

Atividade de heme oxigenase e captação *in vivo* de um análogo de heme (Zn-Protoporfirina IX) pelo parasita da malária *P. falciparum*

Alexandre Budu^{1,2}(PG), Robson Sartorello¹(PG), Piero Bagnaresi¹(PG), Carlos A. H. Fernandes⁴(PG), Paloma M. Sato¹(TC), Vânia B. Bueno³(PG), Marcos R. M. Fontes⁴(PQ), Pedro L. Oliveira⁵(PQ), Gabriela O. Paiva-Silva⁵(PQ), Simone V. Alves⁶(PG), Luis E. S. Netto⁶(PQ), Luiz H. Catalani³(PQ), Celia R. S. Garcia^{1*}(PQ)

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; ²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; ³Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo; ⁴Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu; ⁵Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro; ⁶Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. *cgarcia@usp.br

Palavras Chave: Heme Oxigenase, malária, captação, porfirina, confocal.

Introdução

A malária é uma doença parasitária que mata por volta de 2 milhões de pessoas anualmente¹. O complexo ciclo de vida do parasita passa por uma fase intreritrocítica, na qual há endocitose de hemoglobina como fonte de nutrientes. A hemina, produto resultante da digestão, é tóxica. O parasita pode polimerizar a porfirina em hemozoina ou, através de uma heme oxigenase (PfHO) recentemente identificada no genoma, poderia transformá-la em biliverdina, detoxificando-a. Os objetivos do trabalho foram analisar a atividade da PfHO recombinante, sua afinidade pelo substrato (hemina) e a captação de Zn-Protoporfirina IX, uma porfirina fluorescente, por *Plasmodium falciparum*.

Resultados e Discussão

A captação de Zn-Protoporfirina IX 10 μM acompanhada por microscopia confocal nos tempos de 10, 30, 60 e 120 min nos estágios de anel, trofozoito e esquizonte mostrou que a porfirina é identificada no citosol do parasita em todos os tempos no estágio de anel. No estágio de trofozoito a fluorescência, identificada no citosol após 10 minutos de incubação com o composto, localiza-se próxima à membrana após 30 minutos (Figura 1). No estágio de esquizonte a marcação ocorre próxima da membrana do parasita aos 10 minutos e só é identificada no citosol após 120 minutos de incubação. A captação máxima de porfirina nos estágios mais jovens de desenvolvimento do parasita coincide com o pico de metabolismo da hemina.

A PfHO recombinante (37 kDa) (Figura 2A) foi capaz de transformar hemina em biliverdina na presença de NADPH, P450 redutase, glicose-6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Figura 2B). A afinidade enzima-substrato teve um Kd calculado de $4 \pm 2 \mu\text{M}$ (Figura 3).

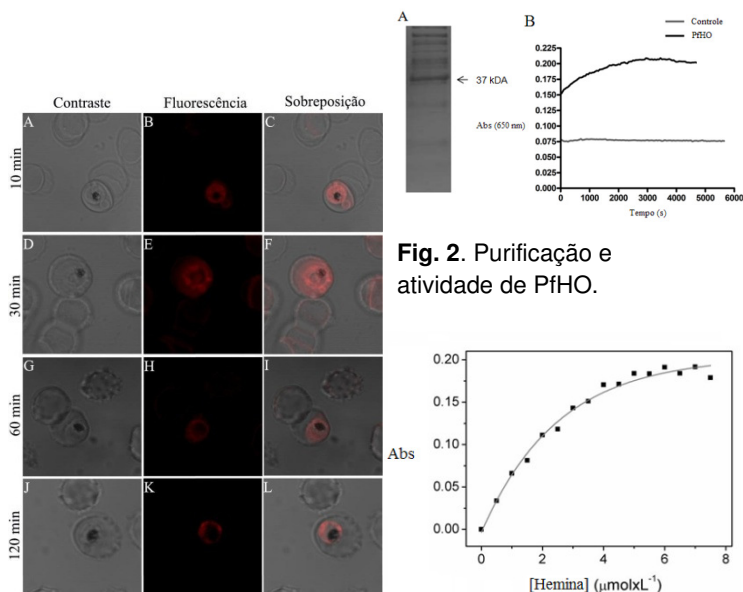


Fig 1. Captação de Zn-protoporfirina em trofozoito.

Fig. 2. Purificação e atividade de PfHO.

Fig. 3. Absorbância (438 nm) do complexo hemina/PfHO.

Conclusões

No presente trabalho, mostramos que uma porfirina fluorescente, Zn-Protoporfirina IX é captada pelo parasita da malária nos estágios de anel, trofozoito e esquizonte. Em adição mostramos que a PfHO recombinante é ativa e capaz de transformar hemina em biliverdina. Os resultados sugerem que a heme oxigenase é uma importante via, até pouco tempo não identificada, de detoxificação da hemina em *P. falciparum*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro. CRSG agradece ao INCT INBqMed e PLO ao INCT Entomologia Molecular.

¹Snow, R.W.; Guerra, C.A.; Noor, A.M.; Myint, H.Y.; e Hay, S.I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2005**, 434, 214-217.