

Desenvolvimento de um Método de *Screening High-throughput* de Antimaláricos Usando Indicador de Cálcio Geneticamente Codificado

Lucas Borges Pereira^{1,2*} (PG), Bruna Koresch¹ (IC), Célia R. S. Garcia^{1,2} (PQ)

*Lucas Borges Pereira email: lucasborges@usp.br

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, 05508-900- São Paulo, Brazil; ²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, 05508-900- São Paulo, Brazil;

Palavras Chave: *malaria*, *cálcio*, *Plasmodium falciparum*.

Abreviações: GECl- *Genetically Encoded Calcium Indicator*

Introdução

A malária é considerada problema de saúde pública em mais de 90 países, onde cerca de 2,4 bilhões de pessoas (40% da população mundial) convivem com o risco de contágio. Anualmente, sobretudo no continente africano, entre 300 a 500 milhões são infectados, dos quais cerca de um milhão morrem em consequência da doença¹.

Apesar da disponibilidade de diversas drogas antimaláricas, já foi relatado na literatura o surgimento de parasitas resistentes a todas as drogas atualmente disponíveis. Neste sentido o conhecimento acerca do mecanismo de sinalização que controla o ciclo celular deste parasita é de fundamental importância na geração de novas drogas antimaláricas.

Utilizando um indicador de cálcio geneticamente codificado (GECl) nós fomos capazes de monitorar a dinâmica de Ca^{2+} em *P. falciparum*, fornecendo a base para o desenvolvimento de um novo método de *screening* baseado na detecção das oscilações deste íon que ocorrem no citoplasma do parasita.

Resultados e Discussão

O rápido surgimento de parasitas resistentes às drogas atuais demonstra a urgência no desenvolvimento de novos antimaláricos e um método capaz de realizar a triagem de diversas compostos de maneira automatizada se torna uma poderosa ferramenta para este objetivo. O indicador de cálcio GCaMP3 baseia-se na proteína verde fluorescente GFP a qual é acoplada ao sítio de ligação de cálcio da calmodulina. A ligação de cálcio a este sítio altera o padrão de fluorescência da proteína, que poderá ser então mensurada por espectrofluorímetro. A transfecção estável de parasitas com o indicador de cálcio GCaMP3 (Fig. 1) nos tornará capazes de mensurar a resposta de Ca^{2+} no citoplasma do parasita frente ao uso do ionóforo de cálcio ionomicina em

espectrofluorímetro de placas. Utilizando esta nova ferramenta poderemos avaliar a ação de diversos compostos com potencial antimalárico em uma plataforma automatizada, fornecendo assim a base para o desenvolvimento de novas drogas.

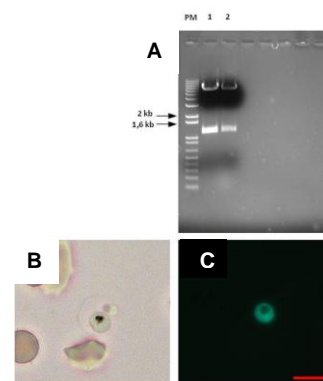


Figura 1: Construção de *P. falciparum* transfectados estávelmente com o indicador de cálcio GCaMP3. **A.** Confirmação da clonagem do indicador de cálcio GCaMP3 em vetor de expressão em *P. falciparum* pDC por ensaio de restrição enzimática com a enzima BamHI do DNA plasmidial de dois clones diferentes. Imagem de parasitas transfectados com a construção pDC/GCaMP3. **B.** Campo claro. **C.** Fluorescência coletada à 520 nm. Barra de escala = 5 um

Conclusões

A transfecção *P. falciparum* com GCaMP3 possibilitará o monitoramento da dinâmica de Ca^{2+} no parasita. Seu uso em métodos de *screening high-throughput* fornecerá uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de novos fármacos.

Agradecimentos

Agradecemos a FAPESP, Malaria CNPq-FAPESP Pronex, and INCT-INBqMed pelo financiamento à C.R.S.Garcia. e bolsas à L.B.P e B.K.

¹ Snow, R. J., Levine, M. S., Harper, D. L., McGill, S. L., Thomas, G., McNerney, J. P. *Nature*. **2005**, 434, 214-7