5.6 Papel do íon Ca ²⁺ na invasão e saída da célula hospedeira por <i>Toxoplasma</i> <i>gondii.</i>
6 CONCLUSÕES
REFERÊNCIAS95
Anexo A- Produção literária durante o período do doutorado105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças humanas causadas por protozoários do filo Apicomplexa: Malária e Toxoplasmose

1.1.1 Malária

Doenças negligenciadas formam um grupo de doenças tropicais endêmicas especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina. Dentro desta definição incluem-se doenças como: Doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomose, malária, toxoplasmose e hanseníase.

Enquadrada neste grupo de doenças, a malária é reconhecida como grave problema de saúde pública no mundo, ocorrendo em mais de 109 países (Figura 1). Sua estimativa foi de 198 milhões de casos e 584.000 mortes no ano de 2013. Deste total, cerca de 78% das mortes ocorreram em crianças menores de 5 anos na África subsaariana (WORLD HEALTH ORGANIZATION.). Ainda segundo a OMS a malária mata uma criança africana a cada 30 segundos, e muitas crianças que sobrevivem a casos severos sofrem danos cerebrais graves e têm dificuldades de aprendizagem.

Seu agente etiológico é o protozoário do gênero *Plasmodium*, que é capaz de infectar aves, répteis e mamíferos. De todas as espécies de *Plasmodium* existentes, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. malariae* (MCKENZIE; BOSSERT, 1999) são capazes de infectar humanos, entretanto recentemente há relatos de infecções pela espécie *P. knowlesi* (KANTELE; JOKIRANTA, 2011), tornando-se a quinta espécie capaz de infectar humanos.

No Brasil foram relatados cerca de 179 mil casos e 41 mortes no ano de 2013 devido a malária. Do número total de casos registrados 18% foram ocasionados por *P. falciparum*, a espécie responsável pela forma mais letal da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION.).



Figura 1: Distribuição mundial de casos de malária. Na figura são representadas as áreas de risco de transmissão da malária onde cerca de 40% da população vive sob o risco de contágio. Fonte: *World Malaria Report 2013, National malaria control programme report*

Dentre os sintomas associados à mortalidade por malária destacam-se anemia severa crônica e efeitos adversos em mulheres grávidas, além da malária cerebral. Porém, os ataques recorrentes de febres e calafrios, que ocorrem geralmente em períodos de tempo múltiplos de 24 horas, são a característica mais marcante e conhecida desta doença. Estas febres são conhecidas como terçãs e quartãs (ocorrem a cada 48 e 72 horas, respectivamente) (GARCIA et al., 2001).

Apesar dos inúmeros esforços direcionados para o controle da malária, o número de casos continua a crescer devido ao surgimento de parasitas resistentes à maior parte das drogas anti-maláricas disponíveis, bem como de mosquitos resistentes aos inseticidas, tornando necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas para a erradicação da doença. Neste sentido, um dos maiores obstáculos encontrados relaciona-se à complexidade dos parasitas e de suas interações com seu hospedeiro humano e inseto-vetor (GARCIA et al., 2008)

O ciclo assexuado de *P. falciparum* (Figura 2) ocorre no hospedeiro humano, sendo a infecção iniciada pela picada da fêmea do mosquito anofelino, que injeta esporozoítos junto com a saliva. Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos invadem os hepatócitos e se desenvolvem em formas exoeritrocíticas, que rompem as células liberando merozoítos no sangue (MOTA; RODRIGUEZ, 2001). Os

merozoítos invadem eritrócitos, e se desenvolvem no interior do vacúolo parasitóforo, passando por diversas transformações bioquímicas e morfológicas, que podem ser identificadas basicamente por três estágios denominados anel, trofozoíto e esquizonte. O rompimento do eritrócito libera merozoítos, dando continuidade ao ciclo intraeritrocítico (BANNISTER et al., 2000).



Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium sp.* Ciclo intraeritrocítico, hepático e no mosquito. Fonte: *National Institutes of Health (NIH).*

Alguns parasitas na circulação sangüínea diferenciam-se em gametócitos, que são as formas infectivas para o mosquito vetor, onde ocorre o ciclo sexuado. No intestino do mosquito ocorre a maturação dos gametócitos, processo denominado gametogênese, que é seguida pela fertilização, com a união de gametas masculino e feminino gerando um zigoto. Este migra e adere ao epitélio do intestino, onde se desenvolve num oocisto. Quando o oocisto rompe, há liberação de esporozoítos, os quais vão até a glândula salivar e são liberados durante a alimentação do mosquito (GHOSH et al., 2000)

A forma mais virulenta da malária é causada pela espécie *Plasmodium falciparum*. Todos os sintomas e patologias da doença são causados pelo estágio infectivo que ocorre nos eritrócitos maduros, tornando este estágio o mais estudado da doença (PRUDENCIO et al., 2006).

1.1.2 Toxoplasmose

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um parasita intracelular obrigatório com distribuição global capaz de infectar praticamente todas as células nucleadas de mamíferos e aves (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Estimase que em certas populações a soroprevalência para esta doença atinja 80% (KAFSACK et al., 2004).

Este parasita possui um complexo clico de vida que divide-se entre hospedeiros não-felinos e felinos, que estão relacionados com a replicação assexuada e sexuada do parasita, respectivamente (Figura 3). O estágio sexuado deste ciclo ocorre apenas em felinos e inicia-se pela ingestão de cistos. Após o processo digestivo (ação enzimática) os parasitas são liberados e infectam os enterócitos do animal, replicando-se assexuadamente em seu interior. Os parasitas gerados pela reprodução assexuada infectam outras células do hospedeiro ou, então, diferenciam-se em gametas masculino e feminino que se fundem formando o zigoto. Após a fertilização ocorre a formação de oocistos que são liberados no lúmen do intestino do felino infectado e excretados no ambiente externo junto com as fezes do animal. Os oocistos assim liberados sofrem processo de maturação (divisão meiótica gerando esporozoítos) e tornam-se altamente infecciosos, sobrevivendo no ambiente externo por meses ou anos. Qualquer animal de sangue quente (mamífero ou ave) que ingira estes oocistos se torna hospedeiro para o ciclo assexuado de Toxoplasma gondii (DUBEY; FRENKEL, 1972; 1976).

O componente assexuado deste ciclo consiste em dois estágios infectivos distintos: fase crônica e fase aguda. Ao serem ingeridos por outros animais os

oocistos liberam esporozoítos que infectam o epitélio intestinal e diferenciam-se em taquizoítos. Os taquizoítos assim formados são liberados no organismo do animal e infectam novas células nucleadas (fase aguda) ou então diferenciam-se em bradizoítos, que são encontrados principalmente no sistema nervoso central e tecido muscular, onde residem por toda a vida do hospedeiro (fase crônica). Ao ingerir-se carne mal cozida e infectada proveniente de um animal infectado na fase crônica, os bradizoítos irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro diferenciado-se em taquizoítos e completando o ciclo assexuado. Se o novo hospedeiro é um felino, os bradizoítos podem diferenciar-se em formas sexuadas (gametas), completando assim todo o ciclo de vida do protozoário (BLACK; BOOTHROYD, 2000).



Figura 3: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Ciclo sexuado e assexuado, envolvendo os felinos como hospedeiros definitivos e mamíferos e aves como hospedeiros intermediários. Adaptado de Black e Boothroyd (2000).

Na maioria dos casos o uso de medicamentos no tratamento da toxoplasmose não é necessário, visto que o sistema imune é capaz de combater eficientemente o parasita. Entretanto, casos clínicos de toxoplasmose são observados em pacientes imunocomprometidos (AIDS) e também em mulheres que durante a gravidez são infectadas pela primeira vez por *Toxoplasma gondii* (estágio agudo da doença). Nestes casos o sistema imune não é capaz de combater o parasita (pacientes imunocomprometidos) ou os parasitas podem atravessar a placenta e infectar o feto, podendo levar a abortos e malformações (mulheres grávidas). Apesar de as drogas usadas no tratamento da toxoplasmose (sulfonamida e pirimetamina) eliminarem eficientemente os taquizoítos, elas não são capazes de remover os bradizoítos, responsáveis pelo estágio crônico da doença. Deste modo, faz-se necessário o surgimento de tratamentos eficazes contra esta enfermidade, visto o aumento no número de pacientes imunocomprometidos nas últimas décadas (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

1.2 Ectonucleotidases

Ectonucleotidases são enzimas capazes de metabolizar nucleotídeos extracelulares. Estas enzimas encontram-se ancoradas na membrana das células ou podem, por sua vez, serem secretadas na forma solúvel no meio extracelular. A presença e concentração dos nucleotídeos são reguladas pela ação das ectonucleotidases, os substratos biologicamente mais relevantes – ATP, ADP, UTP e UDP – iniciam diversas respostas celulares através da ativação seletiva de receptores purinérgicos.

Atualmente as ectonucleotidases são divididas em quatro famílias, sendo que a nomenclatura atual descreve: as E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), também chamadas apirases ou CD39, que atuam na conversão de nucleosídeos tri- e difosfatados em seus componentes monofosfatados; as ecto-5'-nucleotidases ou CD73, que hidrolisam os componentes monofosfatados, usualmente AMP até adenosina; as ecto-pirofosfatases/fosfodiesterases, que utilizam diferentes substratos e possuem atividade fosfodiesterásica e nucleotídeo pirofosfatásica; e as fosfatases alcalinas, que liberam fosfato livre a partir de uma variedade de substratos, incluindo nucleotídeos (ZIMMERMANN et al., 2012). As E-NTPDases (apirases) podem ser proteínas transmembrana ou solúveis (secretadas). A presença das E-NTPDases tem sido demonstrada nos mais diversos organismos, desde plantas e animais a protozoários. Sua ação consiste na hidrólise de ligações pirofosfato de nucleotídeos di e tri-fosfatados com liberação de ortofosfato. A atividade catalítica é dependente de cátions divalentes (Ca²⁺ e Mg²⁺) e nucleotídeos monofosfatados não são substratos destas enzimas (ROBSON et al., 2006; SANSOM et al., 2008b; ZIMMERMANN et al., 2012).

Em mamíferos já são conhecidos oito membros da família das E-NTPDases. Estes membros possuem como característica comum a presença de cinco domínios de sequências altamente conservadas, denominadas "regiões conservadas de apirases" (ACRs), que são de grande relevância para a atividade catalítica (HANDA; GUIDOTTI, 1996).

Os mecanismos pelos quais as apirases associadas a patógenos podem afetar a virulência ainda não são precisamente conhecidos. Acredita-se que, ao hidrolisarem ATP e ADP, estas enzimas teriam o potencial de reverter os mecanismos de defesa do hospedeiro. Neste sentido, pela ação complementar das ecto-5'-nucleotidases, uma maior hidrólise de AMP em adenosina teria um papel relevante na limitação da resposta inflamatória (FREDHOLM, 2007; SANSOM et al., 2008b).

Em *Toxoplasma gondii* foi observada a presença de três ORFs semelhantes em sua estrutura primária a membros da família CD39. Destas, apenas duas ORFs são expressas pelo parasita e foram denominadas NTPDase 1 e NTPDase 3. A análise da capacidade nucleotidásica destas enzimas revelou que a NTPDase 3 hidrolisa ATP mais eficientemente que a NTPDase 1, embora ambas as enzimas sejam capazes de degradar GTP, CTP e UTP (ASAI et al., 1995). Peptídeos sinal foram observados na estrutura das proteínas, sendo que durante a infecção pelo protozoário elas são secretadas no lúmen do vacúolo parasitóforo, o que associou sua participação na via de salvação de purinas (SIBLEY et al., 1994). A presença de NTPDases em *T. gondii* foi também associada a fatores de virulência do parasita, visto que a cepa mais virulenta (cepa RH) possui genes para as duas isoformas da enzima enquanto que para cepas avirulentas (cepa PLK) apenas a NTPDase 1 esta presente (NAKAAR et al., 1998). O tratamento de parasitas com anticorpo monoclonal capaz de reconhecer ambas as apirases causou redução na invasão de células Vero por *T. gondii* (KIKUCHI et al., 2001), ainda neste sentido comprovou-se a participação destas enzimas na replicação intracelular do parasita e sua importância na saída da célula infectada (SILVERMAN et al., 1998). Em suma, além do papel desempenhado na captação de purinas, as NTPDases presentes em *T. gondii* se mostraram essenciais para a invasão, replicação e saída do parasita da célula, sendo assim de fundamental importância para a sobrevivência deste protozoário.

Em *Trypanosoma cruzi* a presença de uma NTPDase foi relatada em todos as formas do parasita, embora diferenças no padrão de hidrólise de nucleotídeos sejam observados entre as diferentes fases do protozoário. As formas infectivas tripomastigotas e amastigotas hidrolisam mais ATP que as formas não infectivas epimastigotas. Especificamente observou-se que tripomastigotas a presentam atividade nucleotidásica 20 vezes maior que o estágio epimastigota e que, apesar de ambas as formas degradarem ATP e ADP, a razão de hidrólise ATP/ADP para tripomastigotas é 2:1 enquanto que para epimastigotas é 1:1 (BISAGGIO et al., 2003; FIETTO et al., 2004). Neste sentido, parasitas no estágio tripomastigota que foram mantidos durante sucessivas passagens apresentaram menor infectividade quando comparados com parasitas da 1° passagem e essa diminuição foi acompanhada por um decréscimo na atividade ecto-nucleotidásica. Ainda neste estudo foi relatado que o uso de inibidores específicos ou a presença de anticorpos capazes de reconhecer a apirase causaram uma diminuição da infectividade *in vitro*, relacionando a atuação desta enzima à virulência de *T. cruzi* (SANTOS et al., 2009).

Duas proteínas com sequências semelhantes a CD39 estão presentes em *Leishmania*. Dependendo da espécie em questão a enzima possuirá um domínio transmembrana ou um sítio de clivagem N-terminal, o que sugere que estas apirases são ancoradas a membrana ou secretadas pelo parasita (SANSOM et al., 2008a). O tratamento com anticorpo anti-CD39 tornou possível a visualização da enzima na superfície de *Leishmania amazonensis*. Interessantemente, houve diminuição da interação do parasita com macrófagos, indicando um possível papel da apirase na invasão. A maior atividade enzimática ocorre no fim da replicação do protozoário, sugerindo a participação da apirase na saída do parasita da célula infectada (PINHEIRO et al., 2006). Recentemente foi demonstrado, através de caracterização bioquímica, que a NTPDase-2 de *L. infantum chagasi* é uma apirase genuína e

encontra-se amplamente distribuída na superfície de promastigotas (VASCONCELLOS RDE et al., 2014). A expressão heteróloga desta proteína resultou em um novo antígeno para diagnóstico de leishmaniose visceral em cães. Como perspectivas futuras os autores propõem sua aplicação no diagnóstico de leishmaniose em humanos (DE SOUZA et al., 2013).

Diferentes espécies de *Leishmania* apresentam distintos padrões de hidrólise de nucleotídeos extracelulares, quanto mais virulenta é a cepa (*L. amazonensis*) maior a atividade ecto-nucleotidásica apresentada pelo parasita em comparação com cepas menos virulentas (*L. braziliensis e L. major*) (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA et al., 2008). Os dados apresentados permitem inferir o possível papel da apirase de *Leishmania* no processo de invasão e saída da célula infectada, como também sua relação com a maior virulência do parasita.

Inúmeros trabalhos tem descrito a capacidade de hidrólise de ATP extracelular por parasitas (*T. cruzi, L. amazonensis, S. mansoni, T. gondii*) e patógenos (*L. pneumophila, C. neoformans, T. vaginalis*) correlacionando suas atividades enzimáticas com processos de virulência, sobrevivência intracelular e adesão celular (BERREDO-PINHO et al., 2001; BISAGGIO et al., 2003; DEMARCO et al., 2003; FIETTO et al., 2004). Especificamente em *L. amazonensis*, já foi demonstrada uma maior capacidade de hidrólise de ATP extracelular em promastigotas virulentos quando comparados aos avirulentos (BERREDO-PINHO et al., 2001). Ainda neste sentido duas apirases (SmATPDase1 e SmATPDase2) de superfície do parasita humano *Schistosoma mansoni*, foram descritas, onde a primeira isoforma permaneceria ancorada no tegumento (DEMARCO et al., 2003) e a segunda isoforma seria secretada (LEVANO-GARCIA et al., 2007). Foi postulado que ambas as enzimas do parasita estariam envolvidas na via de resgate de purinas e no processo de inibição de agregação plaquetária durante a invasão do hospedeiro.

Em humanos a hidrólise de ATP e ADP pelas apirases interfere na ativação de receptores P2X1, P2Y1 e P2Y12 presentes em plaquetas. A ativação de receptores P2Y1 é responsável pelo início da agregação plaquetária, enquanto que receptores P2Y12 são essenciais para a conclusão e potenciação deste processo. Receptores P2X1 quando ativados geram um rápido influxo de Ca²⁺ e contribuem para a ativação das plaquetas (GACHET, 2006). Deste modo, CD39 humano é

responsável por modular a resposta plaquetária ao controlar a concentração extracelular de ATP e ADP. Dado o intrínseco papel de CD39 humano, é possível que as E-NTPDases produzidas por parasitas também modulem os mecanismos de defesa do hospedeiro, facilitando o crescimento e infecção pelo parasita.

Em células de mamíferos ATP e outros nucleotídeos como UDP e UTP são liberados de células ativadas ou estressadas, agindo assim como "sinais de perigo". Através de sinalização via receptor P2, ATP extracelular pode modular a resposta imune e inflamatória de uma variedade de tipos celulares (BOURS et al., 2006). Especificamente, observou-se que ATP causa a liberação de citocinas proinflamatórias como IL-1 por células T (LANGSTON et al., 2003), como também ativa células dendríticas induzindo a secreção de IL-12 (SCHNURR et al., 2000). De modo semelhante ao que ocorre no processo de agregação plaquetária, CD39 humano modula a ativação de células do sistema imune e, consequentemente, a liberação de citocinas e resposta inflamatória (BORSELLINO et al., 2007). Assim, a hidrólise de nucleotídeos extracelulares por NTPDases microbianas pode imitar a ação de CD39 humano, influenciando na resposta imune gerada no processo de infecção.

É conhecido que alguns parasitas, em especial os apicomplexas, não são capazes de sintetizar purinas *de novo*, capturando essas moléculas da célula hospedeira. Estas moléculas, por sua vez, são transportadas para o interior do parasita através de transportadores nucleosídicos e convertidas em nucleotídeos (DE KONING et al., 2005). Ao degradar a molécula de ATP as apirases não são capazes de fornecer a adenosina que é incorporada pelos parasitas. O AMP gerado pelas apirases é convertido em adenosina pela atuação de outra família de enzimas, denominadas ecto-5'-nucleotidases (CD73). Deste modo, a atuação conjunta destas enzimas fornece a maquinaria necessária para suprir a demanda de purinas do protozoário.

Alguns estudos sugerem que as NTPDases expressas por parasitas estão envolvidas na via de salvação de purinas e ,por atuarem em uma via essencial para o protozoário, tornam-se interessantes alvos terapêuticos (GHERARDI; SARCIRON, 2007).

O sequenciamento do genoma do protozoário *P. falciparum* revelou a presença de uma ORF que codificaria uma possível apirase (PF3D7_1431800). Entretanto, diferentemente do que ocorre com outros protozoários parasitas em que

a atividade e função desta enzima têm sido extensivamente estudadas, sua presença e atividade ainda não foram relatadas em *P. falciparum* (SANSOM et al., 2008a). Deste modo, desvendar a participação da apirase na relação patógeno-hospedeiro que ocorre nas infecções por *Plasmodium* é de fundamental importância no combate a esta doença que causa milhares de vítimas fatais todos os anos.

1.3 Homeostasia de Ca²⁺ em parasitas apicomplexas

Ca²⁺ intracelular é um importante segundo mensageiro que atua no controle de uma variedade de funções celulares, incluindo contração, secreção, divisão celular e diferenciação. A importância da sinalização desencadeada por Ca²⁺ em diversos processos subcelulares é bem estabelecida em eucariotos superiores, mas o conhecimento acerca de seu funcionamento em protozoários é restrito (MORENO; DOCAMPO, 2003; PLATTNER et al., 2012).

A concentração citosólica de Ca²⁺, [Ca²⁺]_i, é mantida a níveis baixos (na ordem de 10⁻⁷M) quando comparadas com a concentração de Ca²⁺ encontrada no meio extracelular (10⁻³M). Diversos mecanismos contribuem para a baixa concentração no citoplasma, como transportadores, canais iônicos e proteínas que se ligam a Ca²⁺. O conteúdo de Ca²⁺ intracelular, na verdade, é muito maior que o apresentado livre no citoplasma da célula, entretanto a maior parte deste íon encontra-se ligado a proteínas, polifosfatos ou sequestrados no interior de organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (MORENO et al., 2011).

Em células eucarióticas o transporte de Ca²⁺ através de membrana plasmática para o interior celular é desempenhado por diversos canais. Sabe-se que alguns destes canais são ativados pela ligação a receptores (*receptor-operated Ca²⁺ channels*), pelo potencial através da membrana plasmática (*voltage-gated Ca²⁺ channels*) ou pelo conteúdo intracelular dos estoques de Ca²⁺ (*store-operated Ca²⁺ channels*) (MORENO; DOCAMPO, 2003). Embora tenha sido relatada a presença de um canal ativado pela ligação a receptor em *T. cruzi*, não há evidência direta destes canais em parasitas apicomplexas (MORENO et al., 2011; MORENO; DOCAMPO, 2003; PAVETO et al., 1995). Do mesmo modo, *Voltage-dependet Ca²⁺ channels* ainda não foram dectados em *Plasmodium* e *Toxoplasma gondii*. A liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático muitas vezes é seguida pela entrada de Ca²⁺ através da membrana plasmática. Este processo é definido como SOCE (*store-operated Ca*²⁺ *entry*) e a conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana é realizada por duas famílias de proteínas: Stim e Orai. A presença destas famílias de proteínas em eucariotos superiores já foi amplamente relatada, todavia nenhum dos genes que correspondem a esta maquinaria está presente no genoma de apicomplexas (MORENO et al., 2011).

Interessantemente, SOCE foi demonstrado em *Plasmodium falciparum*, indicando que neste parasita a comunicação entre os estoques intracelulares de Ca^{2+} e a membrana plasmática deve ocorrer de modo distinto daqueles apresentados por eucariotos superiores. Neste trabalho os autores estimularam a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares utilizando 8BrcAMP (análogo de cAMP permeável a membrana) em meio extracelular sem Ca^{2+} . A posterior adição de Ca^{2+} ao meio provocou um novo aumento nos níveis citosólicos deste íon, indicando sua entrada através da membrana celular (BERALDO et al., 2007; BUDU; GARCIA, 2012). Estudos recentes em *T. gondii* relatam um influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o interior do parasita, sendo que este influxo é ainda maior quando os estoques intracelulares de Ca^{2+} são depletados. Interessantemente, este maior influxo não foi relacionado com SOCE neste parasita (PACE et al., 2014).

O transporte ativo de Ca²⁺ através da membrana em células eucarióticas é resultado da ação de trocadores Na²⁺/ Ca²⁺ ou Ca²⁺ ATPases associadas a membrana plasmática (PMCA) (NAGAMUNE et al., 2008). Ate o momento não há evidências moleculares que demonstrem a presença de trocadores Na²⁺/ Ca²⁺ em nenhum protozoário parasita, entretanto PMCAs já foram relatadas em diferentes protozoários e entre eles *T. gondii* (MORENO; DOCAMPO, 2003). Evidências bioquímicas da estimulação da PMCA de *Toxoplasma gondii* por CaM (calmodulina) foram observados, entretanto um domínio típico de ligação a CaM esta ausente neste transportador, sugerindo a presença de um domínio diferente capaz de se ligar a CaM (BOUCHOT et al., 1999). Surpreendentemente, não há homólogos de PMCAs no genoma de *Plasmodium falciparum*, indicando que os parasitas da malária não utilizam desta ATPase para a homeostasia de Ca²⁺ (NAGAMUNE et al., 2008).

Uma vez dentro da célula, Ca²⁺ irá ser sequestrado no interior de organelas ou então se ligar as chamadas CBPs (*calcium binding proteins*). CBPs são caracterizadas pela presença de motivos altamente conservados de ligação a Ca²⁺ denominados EF-*hands*. O genoma de *Plasmodium falciparum* possui cerca de 69 proteínas que apresentam este motivo, enquanto em *T. gondii* encontramos cerca de 55 proteínas (MORENO et al., 2011).

CBPs são usualmente classificadas em três famílias: família CaM (calmodulinas), família CBL (*calcineurin B-like*) ou então na família das proteínas cinases dependentes de Ca²⁺, também denominadas CDPKs (*calcium-dependent protein kinase*). Em geral, genomas de parasitas apicomplexas codificam uma única cópia de CaM e um número variado de CMLs (*calmodulin like proteins*) (MORENO et al., 2011).

Entre todos os apicomplexas apenas a calmodulina de T. gondii foi clonada, verificando-se ser capaz de se ligar a Ca²⁺ in vitro (SEEBER et al., 1999). Ainda neste sentido verificou-se que o uso de inibidores de calmodulina (calmidazolium e trifluoperazina) eram capazes de reduzir significativamente a entrada na célula hospedeira por *T. gondii*, sugerindo assim um papel da calmodulina na invasão pelo parasita (PEZZELLA-D'ALESSANDRO et al., 2001). Inibidores de calmodulina são igualmente tóxicos para o parasita Plasmodium falciparum, afetando seu desenvolvimento e invasão dos eritrócitos pelos merozoitos (GEARY et al., 1986; MORENO et al., 2011; VAID et al., 2008). Plasmodium spp, Toxoplasma gondii e outros apicomplexas apresentam em seu genoma sequências para proteínas cinases dependentes de Ca2+ (CDPKs). Em T. gondii CDPK1 é essencial para atividade exocítica e sua supressão bloqueia a secreção dos micronemas, afetando assim a motilidade do parasita, invasão e egresso da célula hospedeira (LOURIDO et al., 2010). Em Plasmodium vivax foi relatada a presença de uma proteína cinase denominada CDPK4. Esta enzima é expressa no estágio de esquizonte maduro, sugerindo assim seu papel na proliferação do parasita (CHOI et al., 2010). CDPK4 também mostrou-se essencial no processo de exflagelação do gameta masculino em *Plasmodium falciparum*, evento este que ocorre no ciclo de vida do parasita no mosquito vetor (KATO et al., 2009; PLATTNER et al., 2012). Ainda em P. falciparum PfPKB, uma enzima cinase depende de Ca²⁺ /CaM, foi postulada como importante na penetração da célula hospedeira, afetando mecanismos ligados ao glidosome (VAID et al., 2008). Interessantemente, não há no genoma de *Plasmodium falciparum* a presença de um proteína cinase C (PKC) canônica (ANAMIKA et al., 2005), embora haja neste parasita a presença de um receptor para a proteína cinase C (PfRACK-*receptor for actived c kinase*). Este receptor é expresso em todo estágio intraeritrocítico, sugerindo seu possível envolvimento no ciclo de vida assexuado do parasita (MADEIRA et al., 2003).

Como dito anteriormente, uma vez dentro da célula Ca²⁺ pode se ligar a proteínas ou então ser sequestrado no interior de organelas. O retículo endoplasmático (RE) é considerado um dos maiores estoques de Ca²⁺ na célula, podendo atingir concentrações locais na ordem de milimolar. Esta organela possui em sua estrutura vias independentes para influxo e efluxo de Ca²⁺. Assim como em eucariotos superiores, em apicomplexas o influxo de Ca²⁺ para o interior do RE é catalisado por Ca²⁺-ATPases denominadas SERCAs (*sarcoplasmatic/endoplasmatic* reticulum Ca2+ -ATPase), que utiliza a energia liberada pela hidrólise de 1 molécula de ATP no transporte de 2 moléculas de Ca²⁺ para o interior da organela (MORENO et al., 2011). SERCAs já formam caracterizadas nos protozoários T. gondii e P. falciparum, em que verificou-se sua inibição pelo uso de artemisinina e consequente influência na sinalização desencadeada por Ca²⁺ (ECKSTEIN-LUDWIG et al., 2003; NAGAMUNE et al., 2007). Tapsigargina também mostrou-se capaz de inibir a SERCA de T. gondii e P. falciparum, entretanto, a inibição foi alcançada utilizando doses mais elevadas do que as usualmente empregadas em células de mamíferos (VAROTTI et al., 2003).

Em eucariotos superiores o efluxo de Ca²⁺ do RE ocorre por meio de canais ativados por IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato) ou então por rianodina. Em *T. gondii* foi demonstrada a presença de estoques de Ca²⁺ sensíveis a rianodina e IP₃. Neste estudo os autores demonstraram que o uso de rianodina ou etanol (capaz de estimular a liberação de IP₃ em *T. gondii*) era capaz de ativar a secreção de micronemas através de mecanismos envolvendo a sinalização por Ca²⁺ (LOVETT et al., 2002). Liberação de Ca²⁺ de estoques intracelulares induzida por IP₃ foi também demonstrada em *P. falciparum* e *P. chabaudi* (ALVES et al., 2011; PASSOS; GARCIA, 1998). Especificamente no parasita da malária humana *P. falciparum* foi demonstrado que melatonina e seus precursores N-acetilserotonina, triptamina e serotonina são capazes de modular o ciclo de vida do parasita (BAGNARESI et al., 2009; HOTTA et al., 2000). Estas moléculas foram capazes de estimular liberação de Ca²⁺ no parasita via ativação de PLC e liberação de IP₃, demonstrando assim a presença de estoques sensíveis a IP₃ no parasita (ALVES et al., 2011). Entretanto, não há evidência de receptores de IP₃ e rianodina em parasitas apicomplexas, indicando que estes protozoários utilizam mecanismos diferentes (mas ainda responsivos a IP₃) na liberação de Ca²⁺ do RE (MORENO et al., 2011).

Mitocôndrias possuem uma alta capacidade de armazenar Ca²⁺ em seu interior, entretanto em condições fisiológicas seus níveis de Ca2+ se igualam aos níveis do citoplasma (MORENO: DOCAMPO, 2003). O influxo é resultado da ação de um carreador de Ca²⁺ que permite a entrada eletrogênica do cátion dirigida pelo gradiente eletroquímico gerado pela respiração ou hidrólise de ATP. A saída de Ca²⁺ desta organela, por sua vez, apresenta via distinta, em que há a troca de Ca²⁺ do lúmen da mitocôndria por Na²⁺ ou H⁺ extramitocondriais (NAGAMUNE et al., 2008). Experimentos em Plasmodium berghei utilizando digitonina para medir atividade mitocondrial demonstraram influxo de Ca²⁺ nesta organela através de um mecanismo associado com a despolarização da membrana (UYEMURA et al., 2000), já no parasita da malária humana P. falciparum demonstrou-se que há um aumento transiente na concentração de Ca2+ citosólico e mitocondrial em resposta a tapsigargina e ao hormônio melatonina, utilizando para isto indicadores de Ca²⁺ que localizam-se especificamente na mitocôndria e no citosol do parasita (BUDU; GARCIA, 2012; GAZARINI; GARCIA, 2004). Estes resultados sugerem a presença de um carreador de Ca²⁺ na membrana mitocondrial de apicomplexas semelhante aos encontrados em mitocôndrias de mamíferos.

Outro grande estoque de Ca²⁺ presente em parasitas apicomplexas é encontrado nos acidocalcisomas. Esta organela caracteriza-se por estocar Ca²⁺ em grandes quantidades em um ambiente acídico e estão presentes em diversos organismos, incluindo bactérias e algas (DOCAMPO et al., 2005). Como dito anteriormente, acidocalcisomas apresentam natureza acídica, como também apresentam alta densidade e alto conteúdo de pirofosfato, polifosfato, Ca²⁺ e magnésio (NAGAMUNE et al., 2008). Em *T. gondii* Ca²⁺ é bombeado para o interior desta organela pela ação de uma Ca²⁺-ATPase (PMCA) denominada TgA1(LUO et al., 2001), que mostrou-se sensível a vanadato (MORENO et al., 2011; ROHLOFF et al., 2011). Acidocalcisomas também possuem duas enzimas com capacidade de

bombear prótons H⁺ para o interior da organela, uma H⁺ ⁻pirofosfatase e uma H⁺ -ATPase, que acredita-se serem responsáveis pela acidificação da organela (LUO et al., 2001; MORENO et al., 1998; RODRIGUES et al., 2000). Em *T.gondii* essa acidificação mostrou-se importante, visto que agentes alcalinizantes como NH₄CI são capazes de liberar o conteúdo de Ca²⁺ no citoplasma via um trocador Ca²⁺/H⁺ (MORENO et al., 2011). Em *Plasmodium falciparum* foi demonstrado a presença de acidocalcisomas utilizando-se microanálises de Raio-X. Neste estudo, foram encontradas organelas elétron densas, redondas e elongadas, com alto conteúdo de Ca²⁺ e fosfato presentes em cadeias curtas e longas (RUIZ et al., 2004). Ainda no parasita da malária humana foi proposto que o *food vacuole*, que também possui natureza acídica, é um estoque interno de Ca²⁺ sensível a tapsigargina, ácido ciclopiazônico, bafilomicina A e NH₄CI (BIAGINI et al., 2003).

Apesar do conteúdo de Ca²⁺ dos acidocalcisomas ser alto, a maior parte deste íon esta ligada a piro ou polifosfatos, sendo liberado apenas em condições alcalinas ou como consequência da hidrólise das cadeias de fosfato. Ate o presente não foram demonstrados segundos mensageiros que estejam envolvidos na liberação de Ca²⁺ desta organela, o que reforça a ideia dos acidocalcisomas não estarem diretamente ligados na sinalização desencadeada por Ca²⁺ (NAGAMUNE et al., 2008).

Os efeitos mais devastadores das infecções causadas por parasitas apicomplexas estão diretamente relacionados ao seu ciclo lítico, que consiste em: reconhecimento e ligação à célula hospedeira, invasão, replicação intracelular e egresso.

Embora os mecanismos envolvidos na invasão e egresso ainda necessitem ser precisamente elucidados, sabe-se que variações na concentração intracelular de Ca²⁺ no parasita desempenham um papel fundamental nestes processos (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004). Neste sentido verificou-se que Plasmodium falciparum utiliza-se de Ca²⁺ proveniente do eritrócito, como também de parte da maquinaria de sinalização de Ca²⁺ da célula hospedeira para promover seu próprio desenvolvimento (GAZARINI et al., 2003). Neste trabalho os parasitas invadiram eritrócitos na presença do indicador de Ca²⁺ Fluo-3 em sua forma ácida. Este procedimento permitiu a marcação seletiva do vacúolo parasitóforo (VP) com o indicador. A concentração de Ca²⁺ no interior do vacúolo foi determinada em

aproximadamente 40 µM, mostrando-se alta o suficiente para a manutenção dos mecanismos de sinalização de Ca²⁺ e desenvolvimento do parasita. Ainda neste estudo, a adição de ionomicina causou o decréscimo na fluorescência, fato este consistente com a maior concentração de Ca²⁺ no VP quando comparado ao citoplasma da célula hospedeira. Uma possível explicação para este fenômeno reside na natureza da membrana do VP, em que estariam presentes Ca²⁺-ATPases provenientes da membrana do eritrócito, mas que agora bombeariam Ca²⁺ para o interior do VP (GAZARINI et al., 2003). Se este for o caso, o parasita da malária humana não esta exposto a baixas concentrações de Ca²⁺, mas possui quantidades suficientes deste íon para desenvolver-se normalmente no interior da célula infectada.

A invasão da célula hospedeira por parasitas apicomplexas mostrou-se dependente de Ca²⁺. Em *T. gondii* diversos eventos ligados ao processo invasivo como ligação a célula hospedeira, secreção de micronemas e extrusão do conoide foram relacionados com o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ no parasita (CARRUTHERS et al., 1999; CARRUTHERS; SIBLEY, 1999; DOBROWOLSKI et al., 1997; MONDRAGON; FRIXIONE, 1996). O papel crítico deste íon durante a invasão foi confirmado ao se tratar taquizoitos de T. gondii com o quelante intracelular de Ca²⁺ BAPTA-AM, resultando não apenas na inibição da secreção de micronemas e extrusão do conoide, mas também, e mais importante, inibindo a invasão como um todo (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004; CARRUTHERS et al., 1999; LOVETT; SIBLEY, 2003; MONDRAGON; FRIXIONE, 1996). Ainda neste sentido, os autores comprovaram que o Ca²⁺ proveniente de estoques intracelulares do parasita era suficiente para a invasão. Para isso lançaram mão de experimentos em que o Ca2+ intracelular da célula hospedeira e o presente no meio extracelular eram abolidos com o uso de BAPTA-AM e EGTA, respectivamente (LOVETT; SIBLEY, 2003). Como resultado foi observado que a ausência de Ca²⁺ do citoplasma da célula hospedeira, como também do meio extracelular não afetava a invasão das células pelos parasitas, sugerindo que Toxoplasma gondii possui o Ca2+ necessário e suficiente para este processo (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004).

Em *Plasmodium falciparum* o papel do Ca²⁺ na invasão dos eritrócitos foi investigado usando diferentes técnicas (MCCALLUM-DEIGHTON; HOLDER, 1992). Neste trabalho foi demonstrado que o Ca²⁺ presente no meio extracelular era

essencial para a invasão, visto que em experimentos em que este íon estava ausente do meio os merozoitos não foram capazes de invadir os eritrócitos. A substituição do Ca²⁺ presente no meio por magnésio, manganês ou zinco não foi capaz de restaurar a capacidade invasiva dos parasitas, sugerindo que este efeito é Ca²⁺ específico (MCCALLUM-DEIGHTON; HOLDER, 1992). Ainda em *P. falciparum* observou-se que PfPKB, uma proteína cinase dependente de Ca²⁺, é importante na invasão. O uso de inibidores específicos para esta enzima diminuíram dramaticamente a invasão das hemácias pelos parasitas. Os autores demonstraram que PfPKB associa-se ao motor actina-miosina de *P. falciparum*, influenciando assim em um mecanismo essencial na invasão (VAID et al., 2008).

De modo semelhante ao que ocorre no processo de invasão, Ca²⁺ parece desempenhar um papel fundamental no egresso de parasitas apicomplexas da célula infectada. Em *T. gondii* acredita-se que ambos os processos, invasão e egresso, compartilham os mesmos mecanismos permitindo assim o parasita se mover da célula recém lisada para uma nova célula com pouca exposição ao meio extracelular (HOFF; CARRUTHERS, 2002).

A participação de Ca²⁺ no egresso é evidente nos experimentos utilizando ionóforos de Ca²⁺ A23187 e ionomicina. O tratamento com tais ionóforos estimula parasitas intracelulares a saírem do vacúolo parasitóforo e, logo em seguida, da célula hospedeira. Semelhante ao que ocorre no egresso natural, no egresso induzida por ionofóro os parasitas mudam sua morfologia momentos antes de saírem da célula, sugerindo ser este um processo ativo dependente do citoesqueleto e motilidade. (BLACK et al., 2000; ENDO et al., 1982). Black et al. (2000) sugerem que o Ca²⁺ necessário para a saída de *T. gondii* é de origem extracelular. Os autores observaram que ao tratar a célula infectada com BAPTA-AM, que acredita-se não entrar no parasita devido a ação das esterases da célula hospedeira, foi capaz de bloquear a egresso de T. gondii. Ainda neste estudo, foi demonstrado que a permeabilização seletiva da célula hospedeira com saponina 0,005% resultava na saída dos parasitas, mas que este efeito era bloqueado se o Ca²⁺ extracelular fosse quelado pelo uso de EGTA (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004; BLACK et al., 2000). Entretanto, Moudy et al. (2001) relataram que o Ca²⁺ proveniente do próprio parasita é suficiente para induzir a egresso. Neste estudo os autores demonstraram que a perda de K⁺ pela célula hospedeira é capaz de iniciar a saída dos parasitas da

célula infectada. Observaram ainda que o aumento de Ca²⁺ no parasita era efeito *downstream* a esta mudança na concentração de K⁺ e não necessitava de influxo de Ca²⁺ do meio extracelular (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004; MOUDY et al., 2001).

Recentemente Borges-Pereira et al. (2015) demonstraram que Ca²⁺ é um importante fator na saída dos parasitas da célula hospedeira. Utilizando parasitas transgênicos expressando indicadores de Ca²⁺ geneticamente codificados os autores demonstraram uma clara relação entre o aumento intracelular deste íon e a liberação dos parasitas da célula infectada. Interessantemente, ainda neste estudo não foram observadas diferenças significativas no egresso quando em presença de meio iônico intracelular ou extracelular. Entretanto, Ca²⁺ extracelular desempenhou um importante papel neste processo, agindo como um fator reforçador (BORGES-PEREIRA et al., 2015).

Em *T. gondii* a egresso dos parasitas foi também estimulada pela adição do agente redutor ditiotreitol (DTT). Neste trabalho, parasitas intracelulares foram estimulados com a adição de 5 mM de DTT e observou-se a sua egresso após cerca de 60 segundos. O mecanismo sugerido para este estimulo esta na ativação de enzimas presentes no parasita denominadas NTPDases, que como dito anteriormente são capazes de degradar nucleotídeos e entre eles ATP. A ativação desta enzima no parasita depletaria os estoques intracelulares de ATP da célula hospedeira e do parasita, inibindo assim a ação das Ca²⁺-ATPases (SERCAs) responsáveis pela manutenção da homeostasia de Ca²⁺ nas células. Como resultado um influxo de Ca²⁺ é observado no parasita, levando a lise da célula hospedeira. Ao causar este influxo de Ca²⁺, os autores acreditam que DTT ativa a saída dos parasitas de maneira semelhante aquela observada com o uso de ionóforos (STOMMEL et al., 1997).

Em *P. facilparum* a participação direta de Ca²⁺ na saída dos parasitas ainda não foi observada, entretanto, uma proteína cinase dependente de Ca²⁺ (PfCDPK5) foi demonstrada como crítica no egresso dos parasitas. Esta enzima é expressa no estágio de esquizonte maduro e parasitas deficientes em PfCDPK5 não foram capazes de romper a célula infectada, permanecendo como esquizontes. A liberação mecânica destes parasitas do eritrócito mostrou que eram capazes de reinvadir
novas hemácias normalmente, sugerindo assim uma separação entre os processos de invasão e saída em *P. falciparum* (DVORIN et al., 2010).

A sinalização de Ca²⁺ desempenha um papel importante em diversas vias do parasita, e entre elas nos processos de invasão e saída da célula hospedeira. Entretanto, não há consenso na literatura sobre a origem do Ca²⁺ utilizado nestes processos, extracelular ou intracelular, ou mesmo as organelas que participam diretamente na liberação do Ca²⁺ necessário.

1.4 Indicadores de Ca²⁺ geneticamente codificados

Ca²⁺ controla muitos dos eventos presentes no complexo ciclo de vida dos parasitas apicomplexas, incluindo secreção de proteínas, motilidade e desenvolvimento. Para estudar o envolvimento de Ca²⁺ nestes processos, moléculas fluorescentes são usadas no mapeamento de sinais intracelulares de Ca²⁺ (WHITAKER, 2010).

Tradicionalmente medições de flutuações na concentração de Ca²⁺ citosólico são realizadas utilizando moléculas orgânicas que mudam suas propriedades fluorescentes após a ligação ao íon. Estas moléculas são altamente carregadas e, deste modo, incapazes de atravessar a membrana plasmática. Para solucionar este impasse, estes marcadores são microinjetados na célula ou então acoplados a grupos acetometil (AM) éster, mascarando assim seus grupos carboxílicos carregados. Entretanto, estes indicadores sintéticos de Ca²⁺ apresentam uma série de desvantagens que limitam seu uso *in vitro*. Podem compartimentalizar de maneira indiscriminada em diversas organelas, como também escapar da célula durante experimentos que demandam longos períodos. Não permitem discriminação entre células, marcando todo o tecido e a marcação especifica de determinada organela não é possível (MANK; GRIESBECK, 2008; WHITAKER, 2010). Por estas razões, sensores de Ca²⁺ codificados geneticamente que possam ser expressos dentro das células são fundamentais.

O termo "geneticamente codificado" refere-se ao fato destes sensores serem compostos apenas de aminoácidos, sem a adição de qualquer composto sintético ou co-fator. Assim, este indicador é codificado por DNA que pode ser manipulado e modificado por técnicas já conhecidas de biologia molecular. Combinado com o uso

de promotores específicos para determinadas células e sequências alvo para organelas específicas, esta metodologia oferece um modo não invasivo de implantar um indicador de Ca²⁺ em determinado organismo com localização celular e subcelular específicas (MANK; GRIESBECK, 2008).

As proteínas fluorescentes usadas nestes indicadores são, em sua forma nativa, insensíveis a mudanças na concentração de Ca²⁺. Para conferir esta sensibilidade ao íon motivos de ligação a Ca²⁺ de outras proteínas são utilizados. Calmodulina e troponina C são as escolhas mais comuns na síntese destes marcadores visto a presença de domínios EF-*hands* capazes de se ligar a Ca²⁺. Deste modo, estes indicadores são formados de proteínas fluorescentes e motivos de ligação a Ca²⁺ que são fusionados um ao outro de modo que a ligação ao íon é capaz de modular a fluorescência desta construção quimérica (MANK; GRIESBECK, 2008).

Há, basicamente, dois modos de se construir indicadores de Ca²⁺ geneticamente codificados (*Genetically Encoded Calcium Indicators*-GECIs). O primeiro apresenta duas proteínas fluorescentes separadas e conectadas por um motivo de ligação a Ca²⁺. A ligação ao íon faz com que o padrão de fluorescência destas proteínas mude, sendo este mecanismo baseado em FRET (*Foster Resonance Energy Transfer*). O segundo modo emprega a modulação da fluorescência de apenas uma proteína que possui em seu interior motivos de ligação a Ca²⁺ (MANK; GRIESBECK, 2008).

Um dos indicadores mais recentemente publicados, GCaMP3, baseia-se no uso da proteína fluorescente GFP acoplada a calmodulina em seu interior. Como dito, a ligação do íon a esta calmodulina é capaz de modular a fluorescência deste marcador. Especificamente em GCaMP3 foi relatado um aumento da fluorescência de cerca de 10 vezes entre os estados basal e estimulado, mostrando-se assim com grande potencial para uso em medições de Ca²⁺ intracelular (TIAN et al., 2009).

Uma das maiores restrições no uso de indicadores genéticos de Ca²⁺ é sua limitação ao uso de proteínas verdes baseadas em GFP. Esta limitação impede a mensuração da concentração de Ca²⁺ em diferentes compartimentos celulares ao mesmo tempo e restringe análises mais precisas sobre a dinâmica de Ca²⁺ na sinalização celular. Para solucionar este problema, Zhao et al. (2011) desenvolveram um novo grupo de marcadores de Ca²⁺ geneticamente codificados.

Estes indicadores baseiam-se na presença de calmodulina como domínio de ligação a Ca²⁺, entretanto, após modificações de alguns aminoácidos na proteína GFP, foram capazes de desenvolver proteínas fluorescentes azuis (B-GECO) e vermelhas (R-GECO), permitindo assim a medição de Ca²⁺ intracelular em diferentes compartimentos celulares ao mesmo tempo (ZHAO et al., 2011).

O desenvolvimento de GECIs permitiu, além dos avanços na medição de Ca²⁺ intracelular superando as desvantagens do uso de moléculas orgânicas, o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados expressando tais indicadores de forma estável ou transiente. A construção de parasitas transgênicos foi recentemente relatada na literatura. *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* expressando o indicador de Ca²⁺ GCaMP3 foram criados permitindo a visualização da dinâmica de Ca²⁺ nestas células sem o uso de métodos invasivos com moléculas orgânicas (BORGES-PEREIRA et al., 2015; BORGES-PEREIRA et al., 2014).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar por meio de ferramentas moleculares e celulares o papel da apirase no ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*. Adicionalmente, propomos elucidar o papel de Ca²⁺ no egresso de *Toxoplasma gondii*, como também a origem do Ca²⁺ necessário para esta etapa fundamental do ciclo lítico do parasita. Os objetivos específicos incluíram:

- Clonagem da apirase de *P. falciparum*.
- Códon-otimização da apirase de *P. falciparum* buscando uma maior eficiência na expressão heteróloga.
- Avaliação da atividade ecto-ATPásica de *P. falciparum* evidenciando assim a presença de E-NTPDases na superfície do parasita capazes de degradar nucleotídeos extracelulares.
- Análise da atuação das apirases no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* pela adição de inibidores de apirases em cultura *in vitro*.
- Perfil de expressão da apirase de *P. falciparum* durante as diferentes fases do ciclo intraeritrocítico.
- Construção de uma linhagem estável de *P. falciparum* transgênico, PfGCaMP3, permitindo o monitoramento da dinâmica de Ca²⁺ nestes parasitas sem marcação com moléculas orgânicas.
- Análise detalhada do papel de Ca²⁺ no egresso de *T. gondii*, usando para isso um novo sistema composto célula hospedeira e parasitas codificando GECIs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Plasmodium falciparum

3.1.1 Cultivo e sincronização de Plasmodium falciparum

Plasmodium falciparum cepa 3D7 foi cultivado em garrafas plásticas para cultura com meio RPMI 1640 (GibcoBRL) suplementado com 10% de plasma humano A+, hematócrito de 5% e em atmosfera de 90% N₂; 5 % O₂; 5% CO₂ a 37 °C (TRAGER; JENSEN, 1976). Para a sincronização dos parasitas utilizamos solução de sorbitol 10% (LAMBROS; VANDERBERG, 1979).

3.1.2 Isolamento de Plasmodium falciparum

Hemácias parasitadas foram ressuspendidas em PBS contendo 0,3% (m/v) saponina. Após a lise das hemácias procedemos a centrifugação dos parasitas isolados a 13000 g durante 8 min, 4 °C. O pellet foi lavado três vezes em tampão PBS (300 g,5 min) e ressuspendido em tampão M (116 mm de NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO4, 5,5 mM de D-glicose, 50 mM de MOPS e CaCl₂ 2 mM, pH 7,2).

3.1.3 Avaliação da atividade ecto-ATPásica de P. falciparum em cultura

Para os ensaios visando quantificar a degradação de nucleotídeos extracelulares os parasitas foram cultivados até atingir o estágio desejado (anel, trofozoíto ou esquizonte) e então isolados por lise diferencial com saponina. Os ensaios foram realizados segundo descrito em (FIETTO et al., 2004), utilizando tampão de atividade (50 mM de HEPES pH 7,2, 116 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 5,5 mM de glicose, 5,4 mM de KCl), nucleotídeo na concentração final de 1 mM e 10⁷ parasitas isolados, totalizando um volume de 320 µL. A reação foi iniciada pela adição dos parasitas, incubada por 1 hora a 37°C e finalizada pela adição de 1 volume de ácido clorídrico 0,2 M. A atividade enzimática foi medida pela dosagem de fosfato inorgânico liberado pela hidrólise usando KH₂PO₄ como padrão (EKMAN; JAGER, 1993). Este método utiliza reagente colorimétrico composto por 1 volume de

molibdato de amônio 10% em HCI 4 M e 3 volumes de verde de malaquita 0,2% em HCI 4 M. Verde de malaquita na presença de molibdato se liga a fosfato inorgânico gerando complexos que podem ser medidos a 650 nM. Quanto maior a concentração de fosfato inorgânico no meio maior será a coloração adquirida e, consequentemente, maior será a absorbância neste comprimento de onda. Os ensaios foram feitos em triplicata, na presença de controles para a medida de liberação espontânea de fosfato, em que os parasitas foram adicionados após a parada com solução de ácido clorídrico 0,2 M.

A incubação a 37 °C foi feita em estufa e leitura das absorvâncias a 650 nm foi realizada em fluorímetro de placas Flexstation (Molecular Devices).

3.1.4 Clonagem da apirase de P. falciparum (cepa 3D7)

Visando a clonagem e posterior expressão heteróloga, primers foram desenhados com base na análise do gene. Os primers utilizados foram: 5'-GTCGACATGAAAAACCATATATTTTTATCATATT-3' e 5'-CTCGAGCTCACTGTATAATTTATATTTTC-3'. Sequências de sítios de restrição para as enzimas Sal I e Xho I foram adicionadas nas extremidades dos *primers* direto e reverso, respectivamente.

Inicialmente, RNA total foi extraído de cultura assincrônica de *P. falciparum* utilizando Trizol (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. O RNA assim obtido foi usado na síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando a Superscript II reverse transcriptase (Invitrongen). O cDNA sintetizado foi utilizado como molde em reação da polimerase em cadeia (PCR), na presença de primers específicos para o gene da apirase (tabela 1). A reação foi conduzida um passo inicial de desnaturação a 94 °C/5', 34 ciclos de 95 °C/60"; 50 °C/60" e 68 °C/180", e o passo final de 74 °C/5'.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. Como padrão de pares de bases foi usado 1kb plus DNA ladder (Invitogen).

O fragmento de DNA amplificado com aproximadamente 2337 pb foi cortado do gel e purificado com PureLinkTM Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), de acordo

com as especificações do fabricante, e ressuspendido em 50 µL de água Milli-Q estéril.

O fragmento de DNA purificado foi então clonado em vetor de propagação pJET (fermentas) utilizando as enzimas do kit de clonagem e seguindo as instruções do fornecedor (fermentas). A construção foi usada para transformar bactérias *E. coli* TOP10 competentes, obtidas pelo método de cloreto de Ca²⁺ (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A seleção dos transformantes foi feita em meio LB sólido com ampicilina, crescidas a 37°C por cerca de 20 horas, como descrito em Sambrook e Russel (2001).

As colônias obtidas foram crescidas separadamente em 3 mL de meio LB/Ampicilina durante 20 horas a 37 °C e 180 rpm. O DNA plasmidial dessas colônias foi extraído utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega), segundo as instruções do fornecedor.

Os ensaios de clivagem enzimática foram realizados no tempo de 2 horas a 37 °C, sendo utilizado 10 U das enzimas de restrição apropriadas. As enzimas e os tampões necessários foram adquiridos da empresa New England Biolabs, seguindose as instruções do fabricante. Os produtos das reações de digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% utilizando o padrão de pares de base GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder (invitrogen). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta.

O sequenciamento completo foi feito pelo serviço de sequenciamento de DNA do instituto de química da USP (SSDNA IQUSP). Os *primers* utilizados foram os mesmos da etapa de clonagem, primers externos aos sítios de clonagem (primers para sequenciamento presentes no Kit de clonagem pJET) e primers internos desenhados especificamente para o fechamento do sequenciamento completo.

Com base nas sequências obtidas realizou-se um alinhamento com as sequências presentes no banco de dados GenBank. Para isto utilizamos a ferramenta on-line BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), como também o software CLC Sequence Viewer 6.6 (CLCbio).

3.1.5 Códon-otimização e síntese do gene da apirase de Plasmodium falciparum

O gene da apirase foi submetido à análise para códon-otimização. Para isso utilizou-se OptimumGene[™] Codon Optimization analysis. Este algoritmo aperfeiçoa uma série de parâmetros que são críticos para a expressão gênica, aumentando assim o rendimento da expressão heteróloga.

O gene códon-otimizado foi sintetizado pela empresa GenScript (NJ, EUA) e sub-clonado em vetor de expressão em bactérias pET-21b entre os sítios das enzimas Sal I e Xho I, conforme protocolos estabelecidos pela empresa.

3.1.6 Análise da expressão da apirase de Plasmodium falciparum durante as diferentes fases do ciclo intra-eritrocítico

P. falciparum cepa 3D7 foi mantido em cultura seguindo o protocolo descrito por (TRAGER; JENSEN, 1976). Segundo este método os parasitas são mantidos em garrafas plásticas para cultura de 25 cm² com meio RPMI 1640 (GibcoBRL) suplementado com 10% de plasma humano A+, hematócrito de 5% e atmosfera de 90% N₂; 5% O₂; 5% CO₂ a 37 °C. Os parasitas foram sincronizados com solução de sorbitol 10% segundo descrito em (LAMBROS; VANDERBERG, 1979). Eritrócitos infectados com *P. falciparum* nas distintas fases (anel, trofozoíto e esquizonte) foram lisados com Trizol (Invitrogen) segundo as especificações do fabricante. A síntese do cDNA foi feita utilizando-se 500 ng do RNA total extraído usando Superscript II kit (Invitrogen) como descrito no manual do fabricante. A quantificação da expressão da apirase de P. falciparum foi realizada utilizando SYBER Green por real time guantitative PCR (qPCR). O equipamento utilizado foi um 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s; 53°C por 30 s; e 60°C por 30 s. Para cada reação foram utilizados 15 ng de cDNA, oligonucleotídeos (concentração final 1 µM) e Max Mix PCR (Applied Biosystems) (concentração final 1x). Os primers utilizados nas 5'-AGGAGAAGAAGAAGGTATTTATGGA -3', 5'reacões foram CCTCCTAAGTCTATTGCACCAT -3'. A mudança relativa na quantidade de mRNA do gene da apirase foi determinada pela fórmula 2^{Act} e o gene da seril-tRNA

sintetase foi amplificado e usado como normalizador. Os experimentos foram realizados em triplicata por meio de três experimentos independentes.

3.1.7 Ação de inibidores de apirases durante o ciclo intraeritrocítico de P. falciparum (cepa 3D7)

Para os experimentos de medição da parasitemia frente o efeito de inibidores de apirases, *P. falciparum* cepa 3D7 foi mantido em cultura, sincronizado com solução de sorbitol 10% e cultivado por aproximadamente 48 horas permitindo nova reinvasão e seu desenvolvimento em anéis.

A cultura assim sincronizada teve seu hematócrito ajustado para 4%, parasitemia inicial de 2% e incubada com as drogas (100 ou 500µM de ARL67156, 100 ou 500µM de Suramina, 100 ou 500µM de GdCl₃) em placa de 48 poços e atmosfera de 90% N₂; 5% O₂; 5% CO₂ a 37°C por 48 horas permitindo a reinvasão dos eritrócitos. Alíquotas foram retiradas em diferentes *time points* (6, 20, 34 e 48 horas) para análise do efeito destas drogas no desenvolvimento dos parasitas.

Os experimentos foram realizados em triplicata na presença de controles em que não houve adição de drogas e os resultados foram obtidos por meio de três experimentos independentes.

3.1.8 Leitura em citômetro de fluxo

Para a leitura em citômetro de fluxo as células foram fixadas com solução de formaldeído 2% (v/v) em PBS pH 7,2 por 24 horas a temperatura ambiente e permeabilizadas com triton X-100 0,1% em PBS 1X por 20 minutos a 37 °C. A marcação foi realizada com 5 nM de YOYO-1 (Molecular Probes) e a parasitemia foi medida por meio de *dot plots* (*side scatter* versus fluorescência) de 10⁵ células adquiridas em citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences) usando software CELLQUEST (Becton Dickinson). A excitação foi realizada com laser de argônio a 488 nm e a emissão de fluorescência foi coletada a 520-530 nm.

3.1.9 Construção de Plasmodium falciparum transgênico expressando o indicador de Ca²⁺ geneticamente codificado GCaMP3

Plasmídeos contendo o gene para o indicador GCaMP3 (Addgene) foi usado como molde em reação da polimerase em cadeia (PCR), na presença dos *primers*: 5' GGATCCATGGGTTCTCATCATCATCATC 3' e 5' GGATCCTTACTTCGCTGTCATCATCATTGTAC 3'. A reação foi conduzida um passo inicial de desnaturação a 94 °C/5', 34 ciclos de 95 °C/55''; 50 °C/60'' e 68 °C/180'', e o passo final de 74 °C/5'.

O fragmento de DNA amplificado com aproximadamente 1353 pb (GCaMP3) foi clonado em vetor de propagação em bactérias pJET (Fermentas) e então transferido para o vetor de transfecção em *Plasmodium falciparum* pDC (gentilmente cedido pelo Dr. Gerhard Wunderlich) utilizando técnicas de biologia molecular descritas anteriormente.

Plasmodium falciparum cepa 3D7 foi mantido em cultura conforme descrito anteriormente. Uma cultura sincrônica no estágio de anel foi submetida a eletroporação com aproximadamente 50 μg da construção pDC/GCaMP3. Um volume de 200 μL de células foi ressuspendido em 500 μL de cytomix (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 mM HEPES), o plasmídeo foi adicionado e a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,4 cm. A eletroporação foi realizada nas seguintes condições: 2,5 kV, 25 uF and 200 Ω. A cubeta foi colocada em gelo por 5 minutos. As células transfectadas foram transferidas para garrafas de cultura contendo 10 mL de meio apropriado (RPMI 1640 Gibco suplementado com 0,5 % albumax, 2 g/L bicarbontado de sódio, 40 mg/L gentamicina e 50 mg/L hipoxantina) e colocadas em incubadora (37°C, 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂). Após 48 horas 5 nM de WR99210 foi adicionado a cultura para selecionar os transformantes. Os parasitas transfectados (PfGCaMP3) começaram a aparecer aproximadamente após duas semanas e os parasitas fluorescentes puderam ser observados por microscopia de fluorescência.

Os parasitas transfectados foram submetidos à *cell sorting* por citometria de fluxo para selecionar aqueles com maior fluorescência. O experimentos foram realizados em um FACSAria II cell sorter (BD Biosciences). Os parasitas

selecionados foram mantidos em cultura por uma semana e submetidos a diluição clonal em placa de 96 poços (0,5 parasita por poço). Os parasitas foram detectados duas semanas após a diluição clonal através da mensuração da atividade da enzima LDH. Para isso utilizou-se o reagente Malstat (400 μ L de Triton X-100 em 80 mL de água deionizada, 4 g de L-lactato, 1,32 g de Tris-buffer, 0,022 g de acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD), pH 9 em volume final de 200 mL) e solução NBT/PES (0,160 g de nitroazul de tretazólio e 0,008 g de etosulfato de fenazina em 100 mL de água deionizada). Quinze μ L da cultura foram retirados de cada poço e adicionados a placa contendo 100 μ L de reagente Malstat e 25 μ L da solução NBT/PES. O desenvolvimento da coloração indicativa de atividade da enzima LDH foi monitorado colorimetricamente a 620 nM (NKHOMA et al., 2007).

3.1.10 Análise da resposta de Ca²⁺ dos parasitas PfGCaMP3

A validação dos parasitas transfectados foi realizada verificando-se o aumento de sua fluorescência na presença de compostos que provocam o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ em *P. falciparum*. Para isso, um clone com maior porcentagem de parasitas fluorescentes foi selecionado. Eritrócitos infectados com parasitas no estágio trofozoíto foram centrifugados (2000 rpm por 5 min), o pellet foi lavado duas vezes e ressuspendido em 1 mL de tampão A (116 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 5,5 mM D-glicose, 50 mM MOPS, 2 mM CaCl₂). Dois µM de ionomicina foram adcionados e as células foram incubadas por 1 minuto. A resposta de Ca²⁺ foi determinada à partir de dot plots (side scatter (SSC) versus fluorescence) de 10⁵ células adquiridas em um citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences) utilizando o software CELLQUEST (Becton & Dickinson). GCaMP3 foi excitado com laser de argônio a 488 nm e a emissão de fluorescência foi coletada em 520-530 nm (SCHUCK et al., 2011).

O aumento da fluorescência causado pelo influxo de Ca²⁺ nos parasitas PfGCaMP3 também foi visualizado por microscopia de fluorescência. Duzentos μ L de eritrócitos infectados com parasitas no estágio trofozoíto foram centrifugados (2000 rpm por 5 min), o pellet foi lavado duas vezes e ressuspendido em 100 μ L de tampão HBSS (137 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 0,25 mM Na₂PO₄, 5,5 mM Glicose, 0,44

mM KH₂PO₄, 1,3 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 4,2 mM NaHCO₃). *Coverslips* foram tratadas com Cell-Tak[™] (Life Science) por 15 minutos. Os eritrócitos foram então adicionados as *coverslips* e incubados por mais 15 minutos, permitindo assim a aderência das células aos discos. As imagens foram adquiridas em um microscópio Nikon eclipse TE300/PXL utilizando objetiva de 40x comandado por NIS software.

3.2 Toxoplasma gondii

3.2.1 Cultivo de Toxoplasma gondii

Células hTERT e HeLa foram mantidas por sucessivas passagens em discos para cultura de tecidos de 60 cm². Para células hTERT utilizou-se meio DMEM suplementado com 10% CCS (*cosmic calf serum*), anfotecirina B (2,5 μ g/mL), streptomicina (100 μ g/mL) e penicilina (100 U/mL) em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Para o cultivo das células HeLa foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% FBS, piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM), streptomicina (100 μ g/mL) e penicilina (100 U/mL) em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C.

Toxoplasma gondii GCaMP₃ foi propagado na forma de taquizoítos em células hTERT, utilizando garrafas plásticas de 25 cm². Para a manuntenção dos parasitas foi utilizado meio DMEM, suplementado com 1% FBS, 1 μ M pirimetamina (como forma de seleção para os parasitas transgênicos) e atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

3.2.2 Ensaios de invasão in vitro

Para os experimentos de invasão *in vitro* células hTERT foram cultivadas em discos para cultura com 35 mm e fundo de vidro (MatTek) até a confluência. *Toxoplasma gondii* GCaMP₃ na forma de taquizoítos foram ressuspendidos em tampão Endo (44,7 mM K₂SO₄, 10 mM MgSO₄, 106 mM de sacarose, 5 mM de glicose, 20 mM Tris-H₂SO₄, 3,5 mg/mL de BSA, pH 8,2) e adicionados aos discos contendo hTERT. Estas células foram incubadas a 37 °C por 20 minutos permitindo aos parasitas entrarem em contato com a camada de hTERT. Após a incubação o

tampão Endo foi aspirado e substituído por tampão Ringer a 37 °C como descrito em (KAFSACK et al., 2004).

As imagens foram coletadas com microscópio de fluorescência invertido Olympus IX-71 equipado com câmera fotometrix CoolSnap_{HQ} CCD comandada por software DeltaVision (Applied Precision). As imagens foram coletadas em *time-lapse* por 3 segundos por cerca de 10 minutos totalizando 603 frames. E transformadas em vídeos através do software SoftWoRx suíte 2.0 (applied Precision). Todos os experimentos foram conduzidos a 37 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados foram obtidos por meio de três experimentos independentes.

3.2.3 Ensaios de egresso in vitro

Para os experimentos de egresso *in vitro*, células HeLa (5 x 10^5) foram colocadas em discos para cultura com 35 mm e fundo de vidro (MatTek). Após 24 horas estes discos foram transfectados com 1,25 µg de DNA plasmidial codificando o indicador de Ca²⁺ R-GECO utilizando lipofectamina 2000 (invitrogen) segundo as especificações do fabricante. Cerca de 24 a 30 horas após a transfecção, células HeLa foram infectadas com *T. gondii* GCaMP3 (10^6 parasitas). 30 horas após a infecção rosetas contendo 4 a 8 parasitas foram observadas por microscopia.

Os discos foram lavados 2 vezes com tampão Ringer (NaCl 155 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, NaH₂PO₄-H₂O 3mM, Hepes 10 mM, glicose 10 mM, pH 7,2). Nos ensaios em que não há presença de Ca²⁺ extracelular, CaCl₂ foi omitido do tampão Ringer e 1 mM EGTA foi adicionado.

Para testar a influência de diferentes íons na saída de *T. gondii* da célula hospedeira, tampões com diferentes composições iônicas foram formulados. Como tampão padrão utilizamos uma solução contendo composição iônica similar à encontrada em meio extracelular (135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 5 mM de glicose, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgSO₄ e 10 mM de Hepes ou 10 mM de Tris). O pH da solução foi acertado misturando-se as soluções contendo Hepes e Tris até atingirmos pH=7,2. Ao procedermos desta maneira garantimos que as concentrações iônicas do tampão permaneceram constantes visto que ácidos ou bases não foram adicionados para acertar o pH. Partindo deste tampão realizamos

sucessivas substituições para avaliar separadamente o efeito de cada íon no processo de egresso. Deste modo tampões Ca^{2+} free (ausência de $CaCl_2$ e adição de 1 mM de EGTA), Na⁺ free (ausência de NaCl e adição de 135 mM de $C_5H_{14}CINO$), K⁺ free (ausência de KCl e adição de 5 mM de $C_5H_{14}CINO$), Cl⁻ free (ausência de NaCl, KCl e CaCl₂ e adição de 135 mM de $C_6H_{11}O_7Na$, 5 mM de $C_6H_{11}O_7K$ e 2 mM de CaN_2O_6) foram sintetizados. De modo semelhante formulamos um tampão contendo composição similar à encontrada em meio intracelular (5 mM de NaCl, 135 mM de KCl, 620 µM de CaCl₂, 1 mM de EGTA, 1 mM de MgSO₄, 5 mM de glicose e 10 mM de Hepes ou 10 mM de Tris). A adição de 620 µM de CaCl₂ e 1 mM de EGTA resultou em uma concentração de 102 nM de Ca²⁺ (para este cálculo utilizamos o software online MAXCHELATOR), concentração esta igual a encontrada no interior das células da maioria dos eucariotos.

Os discos foram lavados 2 vezes no respectivo tampão e o egresso dos parasitas foi estimulado pela adição de α-toxina 0,5 µg/mL como previamente relatado (MOUDY et al., 2001).

As imagens foram coletadas com microscópio de fluorescência invertido Olympus IX-71 equipado com câmera fotometrix CoolSnap_{HQ} CCD comandada por software DeltaVision (Applied Precision). As imagens foram coletadas em *time-lapse* por cerca de 10 minutos. As drogas foram adicionadas entre os frames 100 e 130 e as imagens obtidas foram transformadas em vídeos através do software SoftWoRx suíte 2.0 (applied Precision). Todas as incubações foram conduzidas a 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram obtidos por meio de três experimentos independentes.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem da apirase de *P. falciparum* (cepa 3D7)

É conhecido que o genoma de *Plasmodium falciparum* é composto principalmente (80%) por bases de adenina e timina (GARDNER et al., 2002) e esta mesma característica é refletida na composição do gene da apirase.

Dada a importância dessa enzima em outros parasitas, decidimos caracterizar bioquimicamente a apirase de *P. falciparum* e o primeiro passo em direção a este objetivo é clonar este gene. Para isso *primers* foram desenvolvidos visando à amplificação apenas da porção solúvel (ausência dos domínios transmembrana) da apirase de *P. falciparum* (Figura 4). Optamos por clonar apenas a porção solúvel visto que, após diversas tentativas, não foi possível amplificar e clonar toda a região codificante desta enzima. A ausência dos domínios transmembrana facilitará também a expressão heteróloga desta proteína. Estes domínios são caracterizados como altamente hidrofóbicos e como consequência podem formar aglomerados insolúveis, fazendo com que a proteína recombinante esteja presentes nos corpos de inclusão e dificultando sua purificação.

Como descrito anteriormente, RNA total extraído de parasitas foi usado na síntese de cDNA. O cDNA assim gerado foi usado como molde em reações de PCR, utilizando os *primers* específicos para o gene alvo. Após diversos experimentos em que testamos diferentes temperaturas de anelamento dos primers e extensão (Figura 5, canaletas 1 a 5), o sucesso da amplificação foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 5, canaleta 6), em que podemos observar а presença de uma banda de aproximadamente 2,4 kilobases, correspondente ao gene de interesse.

O fragmento assim gerado foi purificado do gel de agarose para a ligação em vetor de clonagem pJET (fermentas). As construções foram usadas para transformar bactérias *E. coli* TOP10 e selecionadas em meio LB sólido contendo ampicilina. Colônias foram selecionadas e testadas quanto a presença do gene. Esta confirmação se deu por reações de PCR (Figura 6), reações de digestão enzimática (Figura 6) e sequenciamento (Figura 7).



Figura 4: Predição de região transmembrana para o gene da apirase de *Plasmodium falciparum*. Ilustração feita com o software TMRPres2D, evidenciando duas possíveis regiões transmembrana, uma localizada no N terminal e outra no C terminal da proteína. A porção extracelular da enzima foi omitida para melhor visualização.

Os resultados obtidos nas reações de PCR, reações de digestão enzimática e sequenciamento confirmam o sucesso das clonagens, sendo que em todas as colônias testadas observamos a presença do gene de interesse.



Figura 5: Isolamento da região codificante da porção solúvel da apirase de *P. falciparum*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultra-violeta. A canaleta PM apresenta o marcador de pares de base 1kb plus DNA ladder (invitrogen). As canaletas 1 a 5 representam condições experimentais em que não conseguimos sucesso na amplificação. A canaleta 6 representa a amplificação do gene da apirase com aproximadamente 2,4 kb.



Figura 6: Confirmação da clonagem da porção solúvel da apirase de *P. falciparum*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultra-violeta. A canaleta PM apresenta o marcador de pares de base 1kb plus DNA ladder (invitrogen). A canaleta 1 apresenta PCR usando como molde DNA plasmidial. A canaleta 2 apresenta reação de digestão com as enzimas Xhol e Sall do DNA plasmidial.

Apirase SRH 120 | 140 1 100 160 I Apirase SRH GAAAAAAAAA TTAAGGAAAG ATTATITITIG IGTOTTATAT GOOTACTAGI AATAATATGG ITAATITAGI IITGITATAA AAAGC GGAAAAAAAA CARARIGARA RAGAGTATAGA ANTATTATA GATGETGERT CONATGERAC COGATTERT TTATTTGAAT GGAAA 102 Apirase SRH ATCATATTTA Anirase GenBank 320 340 360 1 TAATAAGAAA GAAGAAATA ATTTAATAGA ATTGAAGGAA ATATTTAATG CCAAGGTA TAATAAGAAA GAAGAAATA ATTTAATAGA ATTGAAGGAA ATATTTAATG CCAAGGTA 300 Apirase SRH Apirase GenBank Apirase SRH AATGAGATAA AAGATATATTI AATATATTIA ATTAATAAAG ITATTGATCA TITAATAGAA Aatgagataa aagatatatti aatatattia attaatagag itattgatca titaatagaa AAAAAAATTT ATGTATATAA TAAAC 292 AAAAATGGAA ATCATATCCA TITITATITIC AAGCAACAGG AGGAATGAGA AATTITAAAAD BAGAAGATAG AAATTITAAGA ATGAAATATA TAAAA 387 Aaaaatggaa atcatatca Tititatitic aagcaacagg aggaatgaga aattitaaaac aagaagatag aaattitaaga atgaatata taaaa 570 Apirase SRH Apirase GenBank CARATGATAR ITATAATCCA ITITATITITI TARATGATA IGCAAGAATI ITATCAGGAG AAGAAGA TATITATCGA IGGT 482 Caratgatar Itataatcca Ititatititi taratgata Igcaagaati Itatcagga G Aagaaga Gaitatatga Igga Igga Igga Igga Igga Apirase SRH AATTTATTAA ATAGTATTITI TICTAAACCI AATAATACAT ATGGIGGAAT AGACITAGGA GGATCATCIA CICAAATTAC ATTCI 577 Aatttattaa atagtattiti tictaaacci aataatacat atggiggaat agacitagga ggatcatcia cicaaattac attci 760 Apirase SRH Apirase GenBank CATTATITAG AGTAAATATA TATITATGIO TAGAAATAAT AAAAAAGTIG AGCACAAGAA Cattatitag agtaaatata tatitatgio tagaaataat aaaaaagtig aggacaagaa Apirase SRH ATATAAAGAA TATATATAAA CTTGA 767 Apirase GenBank Apirase SRH CATGATTATA TCAATGATTA IIIIITATAAC AACTTACCAA ATTATAATTG SITTIIITAT TCAACCAAAA Gatgattata tcaatgatta iiiitataac aacttaccaa attataattg sittiitat tcaaccaaaa Apirase SRH ATAAAGAAAA ITATAATCAT CATAATTATG AGAATATAAA ITATGATGIT AACAAAAGAA ATTATCOTTA TAATAATITI CAACAAAAAT ATATT Ataaagaaaa itataatcat cataattatg agaatataaa itatgatgit aacaaaagaa attatootta taataatiti caacaaaaat atatt Apirase GenBank Apirase SRH CATACAAATE CAAAAAAAAGG AAATTATACA AAAGGAAATA TAAATAATTC AAATAAATCA TATAAAAACC TITEGAATAT ATTATACAA GAAAT 1052 ase GenBark Catacaaate caaaaaaagg aaattataca aaaggaaata taaataatto aaataaatca tataaaaacc titegaatat attattacaa gaaat 1235 Apirase SRH TGTAAAATAT ATACAACATI CACAAAAACGA ITATCCATAT TETTCCTTAA CAGATATATA TGATTATACA TACAATATIT ATGATGAAAA ACCAT 1147 Tgtaaaatat atacaacati cacaaaacga ttatccatat tottccttaa cagatatata tgattataca tacaatatit atgatgaaaa accat 1330 Apirase GenBank Apirase SRH ase GenBank ATGATATTGA ATGATATTGA AAATTITTATA AAAAGAATCA AAAATTITTAA CAGACACTCA AAAGAAGATA CTATAATGCT TGTACAAAAT CCATGTITAC CTTAT 1242 Aaattittata aaaagaatca aaaattittaa cagacactca aaagaagata ctataatgct tgtacaaaat ccatgttac cttat 1223 TGAAAATAAC ATTCCCTACG TACAACCTAG TAACTAGCCA ATTTGTCATT CTAAAGAAAA ATAGTAGAAA TGAAATAGCA AATAT 1337 Tgaaaataac attccctacg tacaacctag taactagcca atttgtcatt ctaaagaaaa atagtagaaa tgaaatagga aatat 1520 Apirase SRH Apirase GenBank Apirase SRH Apirase GenBank AAATGACATA AAAAATGATG GTAATAATTA TACACAAAAT GATGATAATA ATTATACACA AAATGATGGT AATTATTATA GACAAAATGT TGGTA 1432 Aaatgacata aaaaatgatg gtaataatta tacacaaaat gatgataata attatacaca aaatgatggt aattattata gacaaaatgt tggta 1615 1.620 TTATTATAG ACATAACCAT AATATTAATG ACGTGTACGA ATTAAATAGT AGTGAGAGTT ATGATAATTT TATTTCAAAT TITGTTCTTA AATTA 1527 Aatattaatg acgtgtacga attaaatagt agtgagagtt atgataattt tatttcaaat titgttctta aatta 1710 Apirase SRH Apirase GenBank Apirase SRH GTECCTTATE GATAATATAT ATGAAGATIT TAAAAAGAAG GGATATITAA ATAATGT GTECCTTATE GATAATATAT ATGAAGATIT TAAAAAGAAG GGATATITAA ATAATGT 1.820 1.860 1.880 AGTAATAGTE IGAAGAATGA AATAATAAAA CGTETTITIG AAAAAATAAT TAATGAAAAA ATTAAAAAGE TATATAAAA TAATAAA Agtaatacte igaagaatga aataataaaa ggtettitig aaaaataat taatgaaaaa attaaaage tatatataaa tataa Apirase SRH Anirase GenBank P SRH CAGTAAGAAT AGTOGGATCE AATGATTITA AGAAAGTTTTT AGAAAATGATA AAAAAGGTTTT TITATGAAGA ACCTTGTTTT CTTTGTTCTT GTAGT 1812 NBank Cagtaagaat agtoggatce aatgattita agaaatgitt agaaaatgat agaaatgata tagaagatta titatgaaga accttgtttt bittgttet gtagt 1995 Apirase SRH TITAATGGAA TITATCAACC TAATTTAGAA AACAATAAAT IIGTTITACA IGGTCAATTI AAAAAGGITA TAACTTATTI AGGITTITAAA AAATA 1907 Apirase SRH Apirase GenBank IGTAGATITA NATCANATCA AGATATATAT ACAGANATTA TGTAACATGA ATTTAITAGA ATTAACATAT AATATGTETA ATAAAATTAT GCATA 2002 Tgtagatta aatgaaatga agatatatata acaganatta tgtaacatga atttaitatga attaacatat aatatgteta ataanattat gcata 2165 Apirase SRH TACATITITGI IGGAAATCTA TATGGTCTTA TICATTATTA TITTATGGTI TTAAGTTTAA AGAAACTACT AAACTTI Tacatititgi iggaaatcta tatggtctta ticattatta tittatggti ttaagtttaa agaaactact aaactti Apirase SRH AT CAAA TT CC AA TTATA 2097 Apirase GenBank AATGATAATA CCAATATITE ATATGATICA TEAAGTACTI CACAGGEATE AAAACAATIT TATAAAAGGG TIGAAAATAA GGAACAAAAT AATTA 2192 Aatgataata ccaatatite atatgatica teaagtacti cacaggeate aaaacaatit tataaaaggg tigaaaataa ggaacaaaat aatta 2375 Apirase SRH Apirase GenBank TITACACGAC AAAACAAATT ATAATAATGA ATATAACTTA AATAACAAAA TAGATAATAT TAGTIGGACT CATGGACTA Titacacgac aaaacaaatt ataataatga atataactta aataacaaaa tagataatat tagtiggact catggatcta Apirase SRH TGATATACCA AATTA 2287 TGATATACCA AATTA 2470 Apirase GenBank Apirase SRH AGAGCGTTTT Agagcgtttt 2.600 2.620 2.580

Figura 7: Sequencimanto da porção solúvel da apirase (SRH- Sem Região Hidrofóbica) de *P. falciparum*. O gene clonado foi sequenciado e comparado com a sequência referência presente do GenBank (PF3D7_1431800). Observa-se a ausência das regiões transmembrana C-terminal e N-terminal que foram excluídas visando o melhor rendimento na expressão heteróloga.

4.2 Códon-otimização e síntese do gene da apirase de Plasmodium falciparum

Utilizando o algoritmo OptmiumGene[™] fomos capazes de predizer a eficiência da expressão do gene da apirase em *E. coli*. Como pode ser observado, diferenças no *codon usage* entre *P. falciparum* e *E. coli* comprometem a eficiência da expressão heteróloga deste gene (Figura 8)



Figura 8: Análise da frequência no uso de códons do gene da apirase de *P. falciparum* em *E. coli.* A frequência relativa é apresentada antes (azul) e após (verde) a códon-otimização. *Codon Adaptation Index* (CAI) igual a 1 é considerado excelente e CAI > 0,8 é considerado bom para a expressão de um gene em determinado organismo.

Para sanar este problema procedemos a uma códon-otimização do gene da apirase. Este processo visa modificar a sequência de nucleotídeos do gene original, entretanto sem alterar a proteína expressa. O gene códon-otimizado foi sintetizado pela empresa GenScript (NJ, EUA) e sub-clonado em vetor de expressão em bactéria pET21b segundo protocolos estabelecidos pela empresa. Ensaios com a proteína recombinante serão capazes de fornecer informações sobre possíveis inibidores, como também preferência por substratos e parâmetros cinéticos desta enzima. Acreditamos que a apirases possuem um potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas, visto sua relação com a virulência e infectividade em diversos parasitas.

4.3 Avaliação da atividade ecto-ATPásica de *P. falciparum* em cultural

Para melhor entender o papel da apirase na fisiologia de *Plasmodium falciparum* avaliamos a capacidade de degradação de ATP nas distintas fases do ciclo intraeritrocítico do parasita (Figura 9).



Figura 9: Atividade ATPásica nas diferentes fases do ciclo assexuado de *Plasmodium*. Observa-se um aumento da atividade durante o desenvolvimento do parasita de anel para trofozoíto, entretanto nenhuma atividade foi detectada no estágio esquizonte. ND=Não detectada. *t Student*, (*) p<0,05.

De acordo com este resultado observa-se a atuação da apirase nos estágios de anel e trofozoíto, enquanto que em esquizonte nenhuma atividade ATPásica foi detectada.

Até o presente momento a presença e atividade NTPDásica não havia sido relatada em *Plasmodium falciparum*. Deste modo, o papel desempenhado por essa enzima neste parasita ainda não foi elucidado. Nossos resultados demonstram a presença de uma enzima no parasita capaz de hidrolisar nucleotídeos extracelulares em quantidades detectáveis. Esta hidrólise foi observada em aneis (5,5 nmols de Pi/10⁷ células x h) e trofozoítos (13,4 nmols de Pi/10⁷ células x h), entretanto nenhum atividade foi detectada em esquizontes. A comparação entre a hidrólise de nucleotídeos extracelulares apresentada por *Plasmodium* com outros protozoários parasitas é dificultada, visto as diferenças nas condições experimentais testadas, por

exemplo, o número de células, composição do tampão, tempo de incubação dos parasitas, entre outros. O estudo que apresenta condições experimentais mais próximas das utilizadas em nossos experimentos foi o realizado por Fietto et al. (2004) utilizando *T. cruzi* em sua forma epimastigota. Neste trabalho detectou-se a liberação de 59 nmols de Pi/10⁷ células x h, valor este acima do apresentado por *P. falciparum*.

Como dito anteriormente, parasitas apicomplexas como *Plasmodium falciparum* não sintetizam purinas *de novo* e como alternativa capturam estas moléculas das células hospedeiras como nutriente essencial (DE KONING et al., 2005). É conhecido que a síntese de DNA aumenta com a passagem do estágio anel para trofozoíto, dessa forma com o amadurecimento do parasita ocorre o aumento na demanda por purinas visando à síntese de ácidos nucléicos. Como modo de suprir essa demanda aumentaria também a atuação das apirases, que ao degradar nucleotídeos extracelulares geram adenosina que são incorporadas pelo parasita e utilizadas na síntese *de novo* de purinas. Entretanto, tal fato não explica a não detecção de atividade no estágio esquizonte, visto que nesta fase ocorre a esquizogonia em que a multiplicação de material genético é intensa.

Desta forma, acreditamos que a apirase não possui como alvo apenas suprir a demanda de purinas pelo parasita, desempenhando assim um papel distinto em *Plasmodium.*

4.4 Adição de inibidores de apirases durante o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* (cepa 3D7)

Membros da família Ecto-NTPDase (apirase) são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos di e trifosfatados em seus constituintes monofosfatos. Deste modo, acredita-se que a principal função destas nucleotidases esta relacionada à terminação da sinalização purinérgica (ZIMMERMANN, 2000). ATP extracelular é uma molécula pró-inflamatória, agindo no meio como um sinal induzido por infecção ou injuria do tecido (DI VIRGILIO et al., 2001). Como consequência, a ação das apirases tem sido relacionada como um fator de virulência dos microrganismos visto a capacidade destas enzimas em degradarem ATP, interferindo assim na resposta inflamatória contra o invasor.

Em *Trypanosoma cruzi* esta relação foi muito bem evidenciada. Santos et al. (2009) demonstraram que a inibição da ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase do parasita levou a diminuição da infectividade em experimentos *in vitro* e *in vivo* (SANTOS et al., 2009). Especificamente, *T. cruzi* intactos foram incubador por 10 minutos com inibidores de apirases (300 μ M ARL 67156, 300 μ M GdCl₃ ou 100 μ M Suramina) e usados na infecção de células VERO. Após 48 horas o número de amastigotas por célula infectada foi mensurado.

Suramina mostrou-se a droga mais eficiente ao inibir a infecção em 71% quando comparadas ao grupo controle. ARL 67156 e GdCl₃ causaram 42% e 65% de inibição, respectivamente. Entretanto, apenas as inibições provocadas por suramina e GdCl₃ mostraram-se estatisticamente significantes. Para confirmar os resultados dos experimentos in vitro, os autores realizaram experimentos in vivo utilizando camundongos como modelo. De modo semelhante aos experimentos com células VERO, os parasitas foram pré-incubados com inibidores de apirases (300 µM ARL 67156, 300 µM GdCl₃ ou 100 µM Suramina) e utilizados para infectar camundongos. Os resultados obtidos mostram claramente que ARL 67156 e GdCl₃ foram capazes de reduzir significativamente a parasitemia dos animais, como também aumentar a taxa de sobrevivência dos hospedeiros. Curiosamente, 100 µM de suramina não resultou em uma significativa proteção dos animais. Para testar a eficiência desta droga in vivo, os autores utilizaram concentrações maiores (300 µM e 1mM), sendo que apenas a exposição dos parasitas a 1 mM de suramina resultou em uma diminuição significativa da parasitemia, como também no aumento da taxa de sobrevivência dos animais (SANTOS et al., 2009).

Para testar a influência da apirase de *P. falciparum* durante seu ciclo intraeritrocítico, parasitas no estágio anel foram incubados por 48 horas na presença de inibidores de apirases em diferentes concentrações (100 e 500 µM). Os inibidores utilizados foram GdCl₃, ARL 67156 e Suramina, visto que sua ação sobre estas enzimas já foi relatada. GdCl₃ e Suramina foram capazes de inibir ecto-NTPDase de órgãos elétricos de animais do gênero *Torpedo* e ARL 67156 é considerado um inibidor específico de ecto-ATPases (CRACK et al., 1995; ESCALADA et al., 2004; MARTI et al., 1996).



Figura 10: Influência de inibidores de apirase no ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* cepa 3D7. As drogas utilizadas foram adicionadas a uma cultura sincrônica em estágio anel e alíquotas foram retiradas após (A) 6 horas, (B) 20 horas, (C) 34 horas e (D) 48 horas da adição dos compostos. Os dados foram normalizados com o controle em que não houve o uso de drogas. *One way* ANOVA, (*) p<0,001, (**) p<0,01 e (***) p<0,05.

De todas as drogas testadas suramina foi a que apresentou o maior efeito sobre o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. Sua ação foi observada em todos os intervalos de tempo analisados (6, 20, 34 e 48 horas) em ambas as concentrações (100 e 500 µM), bloqueando o desenvolvimento do parasita (Figura 10). Após 48 horas esta droga foi ainda capaz de prejudicar a invasão de novas hemácias pelos merozoítos, causando assim uma brusca diminuição na parasitemia.

O efeito inibitório causado por suramina não foi surpreendente. Dados presentes na literatura já relataram a inibição da invasão de eritrócitos por *P. falciparum* pelo uso de suramina, entretanto sua ação foi relacionada à inibição do

processamento de MSP1 (FLECK et al., 2003), como também a inibição de receptores purinérgicos presentes na membrana do parasita (LEVANO-GARCIA et al., 2010). Deste modo, por se tratar de uma droga inespecífica, não podemos atribuir o seu efeito apenas a inibição da apirase de *P. falciparum*.

Gadolínio e ARL67156 apresentaram um efeito mais modesto no ciclo de *P. falciparum*. A adição de 100 μ M de gadolínio não apresentou efeito em quaisquer tempos analisados. Uma maior concentração desta droga, por sua vez, foi capaz de interferir no desenvolvimento dos parasitas após 20 e 34 horas. Após 48 horas de incubação esta droga foi também foi capaz de inibir de modo significativo a invasão de hemácias por merozoítos, causando assim uma diminuição da parasitemia quando comparada ao grupo controle (Figura 10). Além da ação sobre ecto-NTPDases, gadolínio também é um potente inibidor de canais de Ca²⁺ (BOURNE; TRIFARO, 1982). A sinalização por Ca²⁺ é vital para o parasita da malária e moléculas que interfiram nesta via afetarão o desenvolvimento de *P. falciparum*. Deste modo, semelhantemente ao que ocorre com suramina acreditamos que o efeito observado pelo uso desta droga não se deve apenas a inibição da apirase de *P. falcipaum*.

ARL67156 ou 6-*N*,*N*-dietil-d- β - γ -dibromometileno trifosfato de adenosina é um análogo de nucleotídeo utilizado como inibidor de ecto-ATPases (LEVESQUE et al., 2007). Nossos resultados indicam uma ação no ciclo de *Plasmodium falciparum* após 20 e 34 horas em presença de uma maior concentração do inibidor (500 µM). Como pode ser observado ocorreu uma diminuição da parasitemia indicando um possível papel da apirase no correto desenvolvimento do parasita no interior da hemácia. Após 48 horas de incubação ambas as concentrações testadas (100 e 500 µM) prejudicaram a invasão de novos eritrócitos pelos merozoítos (Figura 10). Este dado sugere a participação das apirases no processo de invasão da célula, indicando assim a participação de nucleotídeos extracelulares neste processo. Este resultado esta em concordância com dados prévios de nosso grupo, em que foi demonstrada a participação da sinalização purinérgica, em especial aquela desempenhada por ATP extracelular, na invasão de hemácias por *P. falciparum* (LEVANO-GARCIA et al., 2010).

4.5 Análise da expressão da apirase de *Plasmodium falciparum* durante as diferentes fases do ciclo intra-eritrocítico

O perfil de expressão da apirase de *P. falciparum* foi analisado por *real time quantitative PCR* (qPCR) conforme descrito anteriormente. Estudos prévios do transcriptoma obtidos por *microarray* disponíveis no banco de dados PlasmoDB (AURRECOECHEA et al., 2009) relatam uma expressão diferencial deste gene nas diferentes fases do parasita (Figura 11).



Figura 11: Perfil de expressão da apirase de *P. falciparum* (cepa 3D7) durante o ciclo intraeritrocítico. Fonte: Plasmodb.

Como pode ser observado há uma maior expressão da apirase no estágio trofozoíto quando comparada as outras fases do parasita. Entretanto, como dito anteriormente estes resultados foram obtidos por experimentos de *microarray* em que centenas de genes são analisados simultaneamente. Para confirmar estes dados, decidimos analisar o perfil de expressão da apirase por uma técnica distinta e direcionada apenas para este gene.

Analises por *quantitative real time PCR* (qRT-PCR) utilizando *primers* específicos para a apirase confirmaram um distinto padrão de expressão deste gene (Figura 12). Como pode ser observado, há um aumento na expressão da apirase no estágio trofozoíto quando comparado aos outros estágios. Nesta fase, considerada a mais metabolicamente ativa do parasita, a apirase poderia atuar na captação de purinas do meio exterior, auxiliando assim na síntese *de novo* de purinas.



Figura 12: Perfil de expressão da apirase de *P. falciparum* (cepa 3D7) durante o ciclo intraeritrocítico. *Quantitative real time PCR* (qPCR) foi realizado tendo como molde cDNA do parasita. Uma maior expressão do gene em trofozoítos pode ser observada indicando assim um possível papel na captação de purinas. *One way* ANOVA (*) p<0,01.

Interessantemente, o gene da apirase estaria ausente em espécies de plasmódios que acometem roedores e outros primatas, revelando assim um potencial papel desta enzima no estabelecimento da doença em humanos (FRECH; CHEN, 2011).

Experimentos com a enzima recombinante ajudarão a revelar o papel desta enzima na fisiologia do parasita, como também em processos de sinalização celular. Sua ecto-localização a torna um bom candidato para o desenho racional de drogas, permitindo o desenvolvimento de novos antimaláricos.

4.6 Construção e análise da resposta de Ca²⁺ de parasitas PfGCaMP3

A via de sinalização por Ca²⁺ é fundamental para todas as células eucarióticas. No complexo ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da forma mais grave da malária em humanos, Ca²⁺ esta envolvido nos processos de

secreção de proteínas, motilidade, invasão e egresso da célula hospedeira (KOYAMA et al., 2009).

Buscando avançar no conhecimento da sinalização de Ca²⁺ neste parasita, construímos *P. falciparum* transgênicos capazes de expressar de forma estável o indicador de Ca²⁺ GCaMP3. Neste sentido, clonamos o gene deste indicador em vetor de propagação em bactéria pJET e o transferimos para o vetor de expressão em *Plasmodium* pDC. A construção pDC/GCaMP3 foi utilizada para transfectar *P. falciparum*. Para isso, uma população de parasitas no estágio anel foi submetida à eletroporação para inserção dos plasmídeos e os transfectantes foram selecionados em meio contendo 5 nM da droga WR99210.

Os parasitas PfGCaMP3 foram submetidos a *cell sorting* e diluição clonal para isolar uma população capaz de responder eficientemente a variações na concentração de Ca²⁺ no citoplasma da célula. Após uma série de testes, uma população com maior percentagem de parasitas fluorescentes foi escolhida e utilizada nos experimentos seguintes (Figura 13).

A construção de *P. falciparum* codificando GECIs representa uma inovação no estudo da sinalização de Ca²⁺. Utilizando estes novos parasitas transgênicos seremos capazes de analisar as flutuações na concentração de Ca²⁺ no citosol do *P. falciparum* sem interferência de sinais provenientes da célula hospedeira. Outro ponto a se ressaltar é a possibilidade de expandir esta técnica para a medição de Ca²⁺ em diferentes compartimentos sub-celulares.



Figura 13: Eritrócito infectado com *P. falciparum* transfectado com o indicador de Ca²⁺ GCaMP3. A. Campo claro e B. imagem do parasita fluorescente expressando GCaMP3. As imagens foram adquiridas em um microscópio Axio Scope A.1 (Zeiss) e analisadas como Axio Vision 4.8 software. A objetiva utilizada foi 100x N-Achroplan com óleo de imersão.

A resposta de Ca²⁺ do clone selecionado foi testada na presença do ionóforo de Ca²⁺ ionomicina. Para isso uma cultura sincrônica no estágio trofozoíto foi exposta a 2 µM de ionomicina por 1 minuto e o aumento da fluorescência foi analisado por citometria de fluxo como descrito anteriormente.

Um claro aumento na população de parasitas fluorescentes pôde ser observado após a adição do ionóforo (Figura 14). O aumento na concentração citosólica de Ca²⁺ e a ligação do íon ao GCaMP3 resultou em um aumento significativo da fluorescência dos parasitas. *P. falciparum* wild type foram usados como controle, mostrando se tratar de uma resposta específica dos parasitas transfectados.



Figura 14: Resposta de Ca²⁺ em parasitas PfGCaMP3. Parasitas A. PfGCaMP3 e B. wild type 3D7 foram estimulados com ionomicina (vermelho) por 1 minuto. O aumento na fluorescência dos parasitas foi analisado por citometria de fluxo. FL1-H foi usado para detectar a emissão de fluorescência do GCaMP3 em 530 nm. Os histogramas sobrepostos em verde e preto representam controles sem tratamento e tratados com DMSO, respectivamente.

A resposta de Ca²⁺ dos parasitas PfGCaMP3 foi também observada por miscroscopia de fluorescência. Parasitas no estágio trofozoíto foram expostos a tapsigargina, um conhecido inibidor da Ca²⁺-ATPase (SERCA) de *Plasmodium falciparum* (VAROTTI et al., 2003) e ao ionóforo de Ca²⁺ ionomcina. Como pode ser visualizado (Figura 15) há um claro aumento na fluorescência dos parasitas após a exposição a estes compostos, indicando assim um aumento na concentração de Ca²⁺ citosólico. Em conjunto estes dados demonstram a validação dos parasitas

PfGCaMP3 quanto a sua capacidade de responder a variações na concentração de Ca²⁺ em seu interior.



Figura 15: Resposta de Ca²⁺ em parasitas PfGCaMP3. Parasitas PfGCaMP3 **A.** em repouso e após serem estimulados com (B) tapsigargina e (C) ionomicina. O aumento na fluorescência dos parasitas foi analisado em microscópio de fluorescência. Barra de escala = $10 \ \mu m$.

PfGCaMP3 apresenta-se como um parasita transgênico capaz de responder a variações na concentração de Ca²⁺ em seu interior sem o uso de métodos invasivos de marcação. Estes parasitas fornecerão uma nova percepção da homeostasia de

Ca²⁺ e sinalização em *Plasmodium falciparum*. Adicionalmente, poderão ser utilizados no *screening* de novas drogas antimaláricas capazes de interferir em vias de sinalização essenciais capazes de controlar o crescimento e desenvolvimento do parasita.

4.7 Papel do íon Ca²⁺ na invasão e saída da célula hospedeira por *Toxoplasma* gondii

No parasita *Toxoplasma gondii* o conhecimento acerca dos sinais que desencadeiam a invasão e a saída da célula infectada ainda é fragmentado. Entretanto após a publicação de diversos trabalhos tornou-se claro que variações na concentração citosólica de Ca²⁺ no parasita desempenham um papel central nos processos vitais de seu ciclo (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004).

Como dito anteriormente, o papel do Ca²⁺ na invasão por *T. gondii* já foi alvo de diversos trabalhos. Nestes estudos foi demonstrado que o Ca²⁺ presente nas organelas intracelulares do parasita era necessário e suficiente na invasão e, como consequência, a ausência deste íon no meio extracelular ou no interior da célula hospedeira não era capaz de afetar este processo (LOVETT; SIBLEY, 2003; MONDRAGON; FRIXIONE, 1996).

Todos estes trabalhos utilizaram pequenas moléculas orgânicas como indicadores de Ca²⁺ intracelular. Estas moléculas exógenas foram inseridas por métodos muitas vezes invasivos, podendo assim modificar a estrutura interna do *Toxoplasma gondii*. Deste modo, em parceria com o grupo comandado pela Dra. Silvia Moreno, fomos pioneiros ao utilizarmos um indicador de Ca²⁺ geneticamente codificado em parasitas, no qual mostramos por meio de microscopia de fluorescência as flutuações na concentração de Ca²⁺ que ocorrem durante a invasão (Figura 16).



Figura 16: Invasão da célula hospedeira por *T. gondii* ocorre via elevação de Ca²⁺ citosólico. Taquizoítos extracelulares expressando o indicador GCaMP3 invadiram células hTERT. Um claro aumento na concentração de Ca²⁺ extracelular precede a invasão das células. Em (A) células em repouso, (B) um aumento na fluorescência indica um aumento na concentração de Ca²⁺ no parasita, (C) o parasita invade a célula com formação da *tight junction*, (D) após a invasão parasita se encontra no interior da nova célula hospedeira. Barra de escala = 5μ M.

Nestes experimentos, taquizoítos de *T. gondii* expressando GCaMP3 foram ressuspendidos em tampão Endo (44,7 mM K₂SO₄, 10 mM MgSO₄, 106 mM de sacarose, 5 mM de glicose, 20 mM Tris-H₂SO₄, 3,5 mg/mL de BSA, pH 8,2) e adicionados a discos contendo hTERT. Este tampão é caracterizado por não permitir a invasão das células pelos parasitas devido à alta concentração de K⁺ no meio (KAFSACK et al., 2004). Após 20 minutos nestas condições foi observado, com o uso de microscópio, que os parasitas estavam em contato com as células hTERT, entretanto sem invadi-las. O tampão Endo foi aspirado e substituído por tampão Ringer (155 mM NaCl, 3 mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 3mM NaH₂PO₄-H₂O, 10 mM Hepes, 10 mM glicose, pH 7,2), permitindo assim que a invasão ocorra normalmente.

As imagens foram adquiridas por 10 minutos após a adição de tampão Ringer e a variação na concentração de Ca²⁺ intracelular dos taquizoítos foi analisada durante este processo. Como pode ser visto, um claro aumento de Ca²⁺ citosólico ocorre nos parasitas momentos antes da invasão da célula hTERT. Este aumento está ligado à movimentação do parasita e não é observado nos taquizoítos que não invadem (Figura 16).

É tentador relacionar a elevação de Ca²⁺ no citoplasma da célula com a ativação de mecanismos de motilidade no parasita. Entretanto, para comprovar esta hipótese faz-se necessário experimentos adicionais na presença de inibidores conhecidos da motilidade de *T. gondii* (Citocalasina D e bafilomicina A). Vale ressaltar novamente a importância deste íon neste processo, visto que em nossos experimentos todos os parasitas que foram capazes de invadir mostraram, momentos antes da invasão, uma clara elevação de Ca²⁺ no citoplasma.

A saída da célula hospedeira também já foi relacionada com alterações na concentração de Ca²⁺ no parasita. Estudos publicados na década de 80 relatam que a adição de ionóforos de Ca2+ a parasitas intracelulares era capaz de estimular a rápida egresso. Entretanto, neste trabalho não foram realizadaa medições da variação da concentração de Ca²⁺ nas células (ENDO et al., 1982). Trabalhos publicados por Moudy et al. (2001) demonstram que um aumento na concentração de Ca²⁺ é observado momentos antes da egresso de *T. gondii*. Todavia, cabe ressaltar que nestes ensaios foram utilizadas moléculas orgânicas (Fura-PE3/AM) indicadores, marcando célula hospedeira como assim parasita е indiscriminadamente. Deste modo, qualquer inferência sobre distintos padrões de fluorescência entre parasita e célula infectada não podem ser feitos.

A origem do Ca²⁺ necessário para a egresso ainda é tema de extensivo debate na literatura. Trabalhos publicados por Black et al. (2010) relatam a necessidade de Ca²⁺ extracelular, visto que o uso de meio extracelular em que este íon esta ausente foi capaz de inibir significativamente este processo. Por outro lado, Moudy et al. (2001) defendem que o Ca²⁺ presente em organelas do parasita é suficiente para causar a saída da célula infectada. Neste sentido estudos mais detalhados e com ferramentas celulares e moleculares mais precisas se fazem necessários para sanar esta divergência.

O primeiro ponto a ser analisado é a flutuação da concentração citosólica de Ca^{2+} no parasita durante a egresso. Entretanto, estas medições devem ser feitas sem a interferência de sinais provenientes da célula hospedeira. Neste sentido, e novamente em parceria com o grupo comandado pela Dra. Silvia Moreno, fomos os primeiros a mostrar as variações que ocorrem na concentração deste íon no parasita isoladamente. Para isso, utilizamos *T. gondii* transgênicos expressando GCaMP3 como indicador intracelular de Ca²⁺, evitando assim métodos invasivos de marcação.

Discos contendo *T. gondii* GCaMP3 intracelulares foram expostos a 1µM do ionóforo de Ca²⁺ ionomicina conforme descrito anteriormente. Um claro aumento na concentração citosólica de Ca²⁺ é observado resultando no egresso e lise da célula hospedeira (Figura 17). Após repetidos experimentos tornou-se nítido que um aumento de Ca²⁺ no citoplasma precede a ativação de mecanismos de motilidade no parasita. Entretanto, assim como nos ensaios de invasão faz-se necessário estudos mais detalhados na presença de inibidores de motilidade para testar essa hipótese.

O uso de parasitas transgênicos se fez útil na análise das flutuações de Ca²⁺ durante a egresso. Entretanto, buscando sanar as divergências sobre o a origem do Ca²⁺ para este processo é necessário também observar as oscilações deste íon na célula infectada. O uso de moléculas orgânicas para esta finalidade não é viável visto que, como dito anteriormente, irão marcar parasita e célula hospedeira indiscriminadamente. Para superar este impasse em nossos experimentos, nós lançamos mão do uso de novos indicadores geneticamente codificados (ZHAO et al., 2011). Através desta nova tecnologia fomos capazes de transfectar transientemente células HeLa com R-GECO, que por sua vez codifica um marcador de Ca²⁺ de cor distinta do GCaMP3 presente nos parasitas, permitindo assim a análise de flutuações de Ca²⁺ nos parasitas e células infectadas simultaneamente.



Figura 17: Egresso de *T. gondii* GCaMP₃ é relacionada com aumento intracelular de Ca²⁺. Taquizoítos intracelulares foram expostos a 1 μ M de ionomicina, em (A) observamos as células em respouso momentos antes da adição da droga, (B) um claro aumento na fluorescência indica um aumento na concentração de Ca²⁺ do parasita, (C) os parasitas começam a egressar, (D) parasitas completamente extracelulares após o tratamento com ionomicina. Barra de escala = 10 μ M.

Com o uso desse novo sistema, células HeLa expressando R-GECO e parasitas intracelulares expressando GCaMP3, partimos para novos experimentos utilizando uma série de diferentes compostos na busca da elucidação da dinâmica de Ca²⁺ no parasita durante a egresso.

Como primeiro ensaio expusemos células HeLa infectadas com parasitas intracelulares a 1µM de ionomicina (Figura 18), visto o efeito já conhecido desta droga em estimular a egresso. Ionomicina é conhecido como um potente ionóforo de Ca²⁺, possuindo maior efeito que A23187. Esta droga é capaz de causar o influxo de Ca²⁺ seguindo um gradiente de concentração e como tal foi capaz de causar aumento da concentração deste íon no citoplasma da células HeLa e dos parasitas como pode ser observado pelo aumento da fluorescência nestes compartimentos.

Como esperado, este aumento de Ca²⁺ resultou na rápida egresso de *T. gondii* e lise da célula hospedeira por um mecanismo dependente deste íon.



Figura 18: Egresso de *T. gondii* GCaMP₃ é relacionada com aumento intracelular de Ca²⁺. Sistema composto de células HeLa expressando R-GECO e taquizoítos intracelulares expressando GCaMP₃ foram expostos a 1 μ M de ionomicina, em (A) observamos as células em respouso momentos antes da adição da droga, (B) um claro aumento na fluorescência indica um aumento na concentração de Ca²⁺ do parasita e célula HeLa, (C) os parasitas começam a egressar, (D) parasitas extracelulares após o tratamento com ionomicina. Em (E) temos a quantificação das alterações da fluorescência durante o experimento. Os valores foram obtidos através do software ImageJ. Barra de escala = 10 μ M.

Sabe-se que em situações fisiológicas a concentração de Ca²⁺ livre no citoplasma das células encontra-se em torno de 70-100 nM e que em algumas organelas como o retículo endoplasmático e acidocalcisomas a concentração deste íon é mais elevada podendo chegar a ordem de mM (MORENO et al., 2011). Deste modo, e seguindo um gradiente de concentração, espera-se que o Ca²⁺ responsável pelo aumento da fluorescência no citosol das células seja proveniente destas organelas e também do meio extracelular, que em nossos experimentos possui 2 mM de Ca²⁺.

Com o intuito de testar a necessidade de Ca²⁺ extracelular no processo de egresso repetimos o mesmo experimento, mas agora em tampão Ringer sem a

adição de Ca²⁺ e suplementado com 1 mM de EGTA (Figura 19). Como pode ser observado, assim como nos experimentos anteriores, ocorre um aumento na fluorescência das células mesmo na ausência de Ca²⁺ extracelular, que também não foi capaz de afetar a saída do parasita. Este aumento foi provavelmente provocado por estoques intracelulares do íon, que migraram de áreas de maior concentração (organelas) para as de menor concentração (citoplasma).

Como dito previamente, ionomicina é um potente ionóforo de Ca²⁺ capaz de gerar um grande aumento deste íon no citosol da célula. Entretanto, seu uso nos experimentos afasta-nos das condições fisiológicas reais em que o a egresso dos parasitas ocorre. Para sanar este problema decidimos usar compostos com ação mais branda e próximas das condições que este processo ocorre nas células.

A primeira droga a ser testada neste intuito foi tapsigargina. Este composto é conhecido como inibidor da Ca²⁺-ATPAse (SERCA) presente na membrana do retículo endoplasmático de diversos eucariotos (MORENO et al., 2011), causando assim um aumento da concentração deste íon no citoplasma da célula. A SERCA de alguns parasitas, como *P. falciparum*, é inibida pela adição de tapsigargina, todavia esta inibição é resultante do uso de maiores concentrações da droga quando comparados com outros eucariotos (VAROTTI et al., 2003).


Figura 19: *T. gondii* GCaMP₃ é capaz de egressar da célula hospedeira mesmo na ausência de Ca²⁺ extracelular. Sistema composto de células HeLa expressando R-GECO e taquizoítos intracelulares expressando GCaMP₃ foram expostos a 1 μ M de ionomicina em tampão Ringer sem Ca²⁺ e suplementado com 1 mM de EGTA, em (A) observamos as células em repouso momentos antes da adição da droga, (B) um claro aumento na fluorescência indica um aumento na concentração de Ca²⁺ do parasita e célula HeLa, (C) os parasitas começam a egressar, (D) parasitas extracelulares após o tratamento com ionomicina. Em (E) temos a quantificação das alterações da fluorescência durante o experimento. Os valores foram obtidos através do software ImageJ. Barra de escala = 10 μ M.

Iniciamos nossos experimentos utilizando 1 μ M de tapsigargina, devido esta concentração causar inibição da SERCA em grande parte das células eucarióticas. A adição deste composto causou um aumento da fluorescência no citosol da célula HeLa e do parasita (Figura 20). Interessantemente este aumento da concentração de Ca²⁺ não foi capaz de ativar a saída de *T. gondii* em nossos experimentos. Este dado sugere a presença de um limiar na concentração deste íon necessário para egresso. A concentração de 1 μ M de tapsigargina, por sua vez, não fornece a quantidade de Ca²⁺ necessária para ultrapassar este limiar. Como resultado não observamos o egresso dos parasitas.

Para testar a hipótese apresentada acima procedemos à adição de 10 µM de tapsigargina as células infectadas, procurando assim causar um maior aumento na liberação de Ca²⁺ e, consequentemente, a saída dos parasitas. O uso desta concentração da droga foi tóxico (Figura 20 F), causando o extravazamento do conteúdo celular.



Figura 20: Tapsigargina 1 μ M não é capaz de estimular a egresso de *T. gondii* GCaMP₃ via aumento citosólico de Ca²⁺. (A) células em repouso antes da adição da droga, (B) adição de 1 μ M de tapsigargina causa aumento na fluorescência na célula HeLa e nos parasitas, (C-D) o aumento de Ca²⁺ gerado não é capaz de causar o egresso dos parasitas. Em (E) temos a quantificação das alterações da fluorescência durante o experimento. Os valores foram obtidos através do software ImageJ. (F) A presença de 10 μ M de tapsigargina foi tóxica para células HeLa. Barra de escala = 10 μ M.

Os resultados obtidos pelo uso de ionomicina nos incitaram a analisar separadamente as elevações de Ca²⁺ na célula HeLa e parasitas. O objetivo desta análise foi verificar se elevações de Ca²⁺ apenas no parasita podem estimular sua egresso ou, de modo contrário, se o aumento de Ca²⁺ apenas na célula hospedeira poderia ativar este processo, indicando assim a necessidade de Ca²⁺ extracelular.

Foi relatado na literatura que o uso de histamina era capaz de causar aumento da concentração de Ca²⁺ citosólico em células HeLa expressando o





Figura 21: Histamina 100 μ M não é capaz de estimular aumento na fluorescência de *T. gondii* GCaMP₃. 100 μ M de histamina foi adicionada a taquizoítos extracelulares expressando GCaMP₃ e nenhum aumento de fluorescência foi observado. A adição de 1 μ M de ionomicina causou resposta indicando a viabilidade dos parasitas.

No intuito de verificar se histamina poderia ser usado em nossos experimentos como um modo de estimular apenas a resposta de Ca²⁺ na célula hospedeira, testamos a resposta de taquizoítos extracelulares na presença desta droga.

Como pode ser observado, a adição de 100 μ M de histamina não foi capaz de estimular a elevação de Ca²⁺ em parasitas isolados (Figura 21). Isso provavelmente se deve a ausência de receptores do tipo H (H₁,H₂,H₃ e H₄) na membrana de *T. gondii.*

Os resultados anteriores demonstram que histamina é um potencial candidato para verificarmos a participação de Ca²⁺ proveniente da célula hospedeira no processo de egresso. A adição de 100 µM de histamina causou uma elevação na concentração de Ca²⁺ citosólico nas células infectadas e não infectadas e um

discreto, ou muitas vezes ausente, aumento deste íon no parasita (Figura 22). Foi proposto que o vacúolo parasitóforo de *T. gondii* age como uma peneira, permitindo a livre passagem de pequenas moléculas e íons entre o citoplasma da célula hospedeira e o vacúolo parasitóforo. Deste modo, um aumento da concentração de Ca²⁺ no citosol da célula infectada gerado pela adição de histamina seria, mais tarde, transmitido ao parasita causando assim um influxo de Ca²⁺ em seu citosol. Entretanto, este aumento de Ca²⁺ no citosol da célula hospedeira não é invariavelmente transmitido ao parasita. Acreditamos que tal fato é devido à amplitude da resposta de Ca²⁺ da célula infectada, de modo que maiores elevações deste íon geradas por histamina seriam transmitidas mais facilmente ao parasita.

Interessantemente não observamos a egresso de *T. gondii* nestes experimentos. Isso provavelmente se deve ao fato da elevação de Ca²⁺ gerada por histamina não ser suficiente para causar a saída dos parasitas.



Figura 22: Histamina 100 μ M não é capaz de estimular a egresso de *T. gondii* GCaMP₃ via aumento citosólico de Ca²⁺. (A) células em repouso antes da adição da droga, (B) adição de 100 μ M de histamina causa um aumento na fluorescência das células HeLa infectadas e não infectadas, mas não nos parasitas (C-D) a ausência de resposta nos parasitas permanece mesmo após maiores intervalos de tempo. Em (E) temos a quantificação das alterações da fluorescência durante o experimento. Os valores foram obtidos através do software ImageJ. Barra de escala = 10 μ M.

Experimentos publicados por Stommel et al. (1997) relatam a indução da saída de parasitas intracelulares pelo uso do agente redutor DTT (ditiotreitol) Uma interessante explicação baseada na ativação de uma ecto-ATPAse do parasita e subsequente degradação do ATP foi postulada, na qual a ausência deste nucleotídeo impediria o funcionamento da SERCA responsável pelo bombeamento de íons Ca²⁺ para o lúmen do retículo endoplasmático. Como resultado um influxo de Ca²⁺ ocorre, ativando assim a egresso (STOMMEL et al., 1997).

Utilizando nosso sistema composto de marcação dupla para Ca²⁺, R-GECO nas células HeLa e GCaMP₃ nos parasitas, nós fomos capazes de repetir este experimento por microscopia de fluorescência, acompanhando cada passo desta egresso. O mesmo não foi possível nos trabalhos publicados por Stommel et al. (1997), visto que não possuíam células fluorescentes e a visualização da saída dos parasitas foi feita utilizando lâminas fixadas e microscópio de luz.

A adição de 5 mM de DTT ao meio foi capaz de induzir a liberação dos taquizoítos da célula infectada. Interessantemente, o aumento da fluorescência ocorreu primeiro no parasita e, momentos antes da egresso, no citoplasma da célula hospedeira. Este fato esta em concordância com a ativação da ecto-NTPase do parasita, que ao degradar o ATP presente nas células inativa a Ca²⁺-ATPase presente no retículo endoplasmático causando assim influxo de Ca²⁺ para o citoplasma. Do mesmo modo observamos que a resposta é parasita-específica visto que o aumento da fluorescência ocorre primeiro em *T. gondii* e depois na célula HeLa. Fato que sustenta esta ideia é a observação que células não infectadas não respondem a DTT (Figura 23). Nas células não infectadas não há a presença da ecto-NTPDase ativada por DTT. Como consequência os níveis de ATP permanecem normais e permitem o pleno funcionamento da SERCA.

A permeabilização da membrana da célula hospedeira foi também relatada como um método para estimular a egresso de *T. gondii* (BLACK et al., 2000; MOUDY et al., 2001). Estes experimentos baseiam-se no uso de compostos (α-toxina ou saponina), que permitem a permeabilização seletiva da célula infectada sem, contudo, afetar os parasitas.



Figura 23: DTT 5 mM é capaz de ativar a saída de *T. gondii* GCaMP₃ por mecanismo envolvendo aumento de Ca²⁺ citosólico. (A) células em repouso antes da adição da droga, (B) adição de 5 mM de DTT é capaz de causar aumento na fluorescência dos parasitas intracelulares, (C) como consequência da presença do parasita a célula HeLa infectada também apresenta aumento na fluorescência, (D) os parasitas egressam da célula hospdeira, entretanto nenhuma resposta pode ser vista nas célula não infectada adjacente. Em (E) temos a quantificação das alterações da fluorescência durante o experimento. Os valores foram obtidos através do software ImageJ. Barra de escala = 10 µM.

A adição de saponina 0,01% ao meio resultou em oscilações de Ca²⁺ na célula hospedeira (Figura 24). Aumentos na fluorescência seguidos de bruscas diminuições foram observados. Após sucessivas oscilações nas células HeLa, os parasitas começaram a oscilar e passado algum tempo romperam a célula hospedeira egressando para o meio extracelular. Como uma possível explicação, os autores dos trabalhos anteriormente publicados sugerem que este tratamento é capaz de expor o parasita a uma composição iônica diferente daquela apresentada no citosol da célula hospedeira. Os poros formados na membrana permitiriam o equilíbrio da concentração de diferentes íons, como Ca²⁺, Na⁺ e K⁺. Este equilíbrio funcionaria como gatilho para estimular a saída dos parasitas. Trabalhos publicados por Moudy et al. (2001) argumentam que K⁺ seria o íon responsável por iniciar este processo. A diminuição da concentração deste íon no citoplasma da célula

hospedeira, que antes da permeabilização possuía cerca de 140 mM de K⁺ e que após o tratamento passar a ter 5 mM, é responsável por ativar mecanismos no parasita, gerando como efeito *downstream* a elevação de Ca²⁺ citosólico, ativando assim seu egresso. Nossos resultados, entretanto, não corroboram com esta hipótese.

A utilização de microscopia de fluorescência nos permitiu observar com detalhes o que ocorre nas células durante o tratamento com saponina, gerando assim uma maior riqueza de detalhes do que aquela anteriormente obtida por Moudy et al. (2001), em que as células foram fixadas em metanol 100% e então utilizadas para quantificar o egresso.

Após pesquisa na literatura encontramos trabalhos que demonstram a presença do mesmo padrão oscilatório em miócitos de ratos expostos a saponina (CHOI et al., 2001; LUKYANENKO; GYORKE, 1999). Todavia, oscilações de Ca²⁺ na célula apenas ocorrem com a integridade da membrana plasmática, não colaborando assim com a hipótese de permeabilização causado por saponina (DUPONT et al., 2011; UHLEN; FRITZ, 2010). Acreditamos que, inicialmente, saponina esteja ativando a liberação de IP₃, via ativação de PLC. O IP₃ assim gerado causaria liberação de Ca²⁺ de estogues sensíveis a IP₃ resultando no aumento de fluorescência no citosol das células. O Ca²⁺ liberado seria bombeado para o interior do retículo endoplasmático pela ação da SERCA, resultando na diminuição da fluorescência. Este fenômeno resultaria no padrão oscilatório observado em nossos experimentos. Após um maior tempo de exposição ocorreria, então, a permeabilização da membrana. Como consequência célula hospedeira e parasita são expostos à concentração de íons do meio extracelular. Esta mudança de composição do meio ativaria a saída dos parasitas via um mecanismo dependente de Ca²⁺.



Figura 24: Permeabilização seletiva com saponina 0,01% é capaz de ativar a saída de *T. gondii* GCaMP₃ por mecanismo envolvendo aumento de Ca²⁺ citosólico. (A) células em repouso antes da adição da droga, (B-D) adição de saponina na concentração final de 0,01% causou oscilações na fluorescência da célula HeLa, (E-G) após certo tempo os parasitas também começam a apresentar oscilações na fluorescência , (H-I) como consequência do aumento na concentração intracelular de Ca²⁺ os parasitas egressam da célula. Em (J) temos a quantificação das alterações da fluorescência durante o experimento. Os valores foram obtidos através do software ImageJ. Barra de escala = 10 μ M.

Zaprinast é um conhecido inibidor da fosfodiesterase específica para cGMP. Sua ação é capaz de aumentar a concentração de cGMP e, consequentemente, ativar PKG (BILLKER et al., 2004; MCROBERT et al., 2008). O uso de zaprinast para estimular o egresso de parasitas já foi relatado na literatura. Exposição de parasitas intracelulares a 500 µM deste composto foi capaz de ativar a saída de *T. gondii* da célula hospedeira por um mecanismo dependente da ativação de PKG (LOURIDO et al., 2012).

Para verificar se a sinalização por Ca^{2+} esta envolvida no processo de egresso estimulado por zaprinast, nós utilizamos este composto na presença de *T. gondii* e células HeLa transfectados com os indicadores de Ca^{2+} GCaMP3 e R-GECO, respectivamente. Discos contendo células HeLa infectadas com *T. gondii* foram expostos a 100 µM de zaprinast conforme descrito anteriormente. Como pode ser observado, um aumento na concentração citosólica de Ca^{2+} no parasita precede

o rompimento da célula hospedeira (Figura 25). Interessantemente o aumento deste íon no citoplasma da célula infectada ocorre apenas momentos antes da egresso, indicando ser resultado da permeabilização da célula HeLa pelos parasitas e consequente entrada de Ca²⁺ do meio extracelular.



Figura 25: Zaprinast 100 μ M é capaz de ativar a saída de *T. gondii* GCaMP3 por mecanismo envolvendo aumento de Ca²⁺ citosólico. (A) células em repouso antes da adição da droga, (B) adição de zaprinast na concentração final de 100 μ M é capaz de causar aumento na fluorescência dos parasitas intracelulares, (C) como consequência os parasitas começam a deixar a célula infectada, (D) após um maior intervalo de tempo todos os parasitas migram para o meio extracelular. Barra de escala = 10 μ m.

Os mecanismos que governam a ativação de PKG por zaprinast e sua participação no egresso de *T. gondii* ainda necessitam ser precisamente elucidados. Trabalhos prévios sugerem uma interação entre PKG e CDPK3, atuando sinergisticamente no rompimento do vacúolo parasitóforo e liberação dos parasitas (LOURIDO et al., 2012). Todavia, nossos resultados deixam claro que Ca²⁺ participa ativamente neste processo.

Dados prévios afirmam que K⁺ seria o íon responsável por estimular o egresso de *T. gondii*. A diminuição da concentração deste íon no citoplasma da célula hospedeira, que antes da permeabilização possuía cerca de 140 mM de K⁺ e que após o tratamento passaria a ter 5 mM, causa como efeito *downstream* a

elevação de Ca²⁺ citosólico, resultando na saída dos parasitas da célula infectada (MOUDY et al., 2001). Para verificar esta hipótese realizamos experimentos em que utilizamos tampões com diferentes composições iônicas para investigar separadamente o papel que cada íon exerce neste processo. Deste modo utilizamos um tampão padrão composto de 135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 5 mM de glicose, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgSO₄, composição esta similar aquela encontrada no meio extracelular. Partindo deste tampão realizamos sucessivas substituições para, ao final, gerar tampões em que os íons Na⁺, K⁺, Cl⁻ e Ca²⁺ estavam ausentes. Ainda como controle formulamos um tampão com concentração iônica similar aquela encontrada em meio intracelular (5 mM de NaCl, 135 mM de KCl, 620 µM de CaCl₂, 1 mM de MgSO₄, 5 mM de glicose) buscando assim compreender melhor o papel desempenhado por Ca²⁺ e K⁺ como gatilho deste processo.

A ausência de Na⁺, K⁺, Cl⁻ ou Ca²⁺ não foi capaz de bloquear a saída da célula hospedeira por *T. gondii*, sugerindo que este processo ocorre mesmo na ausência destes íons no meio (Figura 26 A-D).



Figura 26: Tampões com diferentes composições iônicas não afetam o egresso de *T. gondii.* Células HeLa infectadas foram permeabilizadas com α-toxina para estimular a saída dos parasitas na presença de diferentes tampões. (A) tampão padrão, (B) tampão Ca²⁺ free, (C) tampão Na⁺ free, (D) tampão K⁺ free, (E) tampão Cl⁻ free, (F) tampão padrão intracelular. Barra de escala=10µm.

Para verificar a participação de K⁺ como gatilho deste processo utilizamos um tampão em que a concentração deste íon é similar aquela encontrada no meio intracelular (aproximadamente 135 mM). Segundo dados publicados por Moudy et al. (2001), uma alta concentração de K⁺ no meio extracelular impede que a concentração de K⁺ no interior da célula hospedeira diminua após sua permeabilização, evitando assim a saída dos parasitas. Entretanto, nossos resultados demonstram que mesmo em presença de alta concentração extracelular de K⁺, *T. gondii* ainda foi capaz de egressar da célula hospedeira por um mecanismo envolvendo aumento de Ca²⁺ citosólico (Figura 26 F).

Estes resultados nos deram indícios que a saída dos parasitas da célula hospedeira pode ser independente de variações na concentração de K⁺ no meio. Para verificar esta hipótese experimentos similares foram realizados no laboratório da Dra. Silvia Moreno em que procedemos à quantificação do egresso de *T. gondii* em meio extracelular (baixa concentração de K⁺) e meio intracelular (alta concentração de K⁺). Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre as condições testadas. Ainda neste sentido demonstramos que *T. gondii* é capaz de egressar da célula infectada mesmo na ausência de Ca²⁺ extracelular. Entretanto, cabe ressaltar que Ca²⁺ extracelular age como um fator reforçador neste processo, visto que, quando estava ausente do meio *T. gondii* apresentou oscilações de Ca²⁺ menores ou ausentes, atraso no egresso e menor invasão das células vizinhas (BORGES-PEREIRA et al., 2015).

5 DISCUSSÃO

5.1 Clonagem da apirase de *Plasmodium falciparum*

A presença e atuação das apirases têm sido relacionadas a diversos fatores ligados a virulência em protozoários parasitas. Como primeiro passo para melhor entender o papel da apirase de *P. falciparum* decidimos clonar esta enzima.

Por meio de *primers* específicos fomos capazes de amplificar, isolar e clonar o gene da apirase utilizando técnicas de biologia molecular já descritas. Decidimos clonar apenas a região codificante da porção solúvel da proteína visto que (i) após diversas tentativas não fomos capazes de amplificar todo o gene da apirase, (ii) a clonagem da enzima sem as regiões hidrofóbicas N e C terminal facilitará a expressão em sistema heterólogo. Essa estratégia evitará que a proteína recombinante acumule-se em corpos de inclusão, dificultando assim sua purificação.

O completo sequenciamento do genoma de *Plasmodium falciparum* revelou que cerca de 80% dos genes são compostos por nucleotídeos de adenina e timina e esta característica reflete-se no gene da apirase.

Análises de bioinformática revelaram que, devido a diferenças no *codon usage* entre *P. falciparum* e *E. coli*, a produção da proteína recombinante não será eficiente. Devido a este fato decidimos por códon-otimizar o gene da apirase. Esta estratégia visa a modificar a sequência de nucleotídeos sem, contudo, alterar a proteína resultante.

A códon-otimização e síntese do gene da apirase foram realizadas pela empresa GenScript (NJ, EUA). Estudos estruturais e bioquímicos estão em andamento em em parceria com colaboradores. A expressão desta proteína em sistema heterólogo fornecerá valiosas informações sobre a função da apirase na fisiologia de *P. falciparum.*

5.2 Avaliação da atividade ecto-ATPásica de *P. falciparum* em cultura

A presença e atuação das apirases em protozoários têm sido extensivamente relatadas. Acredita-se que essas enzimas atuem na interação do parasita com a célula infectada, resultando na evasão do parasita dos mecanismos de defesa do hospedeiro e na captação de moléculas essências a sua sobrevivência (SANSOM et al., 2008a).

Para o parasita da malária humana *Plasmodium falciparum* ainda não há na literatura dados disponíveis sobre esta proteína. Com o intuito de verificar a presença e atuação desta família de enzimas procedemos a um ensaio bioquímico para verificar a capacidade ATPásica nas diversas fases do ciclo intraeritrocítico.

Nossos dados revelaram que a degradação de ATP ocorre nas fases anel e trofozoíto. Entretanto, nesta última a capacidade ATPásica foi maior. Interessantemente não fomos capazes de detectar hidrólise de ATP no estágio esquizonte.

Parasitas Apicomplexas como *Plasmodium falciparum* não sintetizam purinas *de novo* e como alternativa capturam estas moléculas da célula infectada. Sabe-se que ao infectar a hemácia *P. falciparum* passa por diferentes estágios para, ao final, gerar mais parasitas capazes de infectar novas células. Paralelo ao desenvolvimento do parasita ocorre o aumento na demanda por moléculas precursoras de nucleotídeos. Ao ser degradado ATP forneceria a matéria prima para a síntese de purinas no parasita por meio da chamada via de salvação. Tal hipótese, entretanto, não explica a ausência de atividade da apirase no estágio esquizonte, no qual ocorre a esquizogonia em que a síntese de material genético é intensa.

Dados de microarranjo e *quantitative real time PCR* (qPCR) revelaram que a apirase é transcrita no estágio esquizonte. Uma possível explicação para a ausência de atividade da enzima neste estágio remonta a inativação ou inibição da proteína. A intensa degradação de ATP ocorrida no estágio trofozoíto poderia suprir a demanda de purinas pelo parasita durante a esquizogonia fazendo com que não haja necessidade da ação da apirase durante esse processo. Cabe ressaltar que tal explicação é apenas uma hipótese, necessitando assim de experimentos adicionais que comprovem sua veracidade.

5.3 Adição de inibidores de apirases durante o ciclo intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7)

Para estudar o papel da apirase no correto desenvolvimento do parasita procedemos à incubação de *P. falciparum* com conhecidos inibidores de apirase. Para isso uma cultura sincrônica no estágio anel foi incubada por 48 horas na presença de suramina, GdCl₃ ou ARL67156 em diferentes concentrações.

O efeito sobre a parasitemia foi analisado após 6, 20, 34 ou 48 horas de incubação na presença das drogas, usando para isso citometria de fluxo.

Nossos resultados demonstram que de todas as drogas testadas suramina foi a que apresentou maior efeito sobre o desenvolvimento dos parasitas. Em ambas as concentrações testadas (100 e 500 µM) e em todos os intervalos de tempos analisados suramina foi capaz de interferir no ciclo do parasita. Todavia, cabe ressaltar a inespecificidade deste inibidor, sendo capaz de agir no processamento de MSP1, inibir receptores purinérgicos e apirases (FLECK et al., 2003; LEVANO-GARCIA et al., 2010). Consequentemente, acreditamos que o efeito observado não pode ser atribuído apenas a inibição da apirase.

Gadolínio foi capaz afetar o desenvolvimento de *P. falciparum* apenas na maior concentração testada (500 μ M) após 20, 34 e 48 horas de incubação. Seu efeito sobre apirases já foi relatado, entretanto gadolínio também é capaz de inibir canais de Ca²⁺ afetando assim a homeostasia deste íon no parasita (BOURNE; TRIFARO, 1982; ESCALADA et al., 2004; SANTOS et al., 2009). Como ocorrido com suramina, acreditamos que a ação desta droga não se deve apenas a inibição da apirase podendo igualmente afetar a via de sinalização por Ca²⁺.

ARL67156, um análogo de nucleotídeo capaz de inibir apirases, teve ação sobre o ciclo intraeritrocítico após 20 e 34 horas de incubação na presença de 500 µM do inibidor. Após 48 horas, ambas as concentrações testadas foram capazes de afetar a invasão de novas hemácias pelos merozoitos.

Os resultados acima descritos sugerem uma participação da apirase de *Plasmodium falciparum* no correto desenvolvimento do parasita dentro da hemácia. Cabe ressaltar, entretanto, que devido à inespecificidade de alguns dos inibidores e a não caracterização enzimática da proteína inferências sobre a inibição da apirase tornam-se arriscadas. Experimentos adicionais com a enzima recombinante irão comprovar se de fato os inibidores testados possuem ação contra essa enzima, dando suporte aos resultados acima descritos.

5.4 Análise da expressão da apirase de *Plasmodium falciparum* durante as diferentes fases do ciclo intra-eritrocítico

Dados disponíveis no banco de dados PlasmoDB revelam o perfil de expressão da apirase em todo o ciclo intraeritrocítico. Como dito anteriormente estes dados foram obtidos por *microarray* em que centenas de genes são analisados simultaneamente.

Lançando mão de uma técnica mais específica (*quantitative real time PCR*) procedemos à quantificação da expressão da apirase. Nossos dados revelaram um distinto padrão de distribuição da enzima entre os estágios da fase assexuada do parasita. Como pode ser observado, ocorre um grande aumento na expressão da enzima com a passagem do estágio anel para trofozoíto. Entretanto, com o contínuo desenvolvimento do parasita notamos um decaimento entre as fases trofozoíto e esquizonte. Este perfil de expressão é similar com o que foi previamente descrito por *microarray*. Notamos apenas que em nossos experimentos há uma acentuada diferença entre os estágios anel e esquizonte. Tal fato não ocorre com os dados prévios de *microarray*.

É tentador relacionar a maior expressão da apirase no estágio trofozoíto com mecanismos de obtenção de purinas, visto que *P. falciparum* é incapaz de sintetizar purinas *de novo*. Este dado esta em conformidade com o que foi observado nos experimentos de medição da atividade ATPásica da enzima, em que observamos uma maior degradação desta molécula neste estágio.

5.5 Construção e análise da resposta de Ca²⁺ de parasitas PfGCaMP3

A via de sinalização por Ca²⁺ é vital para *Plasmodium falciparum (BUDU; GARCIA, 2012)*. Usualmente medições na variação deste íon no interior do parasita são realizadas utilizando moléculas orgânicas através de um protocolo invasivo de marcação. Além disto, outro impasse apresentado por esse método é a

impossibilidade da marcação individualizada do parasita no interior da célula, visto que tais moléculas marcam tanto o protozoário quanto a célula infectada.

Para superar essas limitações decidimos criar parasitas transgênicos capazes de expressar um indicador de Ca²⁺ geneticamente codificado (*GECI- Genetically Encoded Calcium Indicator*). Lançamos mão do indicador GCaMP3 para este fim devido ao êxito de sua utilização em outras células (MCKINNEY; KULESA, 2011; TIAN et al., 2009).

O gene do indicador GCaMP3 foi transferido do vetor original para expressão em células de mamíferos para o vetor pDC, específico para transfecção de *P. falciparum*. O sucesso da transfecção pôde ser observado através de microscópio de fluorescência em que visualizamos parasitas fluorescentes expressando o indicador GCaMP3.

A resposta de Ca²⁺ dos parasitas PfGCaMP3 foi analisada por meio de citometria de fluxo e microscopia utilizando para isso a população que apresentou a maior percentagem de parasitas fluorescentes. Para os testes utilizamos ionomicina e tapsigargina, visto o conhecido efeito destas moléculas em causar aumento na concentração citosólica de Ca²⁺ em *P. falciparum*.

PfGCaMP3 foi capaz de responder a variações na concentração intracelular de Ca²⁺ com um expressivo aumento de sua fluorescência. Tal fato comprova a correta construção desta nova classe de parasitas transgênicos capazes de sinalizar a variações na concentração deste íon sem o uso de moléculas orgânicas. Adicionalmente, PfGCaMP3 poderá ser utilizado no *screening* de novas drogas. Como dito anteriormente a via de sinalização por Ca²⁺ é importante para este parasita e moléculas que interfiram nesta via possuem um grande potencial antimalárico.

5.6 Papel do íon Ca²⁺ na invasão e saída da célula hospedeira por *Toxoplasma* gondii

O sucesso da infecção por *Toxoplasma gondii* depende da capacidade do parasita em invadir e egressar da célula hospedeira. Estes eventos, fundamentais para seu ciclo lítico, são altamente coordenados e dependentes de sinalização por Ca²⁺ (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004).

A invasão da célula por *T. gondii* já foi alvo de diversos trabalhos. Utilizandose EGTA e BAPTA-AM para quelar o Ca²⁺ presente no meio e no citoplasma da célula, respectivamente, Lovett et al. (2003) demonstraram que o parasita possui em seus estoques intracelulares Ca²⁺ suficiente para a invasão e que a ausência de Ca²⁺ extracelular não era capaz de bloquear este processo.

Utilizando *T. gondii* expressando o indicador de Ca²⁺ GCaMP3 fomos capazes de analisar a invasão da célula hospedeira com uma riqueza de detalhes nunca antes relatada. Um claro aumento na fluorescência momentos antes da invasão é indicativo de que Ca²⁺ é fundamental para este processo. Em concordância com esta observação está o fato de que parasitas que não invadiram não apresentaram aumento de sua fluorescência.

Os dados acima foram somados a experimentos adicionais realizados em parceria com o laboratório da Dra. Silvia Moreno. Observou-se que apesar do parasita possuir o Ca²⁺ suficiente para promover a invasão da célula, Ca²⁺ extracelular age como um fator intensificador deste processo. A quantificação dos resultados revelou que em presença de Ca²⁺ extracelular um maior número de parasitas é capaz de invadir as células. Ainda neste sentido, a presença deste íon no meio extracelular aumentou a quantidade de *T. gondii* que apresentaram um pico de Ca²⁺ momentos antes da invasão. Interessantemente, ao comparar a média das intensidades dos picos de fluorescência apresentados pelos parasitas, observou-se que estes eram maiores quando Ca²⁺ estava presente no meio externo. Em conjunto estes resultados demonstram que há uma correlação entre invasão e Ca²⁺ extracelular, indicando que o influxo de Ca²⁺ reforça este processo (BORGES-PEREIRA et al., 2015)

A origem do Ca²⁺ para a saída da célula hospedeira também já foi alvo de diversos estudos. Entretanto, não há consenso na literatura sobre o papel do Ca²⁺ extracelular neste processo.

T. gondii se desenvolve no interior de um vacúolo parasitóforo rodeado por mitocôndrias da célula hospedeira (PERNAS et al., 2014). As consequências desta associação ainda são desconhecidas, mas é tentador relacionar a presença destas mitocôndrias com mecanismos de estocagem e liberação de Ca²⁺ para o parasita.

A utilização de células HeLa transfectadas com o indicador R-GECO e infectadas com *T. gondii* transgênicos expressando o indicador GCaMP3 nos

permitiu monitorar simultaneamente a dinâmica de Ca²⁺ que ocorre na célula infectada e parasita durante o egresso. Utilizando ionomicina para promover este processo fomos capazes de observar a saída do parasita da célula por um mecanismo dependente de Ca²⁺. Ionomicina causa a elevação de Ca²⁺ em ambos, parasita e célula hospedeira, e este evento ocorre na presença ou ausência de Ca²⁺ extracelular.

Experimentos visando à quantificação deste resultado foram realizados no laboratório da Dra. Silvia Moreno e revelaram que em presença de Ca²⁺ extracelular os parasitas saíram mais rapidamente da célula e esta diferença foi estatisticamente significante. As imagens obtidas em nossos experimentos e os dados de quantificação foram reunidos em Borges-Pereira et al. (2015).

Agentes fisiológicos (histamina) e farmacológicos (tapsigargina) foram capazes de estimular um aumento de Ca²⁺ nas células infectadas e apenas fracamente em *T. gondii*. Entretanto, este aumento não foi capaz de causar o egresso dos parasitas, sugerindo a presença de um limiar na concentração de Ca²⁺ necessário para iniciar este processo.

Adição de DTT e Zaprinast resultou em um aumento na concentração de Ca²⁺ no parasita e, consequentemente, a saída da célula infectada. Interessantemente ocorre o aumento de Ca²⁺ citosólico primeiro no parasita e, momentos antes do egresso, na célula hospedeira. Este dado sugere que o aumento na concentração de Ca²⁺ na célula hospedeira é um evento secundário a saída de *T. gondii*.

DTT age através da ativação de uma ecto-nucleotidase do parasita capaz de depletar os estoques de ATP da célula hospedeira (STOMMEL et al., 1997). Zaprinast é um inibidor de fosfodiesterase específica para cGMP (MCROBERT et al., 2008). Sua atividade é capaz de aumentar a concentração deste nucleotídeo no meio resultando assim na ativação de PKG. Todavia, o papel de PKG na saída do parasita é ainda desconhecido.

A exposição de células HeLa infectadas a saponina 0,01% foi capaz de ativar a saída de *T. gondii.* Interessantemente este processo foi precedido de oscilações de Ca²⁺ na célula hospedeira e parasitas, fenômeno este incompatível com a permeabilização da membrana celular. Acreditamos que inicialmente saponina estaria ativando a liberação de IP3, via ativação de PLC. Esta cascada de eventos resultaria na liberação de Ca²⁺ de estoques intracelulares. Após um maior intervalo de tempo, a exposição à saponina causaria a permeabilização da membrana da célula infectada, ativando assim o egresso de *T. gondii.* Na ausência de Ca²⁺ extracelular os parasitas ainda foram capazes de lisar e sair da célula, entretanto observou-se que as oscilações de Ca²⁺ foram atenuadas ou ausentes em alguns experimentos. A quantificação dos resultados revelou que quando Ca²⁺ extracelular está ausente o número de parasitas que não deixaram a célula hospedeira foi maior. Ainda neste sentido, observou-se que nestas condições os parasitas apresentam menores oscilações e picos de Ca²⁺ (BORGES-PEREIRA et al., 2015).

Acredita-se que mudanças drásticas na concentração de K⁺ no citosol da célula hospedeira ajam como gatilho para promover a saída dos parasitas da célula infectada (MOUDY et al., 2001). Para testar esta hipótese usamos nosso sistema composto de dupla marcação para Ca²⁺, na célula hospedeira e no parasita, em presença de tampões com diferentes composições iônicas.

Nossos resultados mostraram que a ausência dos íons Na⁺, K⁺, Cl⁻ ou Ca²⁺ do meio extracelular não foi capaz de bloquear o egresso de *T. gondii.* A utilização de um tampão com composição similar aquela encontrada no meio intracelular (140 mM K⁺) também não foi capaz de bloquear este processo. Estes experimentos sugeriram que esta etapa fundamental do ciclo lítico de *T. gondii* possa ser iniciada por um fator independente de mudanças na concentração de K⁺ no citoplasma da célula hospedeira. Para verificar esta hipótese experimentos similares foram realizados visando à quantificação destes dados. A análise de um número maior de células revelou que os parasitas foram capazes de sair da célula hospedeira tanto na presença de tampão extracelular padrão (3 mM K⁺) quanto em tampão com composição iônica similar ao meio intracelular (140 mM K⁺). Todavia, a ausência de Ca²⁺ em ambos os tampões foi capaz de prejudicar este processo (BORGES-PEREIRA et al., 2015).

Os resultados aqui apresentados nos permitem a formulação de um modelo para explicar o rompimento e saída da célula hospedeira por *T. gondii*. Os estoques intracelulares de Ca²⁺ são fundamentais, mas acreditamos que eles não sejam os únicos responsáveis em promover este processo. Um sinal ainda desconhecido promove a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares. O Ca²⁺ liberado, por sua vez, causa a secreção de proteínas do micronema, como PLP (*Perforin-Like Protein*). Em nosso modelo a ação de PLP causaria a lise da célula hospedeira e

influxo de Ca²⁺ do meio extracelular, ativando os mecanismos de motilidade e egresso do parasita.

6 CONCLUSÕES

A clonagem da porção solúvel apirase do parasita *P. falciparum* ocorreu com êxito. Entretanto, não conseguimos clonar toda a ORF codificante para este gene.

Para otimizar a expressão heteróloga em *E. coli* optamos por códon-otimizar o gene da apirase de *P. falciparum.*

Há na membrana do parasita enzimas da família das E-NTPDases (apirases) capazes de degradar ATP extracelular. A hidrólise do nucleotídeo foi observada nos estágios anel e trofozoíto, sendo maior neste último. Interessantemente, não fomos capazes de detectar a degradação de ATP no estágio esquizonte. Este fato foi particularmente intrigante devido ao fato de haver intensa síntese de DNA neste estágio.

O uso de inibidores de apirases foi capaz de prejudicar o desenvolvimento e invasão de novas hemácias por *P. falciparum*. Este resultado sugere um possível papel desta família de enzimas nestes processos. Nossa hipótese baseia-se na ação das apirases no fornecimento de moléculas precursoras de purinas, como também na modulação da sinalização purinérgica essencial na invasão de novos eritrócitos.

Análises por RT-qPCR indicam que a apirase é expressa durante todo o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*. A maior expressão desta proteína ocorre no estágio trofozoíto, estágio este marcado por intensa atividade metabólica do parasita. Deste modo, ao degradar nucleotídeos extracelulares, acreditamos que as apirases trabalhem no sentido de fornecer moléculas essências para o correto desenvolvimento do parasita.

A transfecção de *P. falciparum* com o indicador de Ca²⁺ GCaMP3 possibilitou a construção de uma linhagem estável de parasitas transgênicos (PfGCaMP3) que permitem o monitoramento da dinâmica de Ca²⁺ sem o uso de protocolos de marcação com moléculas orgânicas. A sinalização por Ca²⁺ é vital para o parasita, deste modo PfGCaMP3 poderá ser usado no *screening* de moléculas com atividade antimalárica capazes de interferir nesta via essencial.

Ca²⁺ é um importante segundo mensageiro no ciclo lítico de *T. gondii.* Aumentos na concentração intracelular deste íon no parasita precedem os eventos de invasão e egresso da célula hospedeira. *T. gondii* possui o Ca²⁺ necessário para promover estes eventos, entretanto Ca²⁺ extracelular age como um fator intensificador destes processos.

A ausência de Na⁺, K⁺, Cl⁻ ou Ca²⁺ do meio extracelular não foi capaz de bloquear a saída da célula hospedeira por *T. gondii.* Este dado sugere que este processo ocorre mesmo na ausência destes íons do meio.

Variações na concentração extracelular de K⁺ não foram capazes de afetar o egresso de *T. gondii*, sugerindo que o gatilho deste processo seja independente deste íon.

.

REFERÊNCIAS^{*}

ALVES, E. et al. Melatonin and IP3-induced Ca2+ release from intracellular stores in the malaria parasite Plasmodium falciparum within infected red blood cells. <u>J. Biol.</u> <u>Chem.</u>, v. 286, n. 7, p. 5905-5912, 2011.

ANAMIKA et al. A genomic perspective of protein kinases in Plasmodium falciparum. <u>Proteins</u>, v. 58, n. 1, p. 180-189, 2005.

ARRIZABALAGA, G.; BOOTHROYD, J. C. Role of calcium during Toxoplasma gondii invasion and egress. Int. J. Parasitol., v. 34, n. 3, p. 361-368, 2004.

ASAI, T. et al. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan Toxoplasma gondii. <u>J. Biol. Chem.</u>, v. 270, n. 19, p. 11391-11397, 1995.

AURRECOECHEA, C. et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. <u>Nucleic Acids Res.</u>, v. 37, n. Database issue, p. D539-543, 2009.

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.

BANNISTER, L. H. et al. A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. <u>Parasitol. Today</u>, v. 16, n. 10, p. 427-433, 2000.

BERALDO, F. H. et al. 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. <u>J. Pineal.</u> <u>Res.</u>, v. 43, n. 4, p. 360-364, 2007.

BERREDO-PINHO, M. et al. A Mg-dependent ecto-ATPase in Leishmania amazonensis and its possible role in adenosine acquisition and virulence. <u>Arch Biochem. Biophys.</u>, v. 391, n. 1, p. 16-24, 2001.

BIAGINI, G. A. et al. The digestive food vacuole of the malaria parasite is a dynamic intracellular Ca2+ store. <u>J. Biol. Chem.</u>, v. 278, n. 30, p. 27910-27915, 2003.

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

BISAGGIO, D. F. et al. Ecto-ATPase activity on the surface of Trypanosoma cruzi and its possible role in the parasite-host cell interaction. <u>Parasitol. Res.</u>, v. 91, n. 4, p. 273-282, 2003.

^{*} De acordo com:

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

BLACK, M. W. et al. lonophore-resistant mutants of Toxoplasma gondii reveal host cell permeabilization as an early event in egress. <u>Mol. Cell Biol.</u>, v. 20, n. 24, p. 9399-9408, 2000.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of Toxoplasma gondii. <u>Microbiol Mol.</u> <u>Biol. Rev.</u>, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BORGES-PEREIRA, L. et al. Calcium Signaling Throughout the Toxoplasma gondii Lytic Cycle. A Study Using Genetically Encoded Calcium Indicators. <u>J. Biol. Chem.</u>, 2015.

BORGES-PEREIRA, L. et al. The GCaMP3 - A GFP-based calcium sensor for imaging calcium dynamics in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. <u>MethodsX</u>, v. 1, p. 151-154, 2014.

BORSELLINO, G. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. <u>Blood</u>, v. 110, n. 4, p. 1225-1232, 2007.

BOUCHOT, A. et al. Tachyzoite calcium changes during cell invasion by Toxoplasma gondii. <u>Parasitol. Res.</u>, v. 85, n. 10, p. 809-818, 1999.

BOURNE, G. W.; TRIFARO, J. M. The gadolinium ion: a potent blocker of calcium channels and catecholamine release from cultured chromaffin cells. <u>Neuroscience</u>, v. 7, n. 7, p. 1615-1622, 1982.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. <u>Pharmacol. Ther.</u>, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BUDU, A.; GARCIA, C. R. Generation of second messengers in Plasmodium. <u>Microbes Infect.</u>, v. 14, n. 10, p. 787-795, 2012.

CARRUTHERS, V. B. et al. Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca2+] and stimulate microneme discharge in Toxoplasma gondii. <u>Biochem. J.</u>, v. 342 (Pt 2), p. 379-386, 1999.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in Toxoplasma gondii. <u>Mol. Microbiol.</u>, v. 31, n. 2, p. 421-428, 1999.

CHOI, K. M. et al. Molecular cloning of Plasmodium vivax calcium-dependent protein kinase 4. Korean J. Parasitol., v. 48, n. 4, p. 319-324, 2010.

CHOI, S. et al. A novel activation of Ca(2+)-activated Cl(-) channel in Xenopus oocytes by Ginseng saponins: evidence for the involvement of phospholipase C and intracellular Ca(2+) mobilization. <u>Br. J. Pharmacol.</u>, v. 132, n. 3, p. 641-648, 2001.

CRACK, B. E. et al. Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. <u>Br. J. Pharmacol.</u>, v. 114, n. 2, p. 475-481, 1995.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA, E. et al. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. <u>Microbes Infect.</u>, v. 10, n. 8, p. 850-857, 2008.

DE KONING, H. P. et al. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: from biology to therapy. <u>FEMS Microbiol. Ver.</u>, v. 29, n. 5, p. 987-1020, 2005.

DE SOUZA, R. F. et al. Recombinant Leishmania (Leishmania) infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. <u>Acta Trop.</u>, v. 125, n. 1, p. 60-66, 2013.

DEMARCO, R. et al. Molecular characterization and immunolocalization of Schistosoma mansoni ATP-diphosphohydrolase. <u>Biochemical and Biophysical</u> <u>Research Communications</u>, v. 307, n. 4, p. 831-838, 2003.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. <u>Blood</u>, v. 97, n. 3, p. 587-600, 2001.

DOBROWOLSKI, J. M. et al. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by Toxoplasma gondii. <u>Mol. Microbiol.</u>, v. 26, n. 1, p. 163-173, 1997.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. <u>Nat Rev.</u> <u>Microbiol.</u>, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2005.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. <u>J. Protozool.</u>, v. 19, n. 1, p. 155-177, 1972.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of Toxoplasma cysts. <u>J. Protozool.</u>, v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.

DUPONT, G. et al. Calcium oscillations. <u>Cold Spring Harb. Perspect. Biol.</u>, v. 3, n. 3, 2011.

DVORIN, J. D. et al. A plant-like kinase in Plasmodium falciparum regulates parasite egress from erythrocytes. <u>Science</u>, v. 328, n. 5980, p. 910-912, 2010.

ECKSTEIN-LUDWIG, U. et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. <u>Nature</u>, v. 424, n. 6951, p. 957-961, 2003.

EKMAN, P.; JAGER, O. Quantification of subnanomolar amounts of phosphate bound to seryl and threonyl residues in phosphoproteins using alkaline hydrolysis and malachite green. <u>Anal. Biochem.</u>, v. 214, n. 1, p. 138-141, 1993.

ENDO, T. et al. Toxoplasma gondii: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. <u>Exp. Parasitol.</u>, v. 53, n. 2, p. 179-188, 1982.

ESCALADA, A. et al. Gadolinium inhibition of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity in Torpedo electric organ. <u>Neurochem. Res.</u>, v. 29, n. 9, p. 1711-1714, 2004.

FIETTO, J. L. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of Trypanosoma cruzi. <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u>, v. 316, n. 2, p. 454-460, 2004.

FLECK, S. L. et al. Suramin and suramin analogues inhibit merozoite surface protein-1 secondary processing and erythrocyte invasion by the malaria parasite Plasmodium falciparum. <u>J. Biol. Chem.</u>, v. 278, n. 48, p. 47670-47677, 2003.

FRECH, C.; CHEN, N. Genome comparison of human and non-human malaria parasites reveals species subset-specific genes potentially linked to human disease. <u>PLoS Comput. Biol.</u>, v. 7, n. 12, p. e1002320, 2011.

FREDHOLM, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. <u>Cell Death Differ.</u>, v. 14, n. 7, p. 1315-1323, 2007.

GACHET, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. <u>Annu. Rev.</u> <u>Pharmacol. Toxicol.</u>, v. 46, p. 277-300, 2006.

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

GARCIA, C. R. et al. Tertian and quartan fevers: temporal regulation in malarial infection. <u>J Biol. Rhythms</u>, v. 16, n. 5, p. 436-443, 2001.

GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. <u>Nature</u>, v. 419, n. 6906, p. 498-511, 2002.

GAZARINI, M. L.; GARCIA, C. R. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca2+ fluctuations. <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u>, v. 321, n. 1, p. 138-144, 2004.

GAZARINI, M. L. et al. Calcium signaling in a low calcium environment: how the intracellular malaria parasite solves the problem. <u>J. Cell Biol.</u>, v. 161, n. 1, p. 103-110, 2003.

GEARY, T. G. et al. Effect of calmodulin inhibitors on viability and mitochondrial potential of Plasmodium falciparum in culture. <u>Antimicrob. Agents Chemother.</u>, v. 30, n. 5, p. 785-788, 1986.

GHERARDI, A.; SARCIRON, M. E. Molecules targeting the purine salvage pathway in Apicomplexan parasites. <u>Trends Parasitol.</u>, v. 23, n. 8, p. 384-389, 2007.

GHOSH, A. et al. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. <u>Parasitol. Today</u>, v. 16, n. 5, p. 196-201, 2000.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. Purification and cloning of a soluble ATPdiphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (Solanum tuberosum). <u>Biochem.</u> <u>Biophys. Res. Commun.</u>, v. 218, n. 3, p. 916-923, 1996.

HOFF, E. F.; CARRUTHERS, V. B. Is Toxoplasma egress the first step in invasion? <u>Trends Parasitol.</u>, v. 18, n. 6, p. 251-255, 2002.

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

KAFSACK, B. F. et al. Synchronous invasion of host cells by Toxoplasma gondii. <u>Mol. Biochem. Parasitol.</u>, v. 136, n. 2, p. 309-311, 2004.

KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, Plasmodium knowlesi. <u>Clin. Infect. Dis.</u>, v. 52, n. 11, p. 1356-1362, 2011.

KATO, K. et al. Characterization of Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase 4. <u>Parasitol. Int.</u>, v. 58, n. 4, p. 394-400, 2009.

KIKUCHI, T. et al. Membrane localization and demonstration of isoforms of nucleoside triphosphate hydrolase from Toxoplasma gondii. <u>Parasitology</u>, v. 122 Pt 1, p. 15-23, 2001.

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

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

LANGSTON, H. P. et al. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigenspecific T cells requires extracellular ATP. <u>J. Immunol.</u>, v. 170, n. 6, p. 2962-2970, 2003.

LEVANO-GARCIA, J. et al. Purinergic signalling is involved in the malaria parasite Plasmodium falciparum invasion to red blood cells. <u>Purinergic Signal.</u>, v. 6, n. 4, p. 365-372, 2010.

LEVANO-GARCIA, J. et al. Characterization of Schistosoma mansoni ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. <u>Biochemical and Biophysical Research</u> <u>Communications</u>, v. 352, n. 2, p. 384-389, 2007.

LEVESQUE, S. A. et al. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. <u>Br. J. Pharmacol.</u>, v. 152, n. 1, p. 141-150, 2007.

LOURIDO, S. et al. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in Toxoplasma. <u>Nature</u>, v. 465, n. 7296, p. 359-362, 2010.

LOURIDO, S. et al. Distinct signalling pathways control Toxoplasma egress and hostcell invasion. <u>EMBO J.</u>, v. 31, n. 24, p. 4524-4534, 2012.

LOVETT, J. L. et al. Toxoplasma gondii microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. <u>J.</u> <u>Biol. Chem.</u>, v. 277, n. 29, p. 25870-25876, 2002.

LOVETT, J. L.; SIBLEY, L. D. Intracellular calcium stores in Toxoplasma gondii govern invasion of host cells. <u>J. Cell Sci.</u>, v. 116, n. Pt 14, p. 3009-3016, 2003.

LUKYANENKO, V.; GYORKE, S. Ca2+ sparks and Ca2+ waves in saponinpermeabilized rat ventricular myocytes. <u>J. Physiol.</u>, v. 521 Pt 3, p. 575-585, 1999.

LUO, S. et al. A plasma membrane-type Ca(2+)-ATPase co-localizes with a vacuolar H(+)-pyrophosphatase to acidocalcisomes of Toxoplasma gondii. <u>EMBO J.</u>, v. 20, n. 1-2, p. 55-64, 2001.

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

MANK, M.; GRIESBECK, O. Genetically encoded calcium indicators. <u>Chem. Rev.</u>, v. 108, n. 5, p. 1550-1564, 2008.

MARTI, E. et al. Action of suramin upon ecto-apyrase activity and synaptic depression of Torpedo electric organ. <u>Br. J. Pharmacol.</u>, v. 118, n. 5, p. 1232-1236, 1996.

MCCALLUM-DEIGHTON, N.; HOLDER, A. A. The role of calcium in the invasion of human erythrocytes by Plasmodium falciparum. <u>Mol. Biochem. Parasitol.</u>, v. 50, n. 2, p. 317-323, 1992.

MCKENZIE, F. E.; BOSSERT, W. H. Multispecies Plasmodium infections of humans. <u>J. Parasitol.</u>, v. 85, n. 1, p. 12-18, 1999.

MCKINNEY, M. C.; KULESA, P. M. In vivo calcium dynamics during neural crest cell migration and patterning using GCaMP3. <u>Dev. Biol.</u>, v. 358, n. 2, p. 309-317, 2011.

MCROBERT, L. et al. Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMPdependent protein kinase. <u>PLoS Biol.</u>, v. 6, n. 6, p. e139, 2008.

MONDRAGON, R.; FRIXIONE, E. Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in Toxoplasma gondii tachyzoites. J. Eukaryot. Microbiol., v. 43, n. 2, p. 120-127, 1996.

MORENO, S. N. et al. Calcium storage and function in apicomplexan parasites. <u>Essays Biochem.</u>, v. 51, p. 97-110, 2011.

MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. <u>Curr.</u> <u>Opin. Microbiol.</u>, v. 6, n. 4, p. 359-364, 2003.

MORENO, S. N. et al. Vacuolar-type H+-ATPase regulates cytoplasmic pH in Toxoplasma gondii tachyzoites. <u>Biochem. J.</u>, v. 330 (Pt 2), p. 853-860, 1998.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. <u>Microbes Infect.</u>, v. 3, n. 13, p. 1123-1128, 2001.

MOUDY, R. et al. The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of Toxoplasma gondii. <u>J. Biol. Chem.</u>, v. 276, n. 44, p. 41492-41501, 2001.

NAGAMUNE, K. et al. Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. <u>Eukaryot. Cell</u>, v. 6, n. 11, p. 2147-2156, 2007.

NAGAMUNE, K. et al. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. <u>Subcell. Biochem.</u>, v. 47, p. 70-81, 2008.

NAKAAR, V. et al. Basis for substrate specificity of the Toxoplasma gondii nucleoside triphosphate hydrolase. <u>Mol. Biochem. Parasitol.</u>, v. 97, n. 1-2, p. 209-220, 1998.

NKHOMA, S. et al. In vitro antimalarial susceptibility profile and prcrt/pfmdr-1 genotypes of Plasmodium falciparum field isolates from Malawi. <u>Am. J. Trop. Med.</u> <u>Hyg.</u>, v. 76, n. 6, p. 1107-1112, 2007.

PACE, D. A. et al. Calcium entry in Toxoplasma gondii and its enhancing effect of invasion-linked traits. <u>J. Biol. Chem.</u>, v. 289, n. 28, p. 19637-19647, 2014.

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. <u>Biochem. Biophys. Res. Commun.</u>, v. 245, n. 1, p. 155-160, 1998.

PAVETO, C. et al. The nitric oxide transduction pathway in Trypanosoma cruzi. <u>J.</u> <u>Biol. Chem.</u>, v. 270, n. 28, p. 16576-16579, 1995.

PERNAS, L. et al. Toxoplasma effector MAF1 mediates recruitment of host mitochondria and impacts the host response. <u>PLoS Biol.</u>, v. 12, n. 4, p. e1001845, 2014.

PEZZELLA-D'ALESSANDRO, N. et al. Calmodulin distribution and the actomyosin cytoskeleton in Toxoplasma gondii. <u>J. Histochem. Cytochem.</u>, v. 49, n. 4, p. 445-454, 2001.

PINHEIRO, C. M. et al. Leishmania amazonensis: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities. <u>Exp.</u> <u>Parasitol.</u>, v. 114, n. 1, p. 16-25, 2006.

PLATTNER, H. et al. Calcium signaling in closely related protozoan groups (Alveolata): non-parasitic ciliates (Paramecium, Tetrahymena) vs. parasitic Apicomplexa (Plasmodium, Toxoplasma). <u>Cell Calcium</u>, v. 51, n. 5, p. 351-382, 2012.

PRUDENCIO, M. et al. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. <u>Nat. Rev. Microbiol.</u>, v. 4, n. 11, p. 849-856, 2006.

ROBSON, S. C. et al. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. <u>Purinergic Signal.</u>, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.

RODRIGUES, C. O. et al. Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PPi) in Toxoplasma gondii as possible chemotherapeutic targets. <u>Biochem. J.</u>, v. 349 Pt 3, p. 737-745, 2000.

ROHLOFF, P. et al. Calcium uptake and proton transport by acidocalcisomes of Toxoplasma gondii. <u>PLoS One</u>, v. 6, n. 4, p. e18390, 2011.

RUIZ, F. A. et al. Polyphosphate content and fine structure of acidocalcisomes of Plasmodium falciparum. <u>Microsc. Microanal.</u>, v. 10, n. 5, p. 563-567, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. <u>Molecular cloning : a laboratory manual</u>. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

SANSOM, F. M. et al. Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions. <u>Microbiol. Mol. Biol. Rev.</u>, v. 72, n. 4, p. 765-781, Table of Contents, 2008a.

SANSOM, F. M. et al. Possible Effects of Microbial Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolases on Host-Pathogen Interactions. <u>Microbiology and Molecular</u> <u>Biology Reviews</u>, v. 72, n. 4, p. 765-+, 2008b.

SANTOS, R. F. et al. Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on Trypanosoma cruzi infectivity and virulence. <u>PLoS Negl. Trop. Dis.</u>, v. 3, n. 3, p. e387, 2009.

SCHNURR, M. et al. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. <u>J. Immunol.</u>, v. 165, n. 8, p. 4704-4709, 2000.

SCHUCK, D. C. et al. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in Plasmodium falciparum cell cycle following treatment with indol compounds. <u>Cytometry A.</u>, v. 79, n. 11, p. 959-964, 2011.

SEEBER, F. et al. Cloning and functional expression of the calmodulin gene from Toxoplasma gondii. <u>Mol. Biochem. Parasitol.</u>, v. 99, n. 2, p. 295-299, 1999.

SIBLEY, L. D. et al. Toxoplasma gondii: secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. <u>Exp. Parasitol.</u>, v. 79, n. 3, p. 301-311, 1994.

SILVERMAN, J. A. et al. Induced activation of the Toxoplasma gondii nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. <u>J. Biol. Chem.</u>, v. 273, n. 20, p. 12352-12359, 1998.

STOMMEL, E. W. et al. Toxoplasma gondii: dithiol-induced Ca2+ flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. <u>Exp. Parasitol.</u>, v. 87, n. 2, p. 88-97, 1997.

TIAN, L. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. <u>Nat. Methods</u>, v. 6, n. 12, p. 875-881, 2009.

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

UHLEN, P.; FRITZ, N. Biochemistry of calcium oscillations. <u>Biochem Biophys Res.</u> <u>Commun.</u>, v. 396, n. 1, p. 28-32, 2010.

UYEMURA, S. A. et al. Oxidative phosphorylation, Ca(2+) transport, and fatty acidinduced uncoupling in malaria parasites mitochondria. <u>J. Biol. Chem.</u>, v. 275, n. 13, p. 9709-9715, 2000.

VAID, A. et al. Role of Ca2+/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum. J. Biol. Chem., v. 283, n. 9, p. 5589-5597, 2008.

VAROTTI, F. P. et al. Plasmodium falciparum malaria parasites display a THGsensitive Ca2+ pool. <u>Cell Calcium</u>, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2003.

VASCONCELLOS RDE, S. et al. Leishmania infantum ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is an apyrase involved in macrophage infection and expressed in infected dogs. <u>PLoS Negl. Trop. Dis.</u>, v. 8, n. 11, p. e3309, 2014.

WHITAKER, M. Genetically encoded probes for measurement of intracellular calcium. <u>Methods Cell Biol.</u>, v. 99, p. 153-182, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World malaria report. Geneva, Switzerland: World Health Organization: volumes p.

ZHAO, Y. et al. An expanded palette of genetically encoded Ca(2)(+) indicators. <u>Science</u>, v. 333, n. 6051, p. 1888-1891, 2011.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. <u>Naunyn</u> <u>Schmiedebergs Arch. Pharmacol.</u>, v. 362, n. 4-5, p. 299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. et al. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. <u>Purinergic Signal.</u>, v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012. APÊNDICE - Produção literária durante o período do doutorado

10^{HAPTER}

Calcium Storage and Homeostasis in *Toxoplasma gondii*

OUTLINE

10.1	Introduction	352	10.4.2 Mitochondria	361
10.2	Fluorescent Methods to Study		10.4.3 Acidocalcisomes 10.4.3.1 Methods to Study	361
	in Toxoplasma gondii 10.2.1 Fluorescent Probes 10.2.2 Manipulation of Ca ²⁺ 10.2.3 Genetic Indicators	352 352 355 357	Acidocalcisomes 10.4.4 Plant-Like Vacuole 10.4.5 Extracellular Calcium and Store-Operated Ca ²⁺ Entry 10.5 Ca ²⁺ and Cell Eunction in	365 365 366
10.3	Regulation of [Ca ²⁺] _i in Toxoplasma gondii	357	Toxoplasma gondii	368
	10.3.1 Ca ²⁺ Transport Across the		10.6 Conclusions	371
	Plasma Membrane 10.3.2 Ca ²⁺ -Binding Proteins	358 359	Acknowledgements	372
10.4	Calcium Sources 10.4.1 Endoplasmic Reticulum	360 360	References	372

MethodsX 1 (2014) 151-154



Contents lists available at ScienceDirect

MethodsX

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mex

The GCaMP3 – A GFP-based calcium sensor for imaging calcium dynamics in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*



Lucas Borges-Pereira ^{a,b}, Bruna R.K.L. Campos^a, Celia R.S. Garcia^{a,*}

^a Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil ^b Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brazil



ABSTRACT

Calcium (Ca²⁺) signaling pathways are vital for all eukaryotic cells. It is well established that changes in Ca²⁺ concentration can modulate several physiological processes such as muscle contraction, neurotransmitter secretion and metabolic regulation (Giacomello et al. (2007) [1], Rizzuto and Pozzan (2003) [2]). In the complex life cycle of *Plasmodium falciparum*, the causative agent of human malaria, Ca²⁺ is involved in the processes of protein secretion, motility, cell invasion, cell progression and parasite egress from red blood cells (RBCs) (Koyama et al. (2009) [3]).

The generation of *P. falciparum* expressing genetically encoded calcium indicators (GECIs) represents an innovation in the study of calcium signaling. This development will provide new insight on calcium homeostasis and signaling in *P. falciparum*. In addition, these novel transgenic parasites, PfGCaMP3, is a useful tool for screening and identifying new classes of compounds with anti-malarial activity. This represents a possibility of interfering with signaling pathways controlling parasite growth and development. Our new method differs from previous loading protocols (Garcia et al. (1996) [4]; Beraldo et al. (2007) [5]) since:

http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.005

^{*} Corresponding author at: Rua do Matão 101, travessa 14, São Paulo, SP 05508-090, Brazil. Tel.: +55 11 30917518; fax: +55 11 30917422.

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

^{2215-0161/© 2014} The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http:// creativecommons.org/licenses/by/3.0/).
- It provides a novel method for imaging calcium fluctuations in the cytosol of *P. falciparum*, without signal interference from the host cell and invasive loading protocols.
- This technique could also be expanded for imaging calcium in different subcellular compartments.
- It will be helpful in the development of novel antimalarials capable of disrupting calcium homeostasis during the intraerythrocytic cycle of *P. falciparum*.
- © 2014 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http:// creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

A R T I C L E I N F O Method: Imaging calcium dynamics in Plasmodium falciparum Keywords: Malaria, GECIs, GFP, Calcium, Drug screening, Plasmodium falciparum, GCaMP3 Article history: Received 6 August 2014; Accepted 8 August 2014; Available online 27 August 2014

Method details

Calcium (Ca²⁺) is a ubiquitous signaling molecule and acts in several physiological processes from mammalian cells to parasites (Rizzuto and Pozzan 2003 [2]; Giacomello, Drago et al. 2007 [1]; Koyama, Chakrabarti et al. 2009 [3]). To monitor the calcium fluctuations in *Plasmodium falciparum* invasive loading protocols are used and do not allow discrimination of signals from the host cell and intracellular parasites (Garcia, Dluzewski et al. 1996 [4]; Beraldo, Mikoshiba et al. 2007 [5]). Generation of transgenic *Plasmodium falciparum* expressing GECI represents an innovation, allowing monitoring calcium fluctuations in the cytosol of *P. falciparum* without invasive loading protocols and interference from the host cell.

Construction of transgenic *Plasmodium falciparum* requires the following steps: (i) cloning of GCaMP3 gene into *P. falciparum* expression vector pDC, (ii) transfection of *P. falciparum* with the pDC/GCaMP3 constructs, (iii) selection of the transfected population, (iv) analyses of PfGCaMP3 calcium responses.

Step 1: Cloning of GCaMP3 gene into P. falciparum expression vector pDC.

The ORF encoding the GCaMP3 gene was amplified from the original mammalian expression plasmid (Addgene, kindly supplied by Dr. Silvia Moreno) using the specific primers: 5' GGATCCATGGGTTCTCATCATCATCATC 3' and 5' GGATCCTTACTTCGCTGTCATCATTTGTAC 3'. The BamH I cleavage site was added in the 5' end of both primers. Approximately 100 ng of plasmid was used in a PCR reaction in the following conditions: $94 \circ C/5'$, $34 \text{ cycles of } 95 \circ C/55''$; $50 \circ C/60''$ and $68 \circ C/180''$ and a final step of $74 \circ C/5'$. The amplicons, approximately 1.3 kb, were purified from agarose gel using PureLinkTM Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) according with the manufacture's protocols. The purified amplicons were then cloned into bacterial propagation vector pJET (Fermentas) and used to transform One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). The transformant selection was made in LB agar plates at $37 \circ C$ for 20h. Single colonies were grown in 5 mL of LB/ampicillin at $37 \circ C$ for 20h at 180 rpm. Plasmid DNA was extracted with Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega).

To test for the presence of GCaMP3 gene, plasmid DNA was submitted to restriction analyses with the BamH I enzyme. The reaction was performed with approximately 10U of enzyme at 37 °C for 2 h. All tested colonies had the GCaMP3 gene. The cloning confirmation was also obtained by sequencing reaction. The tested colonies presented a gene that was identical with the synthetic construct GCaMP3 gene (GI: 299818412) present in Basic Local Alignment Search Tool (BLAST[®]) website.

The GCaMP3 gene was then transferred to *P. falciparum* transfection plasmid pDC [6] (kindly supplied by Dr. Gerhard Wunderlich). For this purpose, pJET/GCaMP3 construct and pDC vector were submitted to a new restriction reaction with BamH I enzyme and the fragments, approximately 1.3 and 6kb, corresponding to GCaMP3 and pDC respectively, were purified from the agarose gel as described above. The ligation reaction was carried out at 16 °C overnight and was used to transform chemically competent *E. coli* using the heat shock method. From the 12 colonies obtained, colonies 8 and 11 were positive for GCaMP3. The correct insertion of the gene was confirmed by restriction analyses with Xho I, since digestion with this enzyme results in fragments with different sizes

152



Fig. 1. *P. falciparum*-infected RBC transfected with the calcium indicator GCaMP3. (A) Bright field and (B) fluorescence image of a parasite expressing GCaMP3. The images were acquired in an Axio Scope A.1 microscope (Zeiss) and analyzed with AxioVison 4.8 software. The objective used was a $100 \times$ N-Achroplan with oil immersion. Scale bar=5 μ m.

depending on the orientation of the insert. Colonies 8 and 11 showed the GCaMP3 inserted in the correct orientation. We selected colony 11 for sequencing and the gene was identical with the synthetic construct GCaMP3 gene present in Basic Local Alignment Search Tool (BLAST[®]) website. *Step 2*: Transfection of *P. falciparum* with the pDC/GCaMP3 constructs.

A synchronized ring culture of *P. falciparum* with a parasitemia of approximately 10% was submitted to electroporation with 50 µg of pDC/GCaMP3 constructs. Briefly, 200 µL of cells were resuspended in 500 µL of Cytomix (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 mM HEPES), the plasmid was added and the mixture was transferred into a 0.4-cm cuvette. The electroporation conditions were as follows: 2.5 kV, 25 µF and 200 Ω . The cuvette was placed on ice for 5 min. The cells were then transferred to a culture flask with 10 mL of culture medium (RPMI 1640 Gibco supplemented with 0.5% albumax, 2g/L sodium bicarbonate, 40 mg/L gentamicin and 50 mg/L hypoxanthine) and placed in an incubator (5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂). After 48 h 5 nM of WR99210 was added to the culture medium to select for transformants. The transfected parasites (PfGCaMP3) started to appear approximately after 2 weeks and the fluorescent parasites could be observed in a fluorescence microscope (Fig. 1).



Fig. 2. Calcium response of PfGCaMP3 parasites. (A) PfGCaMP3 and (B) wild type 3D7 parasites were stimulated with ionomycin (red) for 1 min. The increase in the fluorescence of the parasites was determined by flow cytometry analysis. FL1-H was used to detect GCaMP3 fluorescence emission at a wavelength of 530 nm. The overlaid histograms in green and black represent control without treatment and treated with DMSO, respectively.

Step 3: Selection and enrichment of the transfected population.

The transfected population was submitted to a cell sorting by flow cytometry to select those parasites with increased fluorescence intensity at 488 nm. The experiment was carried out in a FACSAria IITM cell sorter (BD Biosciences). The selected parasites were maintained for 1 week and then cloned by limiting dilution in 96-well plates (0.5 parasite/well). The parasites could be detected approximately 2 weeks after the limiting dilution by measuring the activity of LDH enzyme. LDH activity was measured with Malstat reagent (400 μ L of Triton X-100 in 80 mL of deionized water, 4.00g of L-lactate, 1.32 g of Tris buffer, 0.022 g of 3-acetylpyridine adenine dinucleotide (APAD), pH 9 in the final volume of 200 mL) and NBT/PES solution (0.160g of nitro blue tetrazolium salt and 0.008 g phenazine ethosulfate in 100 mL of deionized water). Fifteen μ L of the culture was taken from each well and added to a plate containing 100 μ L of Malstat reagent and 25 μ L of NBT/PES solution and the color development of the LDH plate was monitored colorimetrically at 620 nm [7]. From the total clones obtained, we selected one with an increased percentage of fluorescent parasites for further studies.

Step 4: Analyses of PfGCaMP3 calcium response.

To test the calcium response in the presence of the calcium ionophore ionomycin, we selected one clone from the 96 well plate, since this clone had a higher percentage of fluorescence parasites. Infected erythrocytes at trophozoite stage were centrifuged (2000 rpm, 5 min), and the pellet was washed twice and resuspended in 1 mL of buffer A (in mM: 116 NaCl, 5.4 KCl, 0.8 MgSO₄, 5.5 p-glucose, 50 MOPS, 2 CaCl₂). Two μ M ionomycin was added and the cells were incubated for 1 min (Fig. 2). The calcium response was determined from dot plots [side scatter (SSC) versus fluorescence] of 10⁵ cells acquired on a FACS Calibur flow cytometer using CELLQUEST software (Becton & Dickinson). GCaMP3 was excited with a 488 nm argon laser and the fluorescence emission was collected at 520–530 nm [8].

Acknowledgements

This work was supported by grant from FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo Process 11/51295-5). LBP is a FAPESP fellow, BRKLC is PIBIC/CNPq fellow. We are also grateful to Colsan Associação Beneficente de Coleta de Sangue for providing blood and plasma. We thank Dr. Silvia Moreno and Dr. Gerhard Wunderlich for providing plasmids. *MethodsX* thanks the (anonymous) reviewers of this article for taking the time to provide valuable feedback.

References

- M. Giacomello, I. Drago, et al., Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death, Cell Death Differ. 14 (7) (2007) 1267– 1274.
- [2] R. Rizzuto, T. Pozzan, When calcium goes wrong: genetic alterations of a ubiquitous signaling route, Nat. Genet. 34 (2) (2003) 135–141.
- [3] F.C. Koyama, D. Chakrabarti, et al., Molecular machinery of signal transduction and cell cycle regulation in Plasmodium, Mol. Biochem. Parasitol. 165 (1) (2009) 1–7.
- [4] C.R. Garcia, A.R. Dluzewski, et al., Calcium homeostasis in intraerythrocytic malaria parasites, Eur. J. Cell Biol. 71 (4) (1996) 409– 413.
- [5] F.H. Beraldo, K. Mikoshiba, et al., Human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, displays capacitative calcium entry: 2aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the P. falciparum cell cycle, J. Pineal Res. 43 (4) (2007) 360–364.
- [6] D.A. Fidock, et al., Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance, Mol. Cell 6 (4) (2000) 861–871.
- [7] S. Nkhoma, M. Molyneux, S. Ward, In vitro antimalarial susceptibility profile and prcrt/pfmdr-1 genotypes of Plasmodium falciparum field isolates from Malawi, Am. J. Trop. Med. Hyg. 76 (6) (2007) 1107–1112.
- [8] D.C. Schuck, et al., Flow cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds, Cytometry A 79 (11) (2011) 959–964.

JBC Papers in Press. Published on September 15, 2015 as Manuscript M115.652511 The latest version is at http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M115.652511 Calcium signaling in *T. gondii*

Calcium Signaling Throughout the *Toxoplasma gondii* Lytic Cycle. A Study Using Genetically Encoded Calcium Indicators.

Lucas Borges-Pereira^{1,3#}, Alexandre Budu^{1,4#}, Ciara A. McKnight^{1,2#}, Christina A. Moore^{1,2#}, Stephen A. Vella¹, Miryam A. Hortua Triana¹, Jing Liu^{1,5}, Celia R. S. Garcia⁶, Douglas A. Pace^{1,7} and Silvia N. J. Moreno^{1,2*}

¹Center for Tropical and Emerging Global Diseases and ²Department of Cellular Biology, University of Georgia, Athens, Georgia 30602

Running title: Calcium signaling in T. gondii

^{*}To whom correspondence should be addressed: Silvia N. J. Moreno, Department of Cellular Biology and Center for Tropical and Emerging Global Disease, 350A Paul D. Coverdell Center, University of Georgia, Athens, GA 30602. Tel.: 706-542-4736; Fax: 706-542-9493; E-mail: smoreno@uga.edu

Keywords: Calcium, calcium indicators, invasion, egress, gliding, Toxoplasma gondii

- **Background:** Ca²⁺ signaling is important for the lytic cycle of *T. gondii*.
- **Results:** Genetically encoded Ca^{2+} indicators revealed cytosolic Ca^{2+} changes in real time
- **Conclusion:** New approach highlights important features of the lytic cycle
- **Significance:** Ca²⁺ influx leads to signaling that results in enhancement of important lytic cycle features.

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that invades host cells, creating a parasitophorous vacuole (PV) where it communicates with the host cell cytosol through the PV membrane. The lytic cycle of the parasite starts with its exit from the host cell followed by gliding motility, conoid extrusion, attachment, and invasion of another host cell. Here, we report

Fluctuations of the cytosolic calcium ion (Ca^{2+}) concentration regulate a variety of cellular functions in all eukaryotes, such as secretion, contraction, cell division, and differentiation (1). Cells contain a sophisticated set of mechanisms to balance their cytosolic Ca^{2+} levels, and the signals that elevate cytosolic Ca^{2+} are compensated by mechanisms that reduce it. Ca^{2+} is sequestered into different

that Ca²⁺ oscillations occur in the cytosol of the parasite during egress, gliding, and invasion, critical steps of the lytic cycle. Extracellular Ca²⁺ enhances each one of these processes. We used tachyzoite clonal lines expressing genetically encoded calcium indicators combined with host cells expressing transiently expressed calcium indicators of different colors and measured Ca²⁺ changes in both parasites and host simultaneously during egress. We demonstrated a link between cytosolic Ca²⁺ oscillations in the host and in the parasite. Our approach also allowed us to measure two new features of motile parasites, which were enhanced by Ca^{2+} influx. This is the first study showing, in real time, Ca²⁺ signals preceding egress and their direct link with motility, an essential virulence trait.

organelles, where it is released via calcium release channels in response to specific signals (2). Ca^{2+} signaling is universal, and it is utilized by prokaryotic and eukaryotic unicellular organisms as well as by multi-cellular eukaryotes (3). Ca^{2+} signals decoded by a specific cell may lead to specific physiological responses mediated either through gene expression changes or independent of changes in gene expression (3,4).

Apicomplexan parasites include a number of pathogens of medical and veterinary relevance, such as Toxoplasma gondii, the agent of toxoplasmosis, and *Plasmodium* spp, the agents of malaria. During its lytic cycle, T. gondii actively invades host cells, creating a parasitophorous vacuole (PV), where it divides to finally exit in search of a new host cell. Parasite invasion is a highly coordinated and active process involving several discrete steps (5). In Toxoplasma, indirect evidence showed that Ca^{2+} signals are decoded to result in stimulation of gliding motility, microneme secretion, conoid extrusion, and invasion. However, information on the mechanisms and the molecules involved is fragmented or missing. Our previous studies have shown that a nifedipine-sensitive Ca²⁺ channel is involved in Ca^{2+} entry (6), although the molecular components involved have not been identified. We also demonstrated that Ca²⁺ influx enhances lytic cycle traits of T. gondii, such as microneme secretion, conoid extrusion, motility and invasion (6). Our work highlighted the significance of Ca^{2+} entry, resulting in Ca^{2+} signals that affect virulence traits of an intracellular pathogen.

Previous studies on the role of Ca²⁺ fluctuations in gliding motility (7), conoid extrusion (8), microneme secretion (9-11), host cell invasion (7,12), and egress (13) were done using indirect methods, such as labeling extracellular parasites with fluorescent dyes and following Ca²⁺ changes during their gliding motility (7) and using Ca^{2+} ionophores and other exogenous agents to elevate Ca²⁺ in extracellular parasites stimulating conoid extrusion (8) or microneme secretion (9-11). Another indirect strategy was the use of intracellular or extracellular Ca²⁺ chelators to prevent host cell invasion (7.12) or egress (13). These methods have serious limitations. Loading with fluorescent Ca²⁺ indicators is highly invasive and can be damaging to cells. These dyes can compartmentalize during extended incubations and are incompatible with prolonged in vivo measurements; additionally, dyes cannot be used for studies involving intracellular parasites because parasite specific loading cannot be accomplished because host cells will also be loaded.

Of all the Apicomplexan parasites, *T. gondii* is the most genetically tractable and in this study we

took advantage of this property to use genetically encoded calcium indicators (GECIs) to investigate the role of Ca²⁺ in motility, invasion, and egress. GECIs are powerful tools, and recent efforts in protein engineering have significantly increased their performance (14). GECIs have the advantage that they enable noninvasive imaging of defined cells and compartments. State-of-the-art GECIs include the single-wavelength sensor GCaMPs, which are based on circularly permuted green fluorescent protein (cpGFP), calmodulin (CaM), and the Ca²⁺/CaM-binding "M13" peptide (M13pep) (14). "GECO" sensors, created from GCaMP3 by random mutagenesis (15) are also available in a variety of colors. Our experiments using T. gondii tachyzoites expressing GCaMP3 or GCaMP6f combined with host cells expressing Red-GECO or Blue-GECO (B-GECO) allowed us to directly follow changes in real time in cytosolic Ca²⁺ in the parasites, while they are inside their host cell and simultaneously in both the parasites and host cells during invasion and egress. The use of these tools information about exciting new provided communication between the cytosolic Ca^{2+} in the host and the parasite. Our approach has also allowed the measurement of two new features of motile parasites, which were enhanced by Ca²⁺ influx. This is the first study showing directly that Ca²⁺ signals precede egress and establishing a direct correlation between Ca^{2+} signals and motility, an essential virulence trait, throughout the T. gondii lytic cycle.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Cultures-T. gondii tachyzoites (RH strain) were maintained as described (16) using Dulbecco's modified minimal essential media (DMEM) with 1% FBS. HeLa cells (ATCC) were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate and 2 mM L-glutamine. hTERT fibroblasts (originally from BD Biosciences) were used as host cells for growth of parasites and also for the invasion experiments described below. These cells were maintained in high glucose DMEM media with 10% FCS. *GCaMP3*-transfected tachyzoites were maintained in hTERT fibroblasts the presence of 1 μ M pyrimethamine. *GCaMP6f*-transfected tachyzoites were maintained under similar conditions but in the presence of 20 μ M

chloramphenicol. Parasites were purified as described (16).

Chemicals and Reagents-Fluo 4-AM and lipofectamine from Invitrogen were (Life Island, NY). GCaMP3, Technologies, Grand GCaMP6f (fast version of GCaMP6), R-GECO and B-GECO were obtained from Addgene (http://www.addgene.org/) and the plasmids were used for HeLa cells transfections or the respective genes cloned into T. gondii expression vectors for stable expression in tachyzoites. Thapsigargin, ionomycin, saponin, dithiotreitol (DTT), histamine and all other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Preparation of GECI-expressing Tachyzoites and HeLa Cells. The GCaMP3 gene (17) was amplified from the commercial plasmid and cloned into the T. gondii expression vector pDHFRTubGFP (18) using BglII and AvrII restriction sites and adding a stop codon in front of the GFP sequence. The primers used were forward AGGCGTGTACGGTGGGAGGTC 3' and reverse 5' CTTCCTAGGTTACTTCGCTGTCATCATTTG 3'. The plasmid pDTGCaMP3 was transfected into tachyzoites of the RH strain for pyrimethamine selection. We then isolated cells with low fluorescence by cell sorting to eliminate those highly fluorescent cells in which the GCaMP3 could be buffering Ca^{2+} and preventing visualization of physiological changes in Ca²⁺ levels. Sixty-nine clones were isolated and analyzed for their response to ionomycin. We incubated these cells in either buffer A (116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM D-glucose and 50 mM Hepes, pH 7.2) or buffer A plus 1 μ M ionomycin in the presence of 1 mM external CaCl₂. We selected the 10 subclones that gave maximal fluorescence response to the ionophore, and used two of these subclones in our experiments.

Red GECO coding sequence, cloned into a vector for protein expression into mammalian cells (pCMV) (15) was amplified with the forward primer 5'-

<u>CCCGGG</u>TAATGGTCGACTCTTCACGTCGTAA G-3' and reverse primer 5'-<u>TACGTACTACTTCGCTGTCATCATTTGTAC-</u> 3'. SmaI and SnaBI restriction sites were added to the forward and reverse primers, respectively (*underlined*). R-GECO was cloned in the vector ptub_SAG1-IEalpha-DsRed_dhfr_sag1CATsag1

(kindly provided by Vern B. Carruthers) between the SmaI (5')/SnaBI (3') restriction sites, substituting the DsRed gene, previously shown to label the PV (19). *T. gondii* parasites (RH strain) were transfected and selection was done with 20 μ M chloramphenicol. This PV version of Red GECO was also transfected in a *T. gondii* clone (RH strain) expressing the cytosolic GCaMP3 calcium sensor. These parasites were selected in the presence of both 1 μ M pyrimethamine and 20 μ M chloramphenicol.

Plasmids for expression of *GCaMP6* in *T. gondii* were kindly provided by Kevin Brown and David Sibley, Washington University (manuscript in preparation). The coding DNA sequence for *GCaMP6f* (Addgene) was amplified by PCR and cloned into a *T. gondii* vector for expression behind the tubulin promoter. Plasmids were electroporated into RH strain parasites and clones selected by chloramphenicol resistance.

HeLa cells (5 x 10^5) were grown on coverslips. After 24 h, cells were transfected with 1.25 µg of plasmid DNA encoding R-GECO or B-GECO using lipofectamine 2000 (Invitrogen) following instructions of the manufacturer. 6-8 h later HeLa cells were infected with 10^6 tachyzoites expressing *GCaMP3* or *GCaMP6f* and were grown for 15-20 hours. Rosettes containing 4-8 parasites were used in all the experiment. Variations to the protocol are explained in the legends to the figures.

 Ca^{2+} Measurements-Fluorometric Cvtosolic measurements were done with GCaMP3 and GCaMP6f-expressing tachyzoites. The parasites were washed twice in Ringer buffer (155 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 3 mM NaH₂PO₄, 10 mM Hepes pH 7.3 and glucose 10 mM) and resuspended in the same buffer to a final density of 1 x 10^9 cells/ml and kept in ice. For fluorescence measurements, 50 µl portions of the cell suspension was diluted in 2.5 ml of Ringer (2 x 10^7 cells/ml final density) in a cuvette placed in a thermostatically controlled Hitachi 4500 spectofluorometer. Excitation was at 485 nm and emission at 520 nm. Traces shown are representative of three independent experiments conducted on separate cell preparations. Calcium-defined conditions were determined by using EGTA or

BAPTA and calcium chloride to arrive at calculated concentrations of free calcium. Calcium-EGTA combinations were determined using Maxchelator software (<u>http://maxchelator.stanford.edu</u>). Fura2-AM loading and measurements were done as previously described (6).

Invasion Assays-To monitor invasion. extracellular GCaMP3- or GCaMP6f-expressing parasites were collected and resuspended in Ringer buffer with 1 mM EGTA or 1 mM CaCl₂. The parasites were then added to a confluent monolayer of hTERT cells plated on MatTek microscopy dishes. The parasites were semi-synchronized by incubating them on ice for 20 min before imaging. The parasites were then imaged at 37° C. Fluorescence images were captured using an Olympus IX-71 inverted fluorescence microscope with a Photometrix CoolSnapHQ charge-coupled device (CCD) camera driven by DeltaVision software (Applied Precision). Images were collected every 1 sec for 10 min. totaling 603 frames and were transformed in videos using SoftWorx suite 2.0 software from Applied Precision. All experiments were done at 37°C and the results were obtained from at least 3 independent experiments.

Egress Assavs-8-12 hours after transfection, HeLa cells were infected with 1x10⁶ GCaMP6fexpressing tachyzoites. Thirty hours after infection, parasitophorous vacuoles containing 4-8 parasites were observed by microscopy after washing them with Ringer buffer. Drugs were added in Ringer buffer at the concentrations indicated: ionomycin (1 μ M), histamine (5 and 100 μ M), thapsigargin (1 μM), DTT (5 mM), saponin (0.01%), nifedipine (10 µM). Ringer buffer was used as extracellular buffer (EB). CaCl₂ was omitted for experiments in the absence of extracellular calcium, and the media was supplemented with 100 µM or 1 mM EGTA. For experiments using intracellular conditions, an intracellular buffer was used considering the ionic composition of the cytosol: Kgluconate 140 mM, NaCl 10 mM, MgSO₄ 2.7 mM, ATP (sodium salt) 2 mM. glucose 1 mM. EGTA 200 uM. CaCl₂ 65 uM (90 nM free Ca^{2+}) and 10 mM Tris-Hepes pH 7.3. Images were acquired as for the invasion assays (time-lapse mode with an acquisition rate of at least 2-3 secs during 20-30 min)

Motility Assays: 35 mm glass bottom cover dishes (MATTEK) were treated with 2 mL of 10% FBS (Fetal Bovine Serum) in PBS (Phosphate Buffer Solution) pH 7.4 overnight at 4°C. The following morning excess FBS was washed with PBS. Freshly egressed tachyzoites expressing GCaMP6f were collected, purified and resuspended in 1 mL of Ringer Buffer without calcium. $\sim 2.5 \times 10^7$ parasites were loaded onto cover dishes using a cell culture cylinder and incubated for approximately 15 min on ice to allow for cells to adhere. After removing the cell culture cylinder, Ringer Buffer was added to a 2 ml final volume. Cells were imaged using a Zeiss LSM 710 confocal microscope set at 37°C (http://bmc.uga.edu/equipment/zeisslsm-710-confocal-microscope/). Before image acquisition, cells were allowed to equilibrate at 37°C for 5 min. A 488 laser power was set at 4% and cells were imaged for ~10 min. After establishment of a baseline for image acquisition. thapsigargin (2 µM final) and CaCl₂ solution (2 mM final) was added and motility recorded. Ca²⁺ was added 1 min after thapsigargin addition.

For analysis of the data, Trackmate, a plugin available in Fiji was used to measure fluorescence changes in moving cells (20).

RESULTS

 Ca^{2+} Signaling and Egress-It has been shown that calcium ionophores and other agents induce egress of tachyzoites from their host cells. However, it is difficult to study Ca²⁺ changes directly in the parasite because any perturbation caused by either Ca^{2+} ionophores, (21), dithiols (22), Ca^{2+} chelators (23), or permeabilizing agents such as saponin (24) will affect both the host and parasite. In addition, chemical Ca²⁺ indicators are not useful because they label both the host and parasite. To investigate whether there is a correlation between Ca^{2+} signals in the host cell and in the parasite during parasite egress we created T. gondii tachyzoites expressing GCaMP3 or GCaMP6f and monitored Ca^{2+} dynamics while they were intracellular. HeLa cells transiently transfected with the Ca²⁺ indicator, R-GECO were infected with GECI-expressing tachyzoites and subjected to various treatments previously shown to stimulate egress.

We first tested the effect of ionomycin $(1 \ \mu M)$ on HeLa cells transiently transfected with *R*-*GECO* and infected with *GCaMP3*-expressing tachyzoites.

Parasite egress was preceded by Ca²⁺ increase in the parasite cytosol and increased motility (Fig. 1A and Video S1). A dramatic Ca²⁺ increase always immediately preceded the increase in motility and active egress. The first parasites to leave the host cells were able to actively traverse their intact plasma membrane, as shown by the appearance of a moving junction (Video S1). Only after several parasites had left the host cell was the plasma membrane permeabilized and the remaining tachyzoites egressed passively. The effect of ionomycin is the result of the ionophore inserting in membranes of both host and parasite, leading to simultaneous Ca²⁺ increase in both compartments (Fig. 1C). This simultaneous increase in Ca^{2+} was followed by parasite egress (Video S1). It was not possible to discriminate whether host cell Ca²⁺ increase was necessary for parasite Ca^{2+} increase and egress.

Similar experiments with ionomycin in the absence of extracellular Ca^{2+} (Fig. 1B) led to an increase in cytosolic Ca²⁺ in both host cells and tachyzoites (Fig. 1C), albeit with a consistent timedelay, and also resulted in parasite egress (Fig. 1B), suggesting that Ca^{2+} release from the parasite intracellular stores caused by ionomycin was sufficient to stimulate Ca²⁺ increase and parasite egress. We observed that parasites egressed sooner in the presence of extracellular Ca^{2+} , suggesting that Ca^{2+} influx enhances Ca^{2+} in the parasite and egress. Fig. 1D shows the quantification of at least three independent experiments for the time to egress after adding ionomycin. In all experiments Ca²⁺ oscillations preceded egress. Fig. 1E shows the response to ionomycin of non-infected HeLa cells expressing GECO.

We next tested thapsigargin (TG), which inhibits the SERCA-type Ca^{2+} ATPase at very low concentrations (25) resulting in an increase of cytosolic Ca^{2+} due to its continual leakage from the endoplasmic reticulum and block of its reuptake. Addition of TG in the presence of extracellular Ca^{2+} stimulates store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in mammalian cells (26,27). We recently demonstrated that Ca^{2+} entry in *T. gondii* occurs through a pathway that does not involve SOCE (6). Addition of 1 µM TG to HeLa cells transiently transfected with R-GECO and infected with GCaMP3expressing tachyzoites resulted in cytosolic Ca²⁺ increases in both the host cell and parasite without egress of the parasites during the time period examined (15 min) (Fig. 2A and 2B and Video S2). Higher concentrations of TG (10 µM) were toxic to HeLa cells, resulting in plasma membrane blebbing (not shown). These results are in agreement with previous reports, which demonstrated the toxic effect of TG in eukaryotic cells at high concentrations (28) that can lead to apoptosis (29). However, parasites did not egress even under these conditions (not shown) suggesting that Ca²⁺ changes in HeLa cells induced by SOCE are not sufficient to cause parasite egress. The amount of Ca²⁺ released by ionomycin into the cytoplasm of the cell was 5-6 times larger than the amount released by TG (Fig. 2C), which could explain why ionomycin is highly efficient at inducing Ca^{2+} increase and egress. These results suggest a threshold for the cytosolic Ca²⁺ concentration needed for stimulation of motility and egress.

It has been shown previously (22) that dithiotreitol (DTT) stimulates tachyzoite egress. Therefore, we investigated if this effect was linked to cytosolic Ca^{2+} increase in the parasite. We tested 5 mM DTT on *R-GECO*-expressing HeLa cells infected with GCaMP3-expressing parasites. We first observed a Ca²⁺ increase in tachyzoites, followed by parasite egress, and lastly a Ca²⁺ increase in the infected host cells (Fig. 3A and 3B, and Video S3). Cytosolic Ca^{2+} in the parasite increased (Fig. 3B, trace e) before host cytosolic Ca^{2+} (Fig. 3B, peak in red trace a, followed by b and c). This is supported by control experiments showing that there was no effect of DTT when added directly to non-infected HeLa cells expressing R-GECO (Fig. 3D). It has been shown that DTT stimulates a secreted parasite nucleotidase (22), resulting in depletion of host cell ATP levels, and exit of parasites (30). ATP is used by both the SERCA pump and the plasma membrane ATPase to pump Ca^{2+} out of the cytosol and if it is not available both pumps would stop functioning resulting in an increase of host cytosolic Ca^{2+} . We also observed that the uninfected cells shown in the

supplemental Video S3 do not respond to DTT (cells b and c in Fig. 3A and Video S3) until after tachyzoite egress, suggesting that this secondary Ca^{2+} increase is the consequence of Ca^{2+} waves from cell to cell probably through gap junctions (31). Interestingly, we did not observe a direct effect of DTT on tachyzoite cytosolic Ca²⁺, as tested in Fura-2/AM-loaded extracellular tachyzoites (Fig. 3C), suggesting that DTT effect on tachyzoites cvtosolic Ca^{2+} is indirect and involves a mechanism that is functional or expressed only in intracellular parasites. The trace shown in Fig. 3C compare the response to DTT in the absence of extracellular Ca^{2+} (red, EGTA) and in its presence (blue). Addition of thapsigargin (TG) leads to an increase in cytosolic Ca²⁺ resulting from ER leakage, under both conditions. Further addition of Ca²⁺ shows Ca²⁺ entry (red trace).

Differential Effects of Intracellular and Extracellular Ionic Conditions on Parasite Egress-Previous studies have used mild detergents to permeabilize the host cell plasma membrane allowing the intracellular parasites to become exposed to buffers with varying ionic compositions. Using this strategy, it was found that potassium-poor extracellular environment would lead to parasite egress (24). For our experiments we infected HeLa cells expressing the Ca^{2+} indicator *R-GECO* with GCaMP3-expressing tachyzoites (see Experimental Procedures for details) and permeabilized them with saponin (Fig. 4A). Fig. 4 shows Ca²⁺ oscillations in HeLa cells (Fig. 4B, red trace), followed by Ca²⁺ oscillations in the parasites (Fig. 4B, light green trace), and, minutes later, egress of the parasites (Fig. 4A and 4B and Video S4). The oscillations in the parasites are probably the result of Ca^{2+} entry from the host cytosol as saponin showed no direct effect on the parasite cytosolic Ca^{2+} (not shown). However, it appears that the host plasma membrane is not initially permeabilized by this treatment as Ca^{2+} oscillations continue to occur, a phenomenon incompatible with permeabilization of the plasma membrane. Interestingly, it has been described that saponin treatment of rat myocytes (32) also resulted in Ca^{2+} oscillations suggesting that saponin stimulates IP₃ release by activation of a phospholipase C (PLC) (33).

Prolonged incubation with saponin could lead to permeabilization of the plasma membrane of the host, exposure of tachyzoites to the extracellular medium, and parasite egress. However, when these experiments were done in the same extracellular medium in the absence of extracellular Ca^{2+} , we observed a decrease in the number of parasites showing Ca^{2+} oscillations and Ca^{2+} spikes followed by egress (Fig. 4C, green and purple bars). Furthermore, when extracellular Ca^{2+} was absent, there was an increase in the number of parasites that did not change their intracellular Ca^{2+} levels or egress (Fig. 4C, blue bars).

We next investigated further the role of Ca^{2+} influx during egress, and for this, we used HeLa cells infected with GCaMP6f-expressing tachyzoites in buffers with extracellular or intracellular ionic compositions (EB and IB, see Experimental Procedures for a detailed description) (Fig. 5A-D and Video S5A and 5B). Addition of saponin to infected HeLa cells in extracellular buffer in the presence of extracellular Ca²⁺ resulted in tachyzoite Ca^{2+} increases of high peak amplitude, followed by parasite egress, high motility of the extracellular parasites, and immediate invasion of neighboring cells (Fig. 5A). In the absence of Ca^{2+} , parasite Ca^{2+} increase was small, egress was delayed, parasites were less motile, and were less likely to invade neighboring cells (Fig. 5B). We next tested an intracellular buffer containing high K⁺, low Na⁺ and also low Cl⁻ simulating the intracellular composition of these ions. We find that Ca^{2+} influx still enhances motility and egress under these conditions (Fig. 5C and Video S5A). In the presence of 90 nM Ca^{2+} (Fig. 5D), Ca^{2+} oscillations are not evident, egress is delayed and the parasites take longer to seek another cell to invade (Fig. 5D and Video S5B). The graphics in the right panels of Fig. 5 show intracellular Ca^{2+} changes in intracellular tachyzoites exposed to these different conditions. Each fluorescence tracing tracks a single PV. These results highlight the enhancing effect of Ca^{2+} influx in tachyzoite motility and egress.

We have previously shown that Ca^{2+} influx in *T*. gondii tachyzoites occurs through a nifedipinesensitive permeation pathway (6). We therefore tested the effect of nifedipine on parasite intracellular Ca^{2+} levels and egress under

extracellular ionic conditions (Fig. 5E) with saponin-permeabilized host cells. The parasites showed a delayed Ca²⁺ increase and did not egress, even after a 20-min incubation (Fig. 5E right fluorescence panel). This experiment supports the role of a Ca^{2+} channel involved in Ca^{2+} influx needed to trigger a signaling pathway leading to parasite egress. Quantification of egress in incubations in intracellular (IB) or extracellular buffer (EB) with and without extracellular Ca^{2+} or with nifedipine is shown in Fig. 6. The number of ruptured PVs as a result of parasite egress is significantly lower in the absence of Ca²⁺. As the host cells were permeabilized by prolonged incubations with saponin these effects could not be due to changes in host cytosolic Ca^{2+} .

The Role of the Host Cytosolic Ca^{2+} -An interesting observation in our experiments with saponin was that the parasites inside HeLa cells without R-GECO appeared to egress sooner (Fig. 4B, *trace b*). Our interpretation was that R-GECO chelates Ca²⁺ in the host cell and buffers the free Ca²⁺ available to parasites delaying oscillations and egress (Fig. 4B, compare green tracing a with b). We next investigated if the host cytosolic Ca^{2+} was readily available to the parasites. It has been proposed that the PV membrane (PVM) is a sieve that allows tachyzoites to freely exchange ions and small molecules with the host cell cytosol (34). We therefore investigated whether physiological Ca²⁺ signals could result in Ca^{2+} increases in the PV and intracellular parasites by infecting the HeLa cells transiently expressing *B-GECO* with tachyzoites expressing GCaMP3 in their cytosol and R-GECO directed to the PV (19). We stimulated the cells with histamine, which activates the plasma membrane H1 receptors in HeLa cells leading to intracellular Ca²⁺ increase through the gating of the IP_3R by IP_3 (15). Histamine stimulation of the IP₃ signaling pathway in HeLa cells led to Ca^{2+} increase in the host cytosol (Fig. 7A-D, blue), and this led to a simultaneous Ca^{2+} increase in the PV (*red*) and later increases in the parasites (green) (Fig. 7 C-D and Video S6), but we could not detect parasite egress, suggesting that physiological increases in intracellular Ca^{2+} by histamine are not sufficient to stimulate parasite egress. Fig. 7E shows the average fluorescence changes for host cytosol (blue), parasite cytosol

7

(green) and PV (red) of a minimum of three experiments after stimulation of the infected cells with 100 μ M histamine. A similar concentration of histamine was tested against Fura-2/AM loaded tachyzoites, but these cells were unresponsive and no effect on cytosolic Ca²⁺ was observed (Fig 7F) supporting our interpretation that Ca²⁺ oscillations in the parasite are the result of Ca²⁺ influx from the host and not a direct effect of histamine on the parasite.

 Ca^{2+} Signaling and Motility and Invasion-T. gondii invasion of host cells is a highly coordinated process essential for the successful propagation and expansion of the parasite. Ca^{2+} signaling is essential for the stimulation and enhancement of this virulence trait. It was previously shown that tachyzoites labeled with the fluorescent calcium indicator Fluo 4 (7) underwent Ca^{2+} oscillations during motility and invasion. Extracellular Ca^{2+} enhances invasion events (6) and we therefore investigated whether this enhancement occurs at the single cell level.

Using T. gondii tachyzoites expressing GCaMP6f we were able to demonstrate Ca^{2+} dynamics in the parasites during invasion. We carried out real time measurements of cytosolic Ca²⁺ fluctuations in GCaMP6f-expressing tachyzoites in the presence of hTERT cells and acquired images by time-lapse microscopy. To increase the probability of observing actively penetrating parasites, we allowed the parasites to settle onto host cells on ice, thereby synchronizing their invasion. After allowing the parasites to settle for 20 min, tissue culture dishes were transferred to 37°C resulting in activation of motility and subsequent invasion over the next 10 min. A dramatic Ca^{2+} elevation was immediately followed by stimulation of motility and invasion of host cells (Fig. 8, and Video 7). Quantification of these assays showed an enhancement in the number of cytosolic Ca²⁺ spikes associated with invasion events in the presence of extracellular Ca^{2+} (Fig. 8B, green bars). Interestingly, when we analyzed the average peak fluorescence for each of the groups (no oscillations/invasion, oscillations/invasion, and spike/invasion) we observed that spikes were larger with Ca^{2+} outside and that the parasites must fluoresce around 1.5 fold above background (~75 A.U. vs. resting 50 A.U.) to invade (Fig. 8C). Once

intracellular, tachyzoites ceased to show Ca^{2+} oscillations (Fig. 8A, *frame 6*, and Video S7). In the absence of extracellular Ca^{2+} , cytosolic Ca^{2+} oscillations and invasion events still occurred, but the presence of extracellular Ca^{2+} had an enhancing effect on the number of invasion events. The results from Fig. 8 and Video S7 show that there is a correlation between the increase in Ca^{2+} spikes and invasion in the presence of extracellular Ca^{2+} , indicating that Ca^{2+} influx increases invasion (Fig. 8B).

The invasion experiments showed that a Ca^{2+} peak leads to parasites invading host cells, and extracellular Ca^{2+} enhanced these events. It has been shown that gliding movement is associated with Ca^{2+} oscillations and is stimulated by drugs that cause Ca^{2+} release (35).

We observed previously that Ca^{2+} influx enhances gliding motility (6). We wanted to investigate more in depth this phenomenon and looked into the dynamics and the motility features that would be influenced by Ca²⁺ entry. GCaMP6fexpressing parasites were provided optimal conditions for Ca²⁺ influx (addition of TG in the presence of extracellular Ca^{2+}), (Supplemental Videos 8a and b). We previously observed that cytosolic Ca²⁺ regulates Ca²⁺ entry and TG pretreatment leads to higher Ca²⁺ influx. We now show that under those conditions there is an increase in gliding motility (Fig. 9A and Video 8b). We also looked at Ca^{2+} entry after adding Ca^{2+} (Video 8a). We observed that under basal conditions parasites drifted and oscillated in a disorganized manner. However, upon Ca^{2+} addition, there was a very consistent increase in cytosolic Ca²⁺ and a large number of parasites stopped drifting, and then attached and started gliding. This suggests that the elicited increase in cytosolic Ca^{2+} leads to a significant change in parasite behavior, in which they become increasingly motile and invasive. We looked at two essential features associated with invasion and egress, the duration of motility and the distance traveled (Fig. 9B and Fig. 9C). Interestingly we observed that extracellular Ca^{2+} increases the peak fluorescence intensity, and that there is a correlation between Ca²⁺ influx and both duration of motility and distance traveled. These two features are essential for a successful invasion.

DISCUSSION

We measured Ca²⁺ oscillations in intracellular tachyzoites and found that an increase in cytosolic Ca^{2+} precedes the increase in motility needed for egress. We utilized different types of genetically encoded Ca²⁺ indicators (GECIs), so that we could simultaneously monitor calcium fluxes in both the host and the parasite during egress. We demonstrated that there is significant communication between the host and the parasite, although not always resulting in parasite egress. Additionally, we demonstrate that Ca^{2+} entry plays a relevant role in parasite egress and this entry occurs through a Ca²⁺ channel that is sensitive to nifedipine. Physiological (histamine) or pharmacological (thapsigargin) agents, known to increase cytosolic Ca^{2+} in mammalian cells, were able to stimulate Ca^{2+} increase in the infected cells and only weakly in the parasites, but this increase did not lead to parasite egress, suggesting that the parasite is able to buffer these physiological or pharmacological changes in host cell Ca²⁺.

T. gondii has been reported to grow within vacuoles surrounded by host mitochondria (36), but the biological consequences of this association have remained enigmatic. It has been demonstrated that in some cells, such as pancreatic acinar cells, mitochondria could form a belt that acts as a "firewall" confining Ca²⁺ signals to the secretory pole (37). Ca^{2+} sequestration by mitochondria is also crucial in defining cellular subdomains in neurons. acting as Ca^{2+} buffers (38,39). It is tempting to speculate that host mitochondria could also form a "firewall" close to the parasitophorus vacuole protecting tachyzoites from physiological or pharmacological cytosolic Ca^{2+} increases in the host cell preventing their premature release during the normal Ca²⁺ signaling activity of the host cell. Disruption of the structure of the PV during a natural egress event would expose the parasite to Ca²⁺ fluctuations or ionic changes surrounding the PV.

We also tested the effect of other agents such as ionomycin, DTT, and saponin. Ionomycin increases cytosolic Ca^{2+} in both parasite and host cell leading

to egress, and this effect occurs with and without adding Ca^{2+} to the buffer, suggesting that Ca^{2+} release from the parasite or host intracellular stores is sufficient to account for the increased motility and egress of the parasites. Ionomycin releases Ca^{2+} from all neutral stores and results in a much higher level of intracellular Ca^{2+} than those obtained adding other ionophores or inhibitors like thapsigargin (40) explaining its powerful effect on egress.

The information on intracellular Ca^{2+} release pathways in Apicomplexan parasites is fragmented and poorly defined. There is pharmacological evidence for the presence of channels responsive to inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) (7,41,42) and cyclic ADP ribose (cADPR) (43), although there are no orthologous genes to the mammalian IP₃ receptor or ryanodine receptor (RyR) in any of the Apicomplexan genomes. This is despite evidence for the presence of enzymes involved in the generation of some of these second messengers, such as a phosphoinositide phospholipase C (44) and cADPR cyclase and hydrolase activities (43).

Addition of DTT led to a Ca²⁺ increase and motility in the parasite, resulting in egress. These results revealed that the increase in cytosolic Ca²⁺ levels in the host cells is secondary to parasite egress, supporting previous proposals (22) that this compound acts through the activation of a parasite nucleotidase that depletes the host cell of ATP (30). Interestingly, adjacent uninfected cells also show Ca^{2+} increases after the release of parasites from infected cells, which could be the result of intercellular Ca^{2+} wave propagation (31)Intercellular Ca²⁺ waves could result from the diffusion of second messengers, such as IP₃, through gap junctions between adjacent cells. In addition or alternatively, cell rupture due to parasite egress could release agonists, which could activate the production of IP₃, in the adjacent cells generating a Ca²⁺ signal. Each mechanism can occur in isolation or synergistically (31). Interestingly, DTT did not have a direct effect on cytosolic Ca²⁺ of Fura-2/AM loaded isolated parasites or on cytosolic Ca²⁺ of non-infected cells. The dramatic increase of cytosolic Ca²⁺, which only occurs when the parasite is intracellular, is intriguing and likely involves either 1) other unknown factors of host origin, or 2)

that the parasite nucleotidase in question is only expressed during intracellular stages of development.

Previous experiments using saponin suggested that the ionic composition of the buffer used, and in particular low potassium levels, was important to facilitate parasite egress by this permeabilizing agent (24). We then designed an intracellular buffer with low sodium and chloride and high potassium to compare with extracellular buffer conditions (high sodium, and chloride and low potassium). Parasites were triggered to egress with saponin, and in both cases, egress was faster and more efficient in the presence of Ca^{2+} , highlighting the role of Ca^{2+} entry in the stimulation of motility and lessening the role of other ions under these conditions. We did not observe a significant difference in egress between intracellular and extracellular ionic conditions when Ca²⁺ was present. Previous data from our laboratory supported the participation of a nifedipine-sensitive permeation pathway in Ca^{2+} entry in *T. gondii* (6). Our intracellular buffer ionic composition is high in potassium but also low in chloride (10 mM), resembling the intracellular milieu ionic composition. Previous observations have shown that T. gondii becomes depolarized in low chloride (45), a condition that would favor Ca^{2+} entry.

Our results using R-GECO targeted to the parasitophorus vacuole demonstrated that Ca^{2+} is freely exchanged between the host cytosol and the PV, supporting the suggestions that the PVM acts as a sieve for small ions and molecules.

Several studies have proposed a role for Ca²⁺ signaling during the lytic cycle of *T. gondii*. Using Ca²⁺ ionophores, Ca²⁺-chelating agents, and ethanol, a link between Ca²⁺ and conoid extrusion was postulated (8,46), although no direct parallel Ca²⁺ measurements were reported. The effect of Ca^{2+} on motility was studied on gliding trypsinpermeabilized tachyzoites (47) or by measuring Ca^{2+} oscillations in extracellular tachyzoites loaded with the Ca^{2+} dye Fluo-4/AM (7.35). A role for Ca^{2+} signaling in invasion was postulated on the basis of the analysis of changes in Ca^{2+} occurring in parasites loaded with Fura-2/AM upon their attachment to host cells (12) or by detecting the cessation of Ca²⁺ oscillations in extracellular tachyzoites loaded with Fluo-4/AM (7,48). These

and more recent studies have provided indirect evidence that Ca^{2+} signaling is part of the pathways that result in the stimulation of conoid extrusion, gliding motiliy, microneme secretion, and invasion. Ca²⁺ signaling was also proposed to be involved in the pathway leading to parasite egress from the host cells based on the effect of Ca^{2+} ionophores, which stimulate egress, although it was never shown that cytosolic Ca²⁺ increased in tachyzoites before egress (13,21). Most of the studies on Ca^{2+} signaling were done with extracellular tachyzoites (conoid extrusion, gliding motility, microneme secretion, invasion) measuring indirectly the involvement of Ca^{2+} (using Ca^{2+} chelators or ionophores) or detecting Ca^{2+} changes with fluorescent dyes independently of the phenomena examined. We describe the use of tools to measure directly cytosolic Ca²⁺ changes during these processes. In this study we were able to perform real time measurements of Ca²⁺ changes in live intracellular and extracellular parasites. The use of GECIs provided the means to demonstrate that the parasite cytosolic Ca²⁺ increases and oscillates preceding egress. GECIs allowed measurements of Ca27 separately and simultaneously in the parasite cytosol, PV, and host cytosol. These tools will prove to be very useful in future genetic studies for the phenotypic characterization of mutants lacking putative virulence-related genes.

Analysis of gliding motility and the fluorescence of the genetic Ca^{2+} indicator showed that Ca^{2+} influx correlated with the peak intensity, which correlated with the distance traveled by the parasites and the time that they are in motion. These two features are essential for a successful completion of the lytic cycle and agree with our results showing that invasion and egress events are enhanced under conditions that favored Ca^{2+} influx. The link between these two features to Ca^{2+} oscillations and peak intensity was possible because of the use of a clonal cell line expressing GCaAMP6, which is uniformly expressed in the cytosol. Chemical indicators would not have worked because of uneven loading, toxicity, and organellar compartmentalization.

In our model shown in Fig. 10, Ca^{2+} influx would stimulate the intensity of Ca^{2+} oscillations leading to initiation of gliding motility and exit from the PV shortly thereafter. Intracellular stores (IS) are likely very important for releasing Ca²⁺ into the cytosol, but they would not necessarily lead to activation of motility and egress. Ca^{2+} influx through a nifedipine sensitive pathway will further stimulate parasite cytosolic Ca²⁺ increase, motility and egress (6). Careful analysis of the nifedipine experiments showed that the PV still ruptured, but parasites did not show high motility. A perforin-like protein (PLP) has been shown to be involved in the initial rupture of the PV (19), and the release of Ca^{2+} from intracellular stores could stimulate this release in the natural egress process. Our model proposes that this rupture could result in a downstream stimulation of Ca^{2+} influx, which would lead to stimulation of gliding motility and egress. We believe that the tools described here will help in the dissection of the factors/signaling molecules involved in the interaction of host and parasite resulting in egress, an essential part of the lytic cycle of T. gondii. In addition, the phylogenetic position of these eukaryotic unicellular microbes will advance our understanding of the evolution of these complex pathways.

Acknowledgements-We thank Kevin Brown from David Sibley's laboratory for sharing reagents and useful discussions, Loren L. Looger (Howard Hughes Institute, Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA) for advise on the use of GECIs's, Vern Carruthers for the PV expression vector, and Thayer King and Beejan Asady for technical assistance.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at Univ de Sao Paulo-USP on October 9, 2015

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LBP performed and designed the experiments in Figures 1-4. He also contributed to the writing of the paper and interpretation of the data. AB performed and designed the experiment shown in Fig 7, performed the experiments used for the statistical analysis presented in Figs. 4C and 8B. He constructed the PV-expressing plasmid for visualization of Calcium in the PV. He also contributed to the writing of the paper and interpretation of the data. CAMcK designed and performed the analysis of motility presented in Figure 9. She also contributed to the writing of the paper and interpretation of the data. CAMcK designed the model presented in Figure 10 and contributed to writing of the paper and interpretation of the data. SAV performed the motility assays presented in Figure 9. He also contributed to the analysis and interpretation of the motility data. MAHT performed the Fura2-AM experiments shown in Figs 3C and 7F. She also helped with the writing and interpretation of the data. JL constructed the plasmid used for expression of GCAMP3 and performed initial experiments on the characterization of results. DAP contributed to the design of some experiments and the initial isolation and characterization of the GCAMP3 expressing parasites. SNJM is the principal investigator who managed the project.

References

- Bootman, M. D., and Berridge, M. J. (1995) The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83, 675-678
- 2. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517-529
- 3. Case, R. M., Eisner, D., Gurney, A., Jones, O., Muallem, S., and Verkhratsky, A. (2007) Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Cal.* **42**, 345-350
- 4. Clapham, D. E. (2007) Calcium signaling. Cell 131, 1047-1058
- 5. Black, M. W., and Boothroyd, J. C. (2000) Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol*. *Mol. Biol. R.: MMBR* 64, 607-623
- Pace, D. A., McKnight, C. A., Liu, J., Jimenez, V., and Moreno, S. N. (2014) Calcium entry in Toxoplasma gondii and its enhancing effect of invasion-linked traits. J. Biol. Chem. 289, 19637-19647
- 7. Lovett, J. L., and Sibley, L. D. (2003) Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *J. Cell Sci.* **116**, 3009-3016
- 8. Del Carmen, M. G., Mondragon, M., Gonzalez, S., and Mondragon, R. (2009) Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* **11**, 967-982
- 9. Carruthers, V. B., Moreno, S. N., and Sibley, L. D. (1999) Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular [Ca2+] and stimulate microneme discharge in Toxoplasma gondii. *Biochem J.* **342** (**Pt 2**), 379-386
- 10. Carruthers, V. B., and Sibley, L. D. (1999) Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in Toxoplasma gondii. *Mol. Microbiol.* **31**, 421-428
- 11. Lovett, J. L., Marchesini, N., Moreno, S. N., and Sibley, L. D. (2002) *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J. Biol. Chem.* **277**, 25870-25876
- 12. Vieira, M. C., and Moreno, S. N. (2000) Mobilization of intracellular calcium upon attachment of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to human fibroblasts is required for invasion. *Mol. Biochem. Parasit.* **106**, 157-162
- Garrison, E., Treeck, M., Ehret, E., Butz, H., Garbuz, T., Oswald, B. P., Settles, M., Boothroyd, J., and Arrizabalaga, G. (2012) A forward genetic screen reveals that calcium-dependent protein kinase 3 regulates egress in Toxoplasma. *PLoS Path.* 8, e1003049
- 14. Tian, L., Hires, S. A., and Looger, L. L. (2012) Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. *Cold Spring Harbor protocols* **2012**, 647-656
- 15. Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y. F., Nakano, M., Abdelfattah, A. S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., and Campbell, R. E. (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca(2)(+) indicators. *Science* 333, 1888-1891
- 16. Miranda, K., Pace, D. A., Cintron, R., Rodrigues, J. C., Fang, J., Smith, A., Rohloff, P., Coelho, E., de Haas, F., de Souza, W., Coppens, I., Sibley, L. D., and Moreno, S. N. (2010) Characterization of a novel organelle in Toxoplasma gondii with similar composition and function to the plant vacuole. *Mol. Microbiol.* **76**, 1358-1375
- 17. Tian, L., Hires, S. A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., Chalasani, S. H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S. A., Schreiter, E. R., Bargmann, C. I., Jayaraman, V., Svoboda, K., and Looger, L. L. (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Meth.* 6, 875-881
- Striepen, B., He, C. Y., Matrajt, M., Soldati, D., and Roos, D. S. (1998) Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in Toxoplasma gondii. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92, 325-338

- 19. Kafsack, B. F., Pena, J. D., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J. C., and Carruthers, V. B. (2009) Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* **323**, 530-533
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth.* 9, 676-682
- 21. Endo, T., Sethi, K. K., and Piekarski, G. (1982) *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp. Parasitol.* **53**, 179-188
- 22. Stommel, E. W., Ely, K. H., Schwartzman, J. D., and Kasper, L. H. (1997) *Toxoplasma gondii*: dithiol-induced Ca²⁺ flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* **87**, 88-97
- Black, M. W., Arrizabalaga, G., and Boothroyd, J. C. (2000) Ionophore-resistant mutants of Toxoplasma gondii reveal host cell permeabilization as an early event in egress. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9399-9408
- 24. Moudy, R., Manning, T. J., and Beckers, C. J. (2001) The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 276, 41492-41501
- 25. Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., and Dawson, A. P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2466-2470
- 26. Bird, G. S., DeHaven, W. I., Smyth, J. T., and Putney, J. W., Jr. (2008) Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods* 46, 204-212
- 27. Putney, J. W. (2009) Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol. Rev.* 231, 10-22
- Vercesi, A. E., Moreno, S. N., Bernardes, C. F., Meinicke, A. R., Fernandes, E. C., and Docampo, R. (1993) Thapsigargin causes Ca²⁺ release and collapse of the membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria in situ and of isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 268, 8564-8568
- Tsukamoto, A., and Kaneko, Y. (1993) Thapsigargin, a Ca(2+)-ATPase inhibitor, depletes the intracellular Ca²⁺ pool and induces apoptosis in human hepatoma cells. *Cell. Biol. Int.* 17, 969-970
- Silverman, J. A., Qi, H., Riehl, A., Beckers, C., Nakaar, V., and Joiner, K. A. (1998) Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *J. Biol. Chem.* 273, 12352-12359
- Leybaert, L., and Sanderson, M. J. (2012) Intercellular Ca(2+) waves: mechanisms and function. *Physiol. Rev.* 92, 1359-1392
- 32. Lukyanenko, V., and Gyorke, S. (1999) Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ waves in saponin-permeabilized rat ventricular myocytes. J. Physiol. **521 Pt 3**, 575-585
- 33. Choi, S., Rho, S. H., Jung, S. Y., Kim, S. C., Park, C. S., and Nah, S. Y. (2001) A novel activation of Ca(2+)-activated Cl(-) channel in *Xenopus* oocytes by Ginseng saponins: evidence for the involvement of phospholipase C and intracellular Ca(2+) mobilization. *Br. J. Pharmacol.* 132, 641-648
- 34. Schwab, J. C., Beckers, C. J., and Joiner, K. A. (1994) The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 509-513

- Wetzel, D. M., Chen, L. A., Ruiz, F. A., Moreno, S. N., and Sibley, L. D. (2004) Calciummediated protein secretion potentiates motility in Toxoplasma gondii. J. Cell Sci. 117, 5739-5748
- 36. Pernas, L., Adomako-Ankomah, Y., Shastri, A. J., Ewald, S. E., Treeck, M., Boyle, J. P., and Boothroyd, J. C. (2014) *Toxoplasma* effector MAF1 mediates recruitment of host mitochondria and impacts the host response. *PLoS Biol.* **12**, e1001845
- 37. Tinel, H., Cancela, J. M., Mogami, H., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V., and Petersen, O. H. (1999) Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. *EMBO J.* 18, 4999-5008
- 38. Billups, B., and Forsythe, I. D. (2002) Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J. Neurosci.* **22**, 5840-5847
- 39. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012) Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 13, 566-578
- 40. Moreno, S. N., and Zhong, L. (1996) Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem. J.* **313 (Pt 2)**, 655-659
- 41. Passos, A. P., and Garcia, C. R. (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
- 42. Alves, E., Bartlett, P. J., Garcia, C. R., and Thomas, A. P. (2011) Melatonin and IP3-induced Ca2+ release from intracellular stores in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* within infected red blood cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 5905-5912
- 43. Chini, E. N., Nagamune, K., Wetzel, D. M., and Sibley, L. D. (2005) Evidence that the cADPR signalling pathway controls calcium-mediated microneme secretion in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. J.* **389**, 269-277
- 44. Fang, J., Marchesini, N., and Moreno, S. N. (2006) A *Toxoplasma gondii* phosphoinositide phospholipase C (TgPI-PLC) with high affinity for phosphatidylinositol. *Biochem. J.* **394**, 417-425
- 45. Moreno, S. N., Zhong, L., Lu, H. G., Souza, W. D., and Benchimol, M. (1998) Vacuolar-type H+-ATPase regulates cytoplasmic pH in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem. J.* 330 (Pt 2), 853-860
- 46. Mondragon, R., and Frixione, E. (1996) Ca(2+)-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma* gondii tachyzoites. J. Euk. Microbiol. 43, 120-127
- 47. Mondragon, R., Meza, I., and Frixione, E. (1994) Divalent cation and ATP dependent motility of Toxoplasma gondii tachyzoites after mild treatment with trypsin. *J. Euk. Microbiol.* **41**, 330-337
- 48. Nagamune, K., Beatty, W. L., and Sibley, L. D. (2007) Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Euk. Cell* **6**, 2147-2156

FOOTNOTES

[#] These authors contributed equally

³Present address: Departmento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁴Present address: Departamento de Biofisica, UNIFESP, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

⁵Present address: College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

⁶ Present address: Departmento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brasil

⁷Present address: California State University, Long Beach, CA 90840

*Funding for this work was provided by the U.S. National Institutes of Health (grants AI-110027 and AI-096836 to SNJM). LBP was supported by a fellowship from FAPESP, Brasil during his stay at UGA. AB was supported by a research fellowship from CNPq (Ciência sem Fronteiras) (project 243462/2012-3). DAP and CAMc were also partially supported by NIH training grant AI060546 to the Center for Tropical and Emerging Global Diseases.

[#]To whom correspondence should be addressed: Silvia N.J. Moreno, Department of Cellular Biology and Center for Tropical and Emerging Global Disease, 350B Paul D. Coverdell Center, University of Georgia, Athens, GA 30602. Tel.: 706-542-4736; Fax: 706-542-9493; E-mail: <u>smoreno@uga.edu</u>

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Ionomycin stimulates parasite Ca^{2+} increase and egress in the presence and absence of extracellular Ca^{2+} . Egress of *GCaMP3*-expressing tachyzoites from *R-GECO*-expressing HeLa cells in medium with or without extracellular Ca^{2+} . *A*, time frames show increases in intracellular Ca^{2+} in both tachyzoites (green) and host cells (red) upon addition of 1 µM ionomycin (frame 2). Once tachyzoites egressed R-GECO fluorescence decreases due to cell permeabilization (frame 4). Frames were obtained from Video S1 at the indicated times. B. Similar experiment to the one shown in (A); cells were incubated in Ringer buffer without CaCl₂ and supplemented with 1 mM EGTA. Addition of ionomycin is able to increase Ca^{2+} in both parasites (green) and host cells (red) (frame 2) and induce parasite egress (frames 3 and 4). Images were taken from a video not shown. C, changes in GCaMP3 (green) and R-GECO (red) fluorescence over time in medium with $(+ Ca^{2+})$ or without $(- Ca^{2+})$ extracellular Ca²⁺. Ionomycin (IO) was added at 2 min (arrow) leading to abrupt increases in both parasites (green) and host cells (red) intracellular Ca²⁺, even in the absence of extracellular Ca^{2+} , but was more sustained and faster in the presence of extracellular Ca^{2+} . Fluorescence change of a ROI from Video S1 (plus Ca^{2+}) and not shown (no Ca^{2+}) was done using image J. D, quantification and statistical analysis a minimum of 3 independent experiments of stimulation of egress with 1 µM ionomycin (IO) in the presence of Ringer buffer with 2 mM Ca²⁺ (*blue bar*) versus the same buffer with 1 mM EGTA (*red bar*). IO was added 1 min after the start of video recording. The time recorded is the time that parasites started to exit and lysed the PV. HeLa cell growth was the same as for the other egress experiments: grown to confluence, around 24 hrs. E, Fluorescence recording of non infected host cells showing increase of Geco fluorescence in response to the addition of IO. The numbers indicate the fluorescence of the cells labeled in A.

FIGURE 2. Pharmacological increase of intracellular Ca^{2+} with thapsigargin (TG) is unable to trigger tachyzoite egress. *A*, Lack of egress of *GCaMP3*-expressing tachyzoites from *R-GECO*-expressing HeLa cells after addition of 1 µM thapsigargin (*frame 2*). TG increases host cell (*red*) and parasite (*green*) cytosolic Ca^{2+} but the parasites do not egress. Frames were taken from Video S2 at the times indicated in the top right corner. *B*, Changes in GCaMP3 (*green*) and R-GECO (*red*) fluorescence in one group of parasites (P1) and three HeLa cells (H1, H2, and H3) upon addition of thapsigargin (*arrow*). Ringer buffer was used containing 2 mM CaCl₂. More experimental conditions are indicated in Experimental Procedures. Fluorescence graph represents the changes in host cells and the PV fluorescence. Analysis was done with image J. *C*, Cytosolic Ca²⁺ changes of Fura-2/AM loaded tachyzoites upon addition of TG and ionomycin (IO), both at 1 µM. The effect of IO is noticeable larger than the effect of TG. This is a representative tracing out of at least three identical experiments.

FIGURE 3. **Dithiotreitol (DTT) increases intracellular Ca²⁺ and tachyzoite egress.** *GCaMP3*-expressing tachyzoites egress from HeLa cells upon addition of DTT. *A*, frames from Video S3 at four different times after adding 5 mM DTT. The first frame shows cells before addition of DTT. Each frame was taken at the time indicated in the figure. Addition of 5 mM DTT increases tachyzoites intracellular Ca²⁺ (*arrows* show increase in *green* fluorescence). Tachyzoites egress and this is followed by an increase in Ca²⁺ in the host cell (*cell a*). Cells *b* and *c* (uninfected) show a late increase in intracellular Ca²⁺. Frames were taken from Video S3 at the times indicated in the lower right corner. *B*, Graph shows the increase in Ca²⁺ in the two PVs with tachyzoites (*green tracings e* and *d*, which correspond to the areas indicated with *arrows* in frames *1-4*), in an infected cell expressing *R-GECO* (*a*) and in uninfected cells (*b* and *c*) after addition of DTT (*arrow*). Two peaks of Ca²⁺ increase are recorded in *GCaMP3*-expressing tachyzoites (*d*), the second being accompanied by Ca²⁺ increase also in the *R-GECO*-expressing host cell (*a*). Fluorescence graph represents the changes in host cells and the PV fluorescence. Analysis was done with image J. *C*, *T. gondii* tachyzoites were loaded with the arrow for both

experiments (*blue and red tracings*). The experiment shown by the red trace was done in Ringer buffer without Ca^{2+} and with 100 μ M EGTA from the beginning and 1 mM Ca^{2+} was added at 1000 sec. The experiment shown by the blue trace was performed in Ringer buffer with 2 mM Ca^{2+} from the beginning. In both cases 1 μ M thapsigargin (TG) was added at 750 sec. This is representative from at least three experiments showing the lack of effect of 5 mM DTT in *T. gondii* intracellular Ca^{2+} . *D*, Confluent HeLa cells were transfected with a plasmid containing the R-GECO Ca^{2+} indicator gene and monolayers were stimulated with 5 mM DTT. The fluorescence was recorded at each one of the indicated positions (1-4). *Right panel* shows fluorescence changes at the areas of interest indicated in the image.

FIGURE 4. Saponin increases intracellular Ca^{2+} oscillations and tachyzoite egress. *GCaMP3*-expressing tachyzoites egress from *R-GECO*-expressing HeLa cells upon saponin addition. *A*, Saponin (0.01%) addition resulted in Ca²⁺ oscillations in the host cell (*red*) and in the parasite (*green*). Ca²⁺ oscillations in the parasite led to egress and rupture of the PV and the host cell (*frame 6*). Frames were taken from Video S4 at the points indicated in *B* (*black arrows*). *B*, Graph showing GCaMP3 (*green*) and R-GECO (*red*) fluorescence changes after addition of saponin. The numbers indicated are the times at which the frame was taken. Graph was obtained using Image J. *C*, Quantification and statistical analysis of a minimum of three experiments of egress events in the presence of an extracellular buffer with (+Ca²⁺) and without Ca²⁺ (-Ca²⁺). There is an increase in the percentage of parasites that experience oscillations (*green bars*) and spikes (*purple bars*) in cytosolic Ca²⁺ and subsequently egress in the presence of Ca²⁺ (+ Ca²⁺). Red bars represent the parasites that oscillate and do not egress. There is a larger percentage of parasites which do not egress in the absence of Ca²⁺ (*blue*). Bars are means \pm SEM. Results are from three independent experiments with at least 100 total parasites counted in the presence of each condition. * Student t test p < 0.05.

FIGURE 5. **Buffer composition and inhibitors of Ca^{2+} entry affect tachyzoite egress.** Frames from videos obtained during egress of *GCaMP6f*-expressing tachyzoites from infected HeLa cells. Saponin (0.01%) was added 1 min after video recording started under different conditions. *A*, Extracellular buffer (EB) plus 2 mM Ca^{2+} . Frames taken from a video not shown. *B*, Extracellular buffer plus 1 mM EGTA. Frames taken from a video not shown. *C*, Intracellular buffer plus 1 mM Ca^{2+} . Frames taken from Video S5A. *D*, Intracellular buffer plus 90 nM Ca^{2+} . Frames taken from Video S5B. These are representative videos of at least three independent biological experiments. *E*, Extracellular buffer plus 1 mM Ca^{2+} in the presence of 10 μ M nifedipine. Frames taken from a video not shown. The graphs in the *right* panels show Ca^{2+} changes associated with tachyzoites present in separate parasitophorous vacuoles. Each tracing in each graph represent the fluorescence change of one PV obtained with image J.

FIGURE 6. Quantification and statistical analysis of egress events. Egress experiments performed as for Fig 5 were quantified by counting the number of PVs that fully egressed from host cells within 30 min. *Red bars* show the quantification of three independent experiments in intracellular buffer conditions (IB, described in Experimental Procedures) with and without 1 mM Ca²⁺. Blue bars show quantifications of three independent experiments in Ringer buffer with and without Ca^{2+} . + Ca^{2+}/Nif shows the data for egress in the presence of 10 μ M nifedipine in the presence of Ca^{2+} . Bars are means \pm SEM. Results are from three independent experiments with at least 20 total PVs counted for each condition. Asterisks indicate p<0.05.

FIGURE 7. Histamine increases intracellular Ca^{2+} in host cells, parasitophorous vacuole (PV), and tachyzoites, without egress. Changes in intracellular Ca^{2+} in tachyzoites expressing cytosolic *GCaMP3* and parasitophorous vacuole-targeted *R-GECO* in *B-GECO*-expressing HeLa cells. *A*, Stimulation of an IP₃ signaling pathway in HeLa cells with histamine (*frame 2*) led to host cytosolic Ca^{2+} increase (*blue, frames 3-4*), and immediate increase in Ca^{2+} in the PV (*red, arrowhead* in *frame 3*), followed by a cytosolic Ca^{2+} increase in tachyzoites (*green, arrowheads* in *frame 4*). Ca^{2+} increase in tachyzoites (*green*) appears to be a response to the

 Ca^{2+} increase in the PV. *B*, DIC merged with fluorescence of the same frames shown in *A*. *C* and *D*, Graphics show fluorescence changes at two different points (<u>1</u> and <u>2</u> in *B*, respectively). *Blue* indicates host cytosolic Ca^{2+} , *red* indicates PV Ca^{2+} fluctuations, and *green* indicates Ca^{2+} increase in the parasite cytosol. Frames were taken from Video S6. *E*, average histamine response in incubations of *B-GECO*-expressing HeLa cells infected with *GCaAMP3*-expressing tachyzoites. Changes in Ca^{2+} in the host cell cytosol (*blue*), tachyzoite cytosol (*green*) and PV (*red*) after addition of histamine (*arrow*) are shown. At least three experiments were used to calculate the average response of 20 cells for each experiment. *F*, Fura-2/AM loaded tachyzoites show no response to 100 µM histamine. Histamine was added where indicated (*arrow*) and CaCl₂ was added at 400 sec (*arrow*). The green tracing show control cells without any previous addition and the *blue* tracing shows the response to Ca²⁺ after adding histamine. This experiment was repeated at least three times with similar results.

FIGURE 8. Extracellular calcium enhances invasion. *A*, A *GCaMP6f*-expressing tachyzoite is highlighted with an arrowhead before (*1-3*), during (*4-5*), and after (*6*) invasion. A Ca²⁺ peak (*2*) precedes the initiation of motility (*3*) and invasion (*4-5*). The arrow in *5* denotes the moving junction of the parasite during invasion. Ca²⁺ decreases and remains low after invasion (*6*). Frames were taken from Video S7. *B*, Quantification and statistical analysis of invasion events and Ca²⁺ peaks and oscillations. There is an increase in the percentage of parasites that experience a spike in cytosolic Ca²⁺ and subsequently invade host cells (hTERT) in the presence of extracellular Ca²⁺ (+ Ca²⁺, *green*). The percentage of parasites that oscillate and do not invade is higher in buffer without Ca²⁺ and with 1 mM EGTA (- Ca²⁺, *blue*). There is no difference in parasites that oscillate and eventually invade (*red*). There is a larger percentage of parasites which do not attach or invade in a buffer without Ca²⁺ and with 1 mM EGTA (*purple*). *C*, Quantification and statistical analysis of peak fluorescence values associated with invasion events. There is an increase in peak fluorescence of parasites that exhibit a spike in cytosolic Ca²⁺ and invade in the presence of extracellular Ca²⁺ (*green*). There is no difference in average peak fluorescence values calculated for both parasites that oscillate but do not invade (*blue*) and parasites that oscillate and eventually invade (*red*). Bars are means \pm SEM. Results are from three independent experiments with at least 100 total parasites counted under each condition. *Student t test *p* < 0.05.

FIGURE 9. Extracellular Ca^{2+} enhances motility. *A*, *GCaMP6f*-expressing tachyzoite (*arrow*) show stimulation of gliding after adding Ca^{2+} . Notice that parasites drift and oscillate but after addition of Ca^{2+} to the buffer (*from Video S8a*), fluorescence increases, parasites halt, attach and start gliding. Ca^{2+} was added at 3'39" after starting the video. *B*, *GCaMP6f*-expressing tachyzoite (*arrow*) show stimulation of motility after addition of thapsigargin (3'4") and Ca^{2+} (4'43") (*from Video S8b*). *C*, The relationship between average peak fluorescence and distance traveled by extracellular tachyzoites was plotted and showed significant correlation by Pearson correlation coefficient (r=0.7145). *D*, The relationship between average peak fluorescence and duration of motility was significant (Pearson correlation coefficient, r=0.6436). Each dot indicates a single parasite that was analyzed from at least 4 different videos.

FIGURE 10. Proposed model for the role of Ca^{2+} during egress. Ca^{2+} enters the PV and the parasite when cells are treated with different agents. Intracellular Ca^{2+} stores (IS) of the parasite release Ca^{2+} into the cytosol but no egress is triggered. However, this increase in Ca^{2+} could stimulate secretion of microneme proteins like PLP causing lysis of cell and Ca^{2+} influx from the extracellular media. Influx of Ca^{2+} leads to an activation of motility and egress. Parasites that egress seek other host cells to invade to continue with its lytic cycle. Ca^{2+} influx in extracellular parasites stimulates gliding motility and results in an increase of invasion events.



















Figure 7







