LUCAS BORGES PEREIRA

Caracterização da apirase do parasita *P. falciparum* e análise do papel do Ca^{2+} 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: Profª Drª Célia Regina da Silva Garcia

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

BORGES-PEREIRA, L. **Caracterização da apirase do parasita *P. falciparum* e análise do papel do Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} nestas células sem o uso de protocolos invasivos de marcação. Estes parasitas serão especialmente importantes no estudo das oscilações de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} GCaMP3 para estudar o papel deste íon no egresso do parasita. Nossos resultados demonstram que *T. gondii* possui o Ca^{2+} necessário para promover este processo, entretanto Ca^{2+} extracelular age como um fator intensificador neste passo essencial do ciclo lítico. A utilização de tampões em que os íons Na^+, K^+, Cl^- ou Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 yet, 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 Ca^{2+} dynamics in *P. falciparum* without invasive protocols. These parasites are particularly important in the study of Ca^{2+} 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 gondii* 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 Ca^{2+} indicator GCaMP3 to study the role of this ion in parasite egress. Our results show that *T. gondii* has the Ca^{2+} required to exit the cell. However, extracellular Ca^{2+} acts as an enhancer factor in this step of the lytic cycle. The absence of Na^+, K^+, Cl^- and Ca^{2+} 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.

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.).

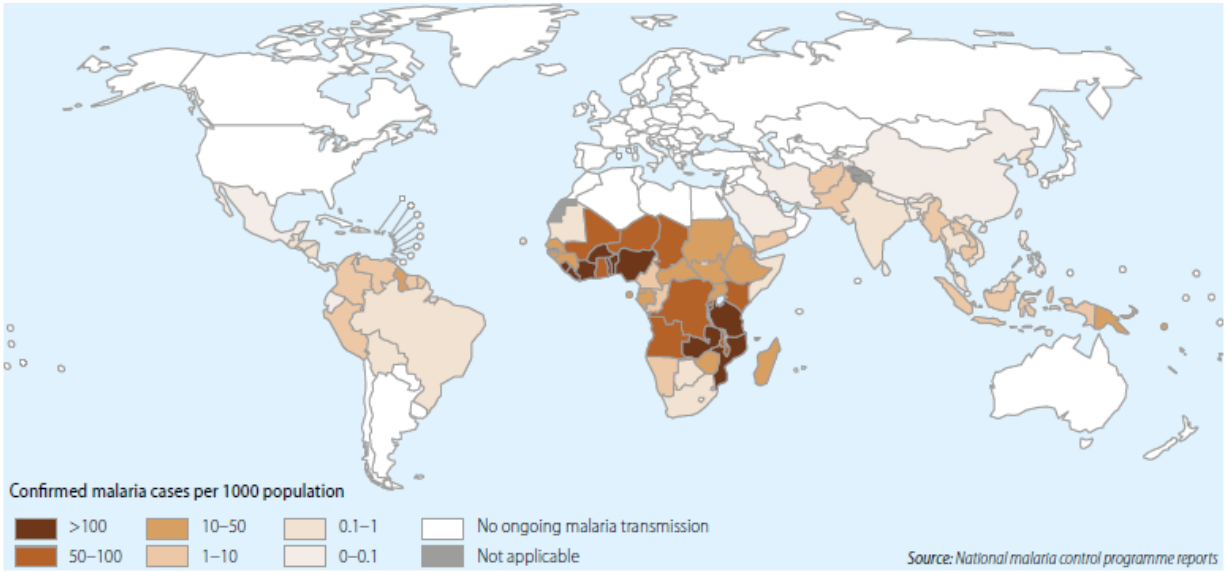

Figura 1: Distribuição mundial de casos de malária. Na figura são representadas as áreas de risco de transmissão da malária onde cerca de 40% da população vive sob o risco de contágio. Fonte: *World Malaria Report 2013, National malaria control programme report*

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).

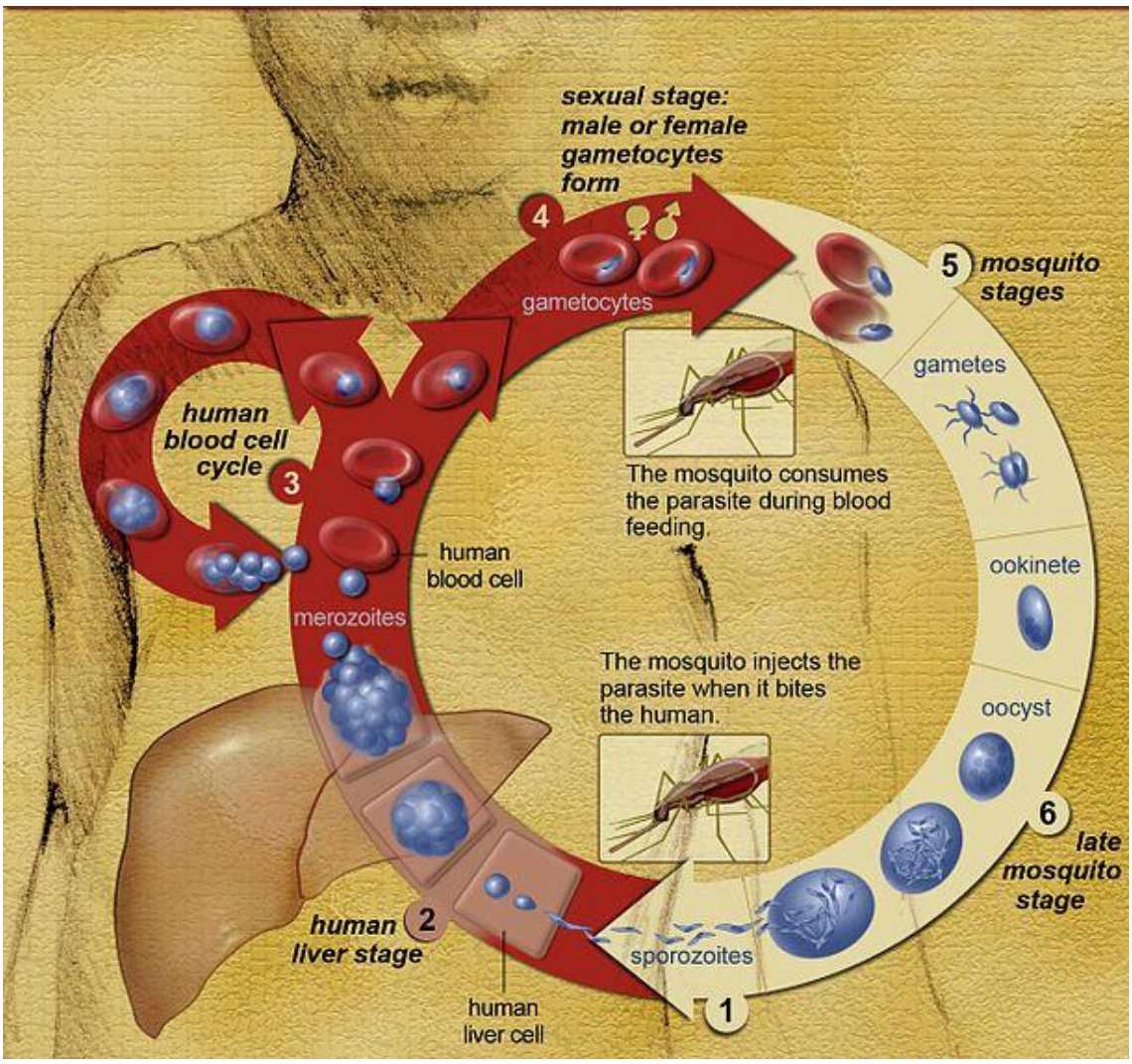

Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium sp.* Ciclo intraeritrocítico, hepático e no mosquito. Fonte: *National Institutes of Health (NIH).*

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). Estima-se 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).

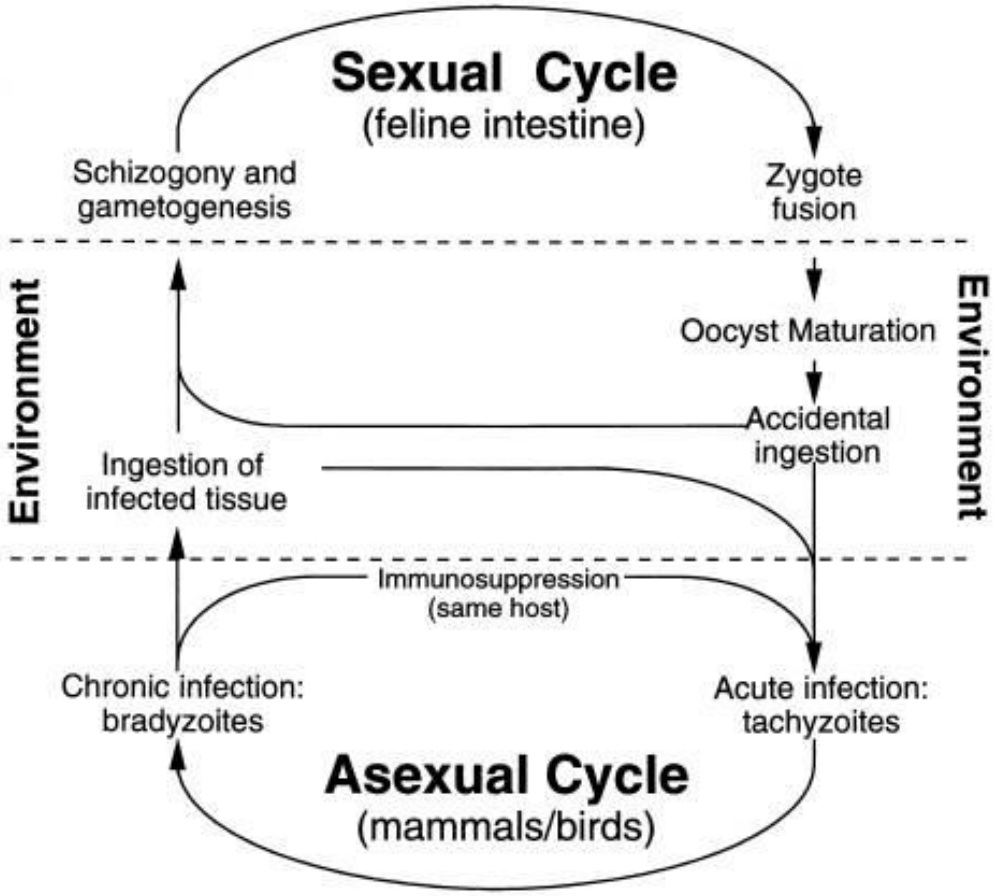

Figura 3: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Ciclo sexuado e assexuado, envolvendo os felinos como hospedeiros definitivos e mamíferos e aves como hospedeiros intermediários. Adaptado de Black e Boothroyd (2000).

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 (Ca^{2+} e Mg^{2+}) 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 apresentam 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 Ca^{2+} 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 pro-inflamatórias 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 Ca^{2+} em parasitas apicomplexas

Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, é mantida a níveis baixos (na ordem de 10^{-7}M) quando comparadas com a concentração de Ca^{2+} encontrada no meio extracelular (10^{-3}M). Diversos mecanismos contribuem para a baixa concentração no citoplasma, como transportadores, canais iônicos e proteínas que se ligam a Ca^{2+}. O conteúdo de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} channels*), pelo potencial através da membrana plasmática (*voltage-gated Ca^{2+} channels*) ou pelo conteúdo intracelular dos estoques de Ca^{2+} (*store-operated Ca^{2+} 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 Ca^{2+} channels* ainda não foram dectados em *Plasmodium* e *Toxoplasma gondii*. A liberação de Ca^{2+}

do retículo endoplasmático muitas vezes é seguida pela entrada de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} através da membrana em células eucarióticas é resultado da ação de trocadores Na^{2+}/ Ca^{2+} ou Ca^{2+} ATPases associadas a membrana plasmática (PMCA) (NAGAMUNE et al., 2008). Ate o momento não há evidências moleculares que demonstrem a presença de trocadores Na^{2+}/ Ca^{2+} 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 Ca^{2+} (NAGAMUNE et al., 2008).

Uma vez dentro da célula, Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+}, 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 Ca^{2+} *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 Ca^{2+} (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 Ca^{2+} /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 Ca^{2+} pode se ligar a proteínas ou então ser sequestrado no interior de organelas. O retículo endoplasmático (RE) é considerado um dos maiores estoques de Ca^{2+} na célula, podendo atingir concentrações locais na ordem de milimolar. Esta organela possui em sua estrutura vias independentes para influxo e efluxo de Ca^{2+}. Assim como em eucariotos superiores, em apicomplexas o influxo de Ca^{2+} para o interior do RE é catalisado por Ca^{2+}-ATPases denominadas SERCAs (*sarcoplasmatic/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase*), que utiliza a energia liberada pela hidrólise de 1 molécula de ATP no transporte de 2 moléculas de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} (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 Ca^{2+} do RE ocorre por meio de canais ativados por IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato) ou então por rianodina. Em *T. gondii* foi demonstrada a presença de estoques de Ca^{2+} sensíveis a rianodina e IP_3. Neste estudo os autores demonstraram que o uso de rianodina ou etanol (capaz de estimular a liberação de IP_3 em *T. gondii*) era capaz de ativar a secreção de micronemas através de mecanismos envolvendo a sinalização por Ca^{2+} (LOVETT et al., 2002). Liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares induzida por IP_3 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 Ca^{2+} no parasita via ativação de PLC e liberação de IP_3, demonstrando assim a presença de estoques sensíveis a IP_3 no parasita (ALVES et al., 2011). Entretanto, não há evidência de receptores de IP_3 e rianodina em parasitas apicomplexas, indicando que estes protozoários utilizam mecanismos diferentes (mas ainda responsivos a IP_3) na liberação de Ca^{2+} do RE (MORENO et al., 2011).

Mitocôndrias possuem uma alta capacidade de armazenar Ca^{2+} em seu interior, entretanto em condições fisiológicas seus níveis de Ca^{2+} se igualam aos níveis do citoplasma (MORENO; DOCAMPO, 2003). O influxo é resultado da ação de um carreador de Ca^{2+} que permite a entrada eletrogênica do cátion dirigida pelo gradiente eletroquímico gerado pela respiração ou hidrólise de ATP. A saída de Ca^{2+} desta organela, por sua vez, apresenta via distinta, em que há a troca de Ca^{2+} do lúmen da mitocôndria por Na^{2+} ou H^{+} extramitocondriais (NAGAMUNE et al., 2008). Experimentos em *Plasmodium berghei* utilizando digitonina para medir atividade mitocondrial demonstraram influxo de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} citosólico e mitocondrial em resposta a tapsigargina e ao hormônio melatonina, utilizando para isto indicadores de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} na membrana mitocondrial de apicomplexas semelhante aos encontrados em mitocôndrias de mamíferos.

Outro grande estoque de Ca^{2+} presente em parasitas apicomplexas é encontrado nos acidocalcisomas. Esta organela caracteriza-se por estocar Ca^{2+} 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, Ca^{2+} e magnésio (NAGAMUNE et al., 2008). Em *T. gondii* Ca^{2+} é bombeado para o interior desta organela pela ação de uma Ca^{2+}-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 NH_4Cl são capazes de liberar o conteúdo de Ca^{2+} no citoplasma via um trocador Ca^{2+}/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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} sensível a tapsigargina, ácido ciclopiazônico, bafilomicina A e NH_4Cl (BIAGINI et al., 2003).

Apesar do conteúdo de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} desta organela, o que reforça a ideia dos acidocalcisomas não estarem diretamente ligados na sinalização desencadeada por Ca^{2+} (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 Ca^{2+} no parasita desempenham um papel fundamental nestes processos (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004). Neste sentido verificou-se que *Plasmodium falciparum* utiliza-se de Ca^{2+} proveniente do eritrócito, como também de parte da maquinaria de sinalização de Ca^{2+} da célula hospedeira para promover seu próprio desenvolvimento (GAZARINI et al., 2003). Neste trabalho os parasitas invadiram eritrócitos na presença do indicador de Ca^{2+} Fluo-3 em sua forma ácida. Este procedimento permitiu a marcação seletiva do vacúolo parasitóforo (VP) com o indicador. A concentração de Ca^{2+} no interior do vacúolo foi determinada em

aproximadamente 40 µM, mostrando-se alta o suficiente para a manutenção dos mecanismos de sinalização de Ca^{2+} e desenvolvimento do parasita. Ainda neste estudo, a adição de ionomicina causou o decréscimo na fluorescência, fato este consistente com a maior concentração de Ca^{2+} 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 Ca^{2+}-ATPases provenientes da membrana do eritrócito, mas que agora bombeariam Ca^{2+} 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 Ca^{2+}, 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 Ca^{2+}. 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} proveniente de estoques intracelulares do parasita era suficiente para a invasão. Para isso lançaram mão de experimentos em que o Ca^{2+} 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 Ca^{2+} do citoplasma da célula hospedeira, como também do meio extracelular não afetava a invasão das células pelos parasitas, sugerindo que *Toxoplasma gondii* possui o Ca^{2+} necessário e suficiente para este processo (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004).

Em *Plasmodium falciparum* o papel do Ca^{2+} na invasão dos eritrócitos foi investigado usando diferentes técnicas (MCCALLUM-DEIGHTON; HOLDER, 1992). Neste trabalho foi demonstrado que o Ca^{2+} 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 Ca^{2+} presente no meio por magnésio, manganês ou zinco não foi capaz de restaurar a capacidade invasiva dos parasitas, sugerindo que este efeito é Ca^{2+} específico (MCCALLUM-DEIGHTON; HOLDER, 1992). Ainda em *P. falciparum* observou-se que PfPKB, uma proteína cinase dependente de Ca^{2+}, 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, Ca^{2+} 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 Ca^{2+} no egresso é evidente nos experimentos utilizando ionóforos de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} extracelular fosse quelado pelo uso de EGTA (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004; BLACK et al., 2000). Entretanto, Moudy et al. (2001) relataram que o Ca^{2+} 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 Ca^{2+} no parasita era efeito *downstream* a esta mudança na concentração de K^{+} e não necessitava de influxo de Ca^{2+} do meio extracelular (ARRIZABALAGA; BOOTHROYD, 2004; MOUDY et al., 2001).

Recentemente Borges-Pereira et al. (2015) demonstraram que Ca^{2+} é um importante fator na saída dos parasitas da célula hospedeira. Utilizando parasitas transgênicos expressando indicadores de Ca^{2+} 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, Ca^{2+} 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 Ca^{2+}-ATPases (SERCAs) responsáveis pela manutenção da homeostasia de Ca^{2+} nas células. Como resultado um influxo de Ca^{2+} é observado no parasita, levando a lise da célula hospedeira. Ao causar este influxo de Ca^{2+}, 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 Ca^{2+} na saída dos parasitas ainda não foi observada, entretanto, uma proteína cinase dependente de Ca^{2+} (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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} utilizado nestes processos, extracelular ou intracelular, ou mesmo as organelas que participam diretamente na liberação do Ca^{2+} necessário.

1.4 Indicadores de Ca^{2+} geneticamente codificados

Ca^{2+} 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 Ca^{2+} nestes processos, moléculas fluorescentes são usadas no mapeamento de sinais intracelulares de Ca^{2+} (WHITAKER, 2010).

Tradicionalmente medições de flutuações na concentração de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+}. Para conferir esta sensibilidade ao íon motivos de ligação a Ca^{2+} 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 Ca^{2+}. Deste modo, estes indicadores são formados de proteínas fluorescentes e motivos de ligação a Ca^{2+} 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 Ca^{2+} geneticamente codificados (*Genetically Encoded Calcium Indicators*-GECIs). O primeiro apresenta duas proteínas fluorescentes separadas e conectadas por um motivo de ligação a Ca^{2+}. 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 Ca^{2+} (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 Ca^{2+} intracelular (TIAN et al., 2009).

Uma das maiores restrições no uso de indicadores genéticos de Ca^{2+} é sua limitação ao uso de proteínas verdes baseadas em GFP. Esta limitação impede a mensuração da concentração de Ca^{2+} em diferentes compartimentos celulares ao mesmo tempo e restringe análises mais precisas sobre a dinâmica de Ca^{2+} na sinalização celular. Para solucionar este problema, Zhao et al. (2011) desenvolveram um novo grupo de marcadores de Ca^{2+} geneticamente codificados.

Estes indicadores baseiam-se na presença de calmodulina como domínio de ligação a Ca^{2+}, 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 Ca^{2+} intracelular em diferentes compartimentos celulares ao mesmo tempo (ZHAO et al., 2011).

O desenvolvimento de GECIs permitiu, além dos avanços na medição de Ca^{2+} 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 Ca^{2+} GCaMP3 foram criados permitindo a visualização da dinâmica de Ca^{2+} nestas células sem o uso de métodos invasivos com moléculas orgânicas (BORGES-PEREIRA et al., 2015; BORGES-PEREIRA et al., 2014).

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 Ca^{2+} GCaMP3 possibilitou a construção de uma linhagem estável de parasitas transgênicos (PfGCaMP3) que permitem o monitoramento da dinâmica de Ca^{2+} sem o uso de protocolos de marcação com moléculas orgânicas. A sinalização por Ca^{2+} é vital para o parasita, deste modo PfGCaMP3 poderá ser usado no *screening* de moléculas com atividade antimalárica capazes de interferir nesta via essencial.

Ca^{2+} 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 Ca^{2+} necessário para

promover estes eventos, entretanto Ca^{2+} extracelular age como um fator intensificador destes processos.

A ausência de Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} ou Ca^{2+} 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. J. Biol. Chem., v. 286, n. 7, p. 5905-5912, 2011.

ANAMIKA et al. A genomic perspective of protein kinases in Plasmodium falciparum. Proteins, 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. J. Biol. Chem., v. 270, n. 19, p. 11391-11397, 1995.

AURRECOECHEA, C. et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. Nucleic Acids Res., 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. Parasitol. Today, 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. J. Pineal. Res., 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. Arch Biochem. Biophys., 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. J. Biol. Chem., 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. Cell, 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. Parasitol. Res., 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. Ionophore-resistant mutants of Toxoplasma gondii reveal host cell permeabilization as an early event in egress. Mol. Cell Biol., v. 20, n. 24, p. 9399-9408, 2000.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of Toxoplasma gondii. Microbiol Mol. Biol. Rev., 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. J. Biol. Chem., 2015.

BORGES-PEREIRA, L. et al. The GCaMP3 - A GFP-based calcium sensor for imaging calcium dynamics in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. MethodsX, 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. Blood, v. 110, n. 4, p. 1225-1232, 2007.

BOUCHOT, A. et al. Tachyzoite calcium changes during cell invasion by Toxoplasma gondii. Parasitol. Res., 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. Neuroscience, 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. Pharmacol. Ther., v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BUDU, A.; GARCIA, C. R. Generation of second messengers in Plasmodium. Microbes Infect., 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. Biochem. J., v. 342 (Pt 2), p. 379-386, 1999.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in Toxoplasma gondii. Mol. Microbiol., 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. Br. J. Pharmacol., 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. Br. J. Pharmacol., 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. Microbes Infect., 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. FEMS Microbiol. Ver., 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. Acta Trop., v. 125, n. 1, p. 60-66, 2013.

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

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. Blood, 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. Mol. Microbiol., v. 26, n. 1, p. 163-173, 1997.

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

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J. Protozool., 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. J. Protozool., v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.

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

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

ECKSTEIN-LUDWIG, U. et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. Nature, 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. Anal. Biochem., 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. Exp. Parasitol., v. 53, n. 2, p. 179-188, 1982.

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

FIETTO, J. L. et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of Trypanosoma cruzi. Biochem. Biophys. Res. Commun., 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. J. Biol. Chem., 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. PLoS Comput. Biol., v. 7, n. 12, p. e1002320, 2011.

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

GACHET, C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 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. Int. Rev. Cell Mol. Biol., v. 266, p. 85-156, 2008.

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

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

GAZARINI, M. L.; GARCIA, C. R. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca2+ fluctuations. Biochem. Biophys. Res. Commun., 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. J. Cell Biol., 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. Antimicrob. Agents Chemother., v. 30, n. 5, p. 785-788, 1986.

GHERARDI, A.; SARCIRON, M. E. Molecules targeting the purine salvage pathway in Apicomplexan parasites. Trends Parasitol., 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. Parasitol. Today, v. 16, n. 5, p. 196-201, 2000.

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

HOFF, E. F.; CARRUTHERS, V. B. Is Toxoplasma egress the first step in invasion? Trends Parasitol., 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. Nat. Cell Biol., v. 2, n. 7, p. 466-468, 2000.

KAFSACK, B. F. et al. Synchronous invasion of host cells by Toxoplasma gondii. Mol. Biochem. Parasitol., 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. Clin. Infect. Dis., v. 52, n. 11, p. 1356-1362, 2011.

KATO, K. et al. Characterization of Plasmodium falciparum calcium-dependent protein kinase 4. Parasitol. Int., 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. Parasitology, v. 122 Pt 1, p. 15-23, 2001.

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

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J. Parasitol., 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 antigen-specific T cells requires extracellular ATP. J. Immunol., 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. Purinergic Signal., v. 6, n. 4, p. 365-372, 2010.

LEVANO-GARCIA, J. et al. Characterization of Schistosoma mansoni ATPDase2 gene, a novel apyrase family member. Biochemical and Biophysical Research Communications, 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. Br. J. Pharmacol., 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. Nature, v. 465, n. 7296, p. 359-362, 2010.

LOURIDO, S. et al. Distinct signalling pathways control Toxoplasma egress and host-cell invasion. EMBO J., 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. J. Biol. Chem., 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. J. Cell Sci., v. 116, n. Pt 14, p. 3009-3016, 2003.

LUKYANENKO, V.; GYORKE, S. Ca2+ sparks and Ca2+ waves in saponin-permeabilized rat ventricular myocytes. J. Physiol., 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. EMBO J., v. 20, n. 1-2, p. 55-64, 2001.

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

MANK, M.; GRIESBECK, O. Genetically encoded calcium indicators. Chem. Rev., 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. Br. J. Pharmacol., 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. Mol. Biochem. Parasitol., v. 50, n. 2, p. 317-323, 1992.

MCKENZIE, F. E.; BOSSERT, W. H. Multispecies Plasmodium infections of humans. J. Parasitol., 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. Dev. Biol., v. 358, n. 2, p. 309-317, 2011.

MCROBERT, L. et al. Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. PLoS Biol., 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. Essays Biochem., v. 51, p. 97-110, 2011.

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

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

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. Microbes Infect., 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. J. Biol. Chem., v. 276, n. 44, p. 41492-41501, 2001.

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

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

NAKAAR, V. et al. Basis for substrate specificity of the Toxoplasma gondii nucleoside triphosphate hydrolase. Mol. Biochem. Parasitol., 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. Am. J. Trop. Med. Hyg., 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. J. Biol. Chem., 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. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 245, n. 1, p. 155-160, 1998.

PAVETO, C. et al. The nitric oxide transduction pathway in Trypanosoma cruzi. J. Biol. Chem., 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. PLoS Biol., v. 12, n. 4, p. e1001845, 2014.

PEZZELLA-D'ALESSANDRO, N. et al. Calmodulin distribution and the actomyosin cytoskeleton in Toxoplasma gondii. J. Histochem. Cytochem., 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. Exp. Parasitol., 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). Cell Calcium, v. 51, n. 5, p. 351-382, 2012.

PRUDENCIO, M. et al. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. Nat. Rev. Microbiol., 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. Purinergic Signal., 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. Biochem. J., v. 349 Pt 3, p. 737-745, 2000.

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

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

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning : a laboratory manual. 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. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 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. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 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. PLoS Negl. Trop. Dis., 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. J. Immunol., 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. Cytometry A., v. 79, n. 11, p. 959-964, 2011.

SEEBER, F. et al. Cloning and functional expression of the calmodulin gene from Toxoplasma gondii. Mol. Biochem. Parasitol., 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. Exp. Parasitol., 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. J. Biol. Chem., 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. Exp. Parasitol., 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. Nat. Methods, v. 6, n. 12, p. 875-881, 2009.

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

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

UYEMURA, S. A. et al. Oxidative phosphorylation, Ca(2+) transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. J. Biol. Chem., 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 THG-sensitive Ca2+ pool. Cell Calcium, 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. PLoS Negl. Trop. Dis., v. 8, n. 11, p. e3309, 2014.

WHITAKER, M. Genetically encoded probes for measurement of intracellular calcium. Methods Cell Biol., 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. Science, v. 333, n. 6051, p. 1888-1891, 2011.

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

ZIMMERMANN, H. et al. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signal., v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012.