ELIANA FERNANDA GALINDO CUBILLOS

O PAPEL DE DOIS FATORES DE TRANSCRIÇÃO ApiAP2 NO CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO DE GENES VARIANTES EM *Plasmodium falciparum*

Dissertação 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 Mestre em Ciências

São Paulo
2015

ELIANA FERNANDA GALINDO CUBILLOS

O PAPEL DE DOIS FATORES DE TRANSCRIÇÃO ApiAP2 NO CONTROLE DA TRANSCRIÇÃO DE GENES VARIANTES EM *Plasmodium falciparum*

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Gerhard Wunderlich

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

Galindo Cubillos, Eliana Fernanda.
O papel de dois fatores de transcrição ApiAP2 no controle da transcrição de genes variantes em *Plasmodium falciparum* / Eliana Fernanda Galindo Cubillos. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Gerhard Wunderlich.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia molecular de *Plasmodium*.

Versão do título para o inglês: The role of two ApiAP2 transcription factor in the control of variant gene transcription in *Plasmodium falciparum*.

1. *Plasmodium falciparum* 2. Malária 3. ApiAP2 4. Fatores de transcrição 5. Genes variantes I. Wunderlich, Prof. Dr. Gerhard II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0193/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eliana Fernanda Galindo Cubillos.

Título da Dissertação: O papel de dois fatores de transcrição ApiAP2 no controle da transcrição de genes variantes em *Plasmodium falciparum*.

Orientador(a): Prof. Dr. Gerhard Wunderlich.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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. 05508-900 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8406
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **629/13** referente ao projeto intitulado: "*The role of ApiAP2 transcription factors in the control of variant gene transcription in Plasmodium falciparum*" sob a responsabilidade de **Eliana Fernanda Galindo Cubillos,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 29 de outubro de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Este trabajo está dedicado a Isabela, el mejor regalo que los enigmas de la genética nos pudo dar, un cromosoma a más solo sería viable si fuese para crear personas maravillosas como ella.

AGRADECIMENTOS

Ao Gerd, pela oportunidade, a paciência, as orientações e todo o aprendizado neste processo. Por estar aberto em qualquer momento para discutir algum resultado ou tirar uma dúvida e por sempre ouvir opiniões e ideias.

A mi familia, que a pesar de estar separada solo por barreras geográficas siempre encuentra la forma de estar unida. A mis padres por el regalo de la vida. A mis abuelos por el continuo apoyo, la educación, el ejemplo y el amor recibido siempre. A mi "Ti-ito", por ser el mejor ejemplo de padre, hijo, hermano, tio, nieto, profesor... el mejor ejemplo de persona! A ustedes tres les debo mis sueños, mi carrera y todo el camino andado. A mi "Ti-ita" por enseñarme a reír incluso en los peores momentos. Marce, por siempre tener las palabras oportunas para cada situación. A mis hermanos por darme el privilegio de ser tia de esas incansables criaturas. A mis primas por ser complices y amigas. A Margarita... para ella ni palabras tengo que puedan expresar mi gratitud. A todos... "digamos que los quiero mucho".

Aos colegas do laboratório. Ao Marius pelas clonagens dos vetores. Ao Wolf e a Gaby por nunca desistirem de me ensinar a falar correto (tipo Vovó e Vovô), pela amizade, o carinho e por sempre estar dispostos a me ajudar em qualquer situação. A Fer pelas dicas, recomendações, discussões e principalmente pela simpatia. E especialmente ao "Sr Wesley" pelas recomendações, pela ajuda sem interesse, por oferecer um pouco do seu tempo e até deixar do lado as ocupações próprias para explicar, tirar duvidas, discutir e ajudar, simplesmente pela curiosidade de saber como funcionam as coisas. Por sempre torcer pelos experimentos (e inclusive fazer junto), pelo ânimo nos momentos de dificuldade e principalmente pela amizade.

Ao pessoal dos Laboratorio dos professores Cláudio, Carsten, Alejandro e Daniel pela simpatia e colaboração.

A meus Amigos. Em um país onde você está sozinho e longe da família é muito bom achar pessoas que te fazem sentir em casa. Lari você é demais!

A Oscar por estar siempre dispuesto a ayudar en todo. Gracielas pelao!

A One un agradecimiento especial por la amistad sincera e incondicional, por siempre tener un tiempo para escucharme, ayudarme y aconsejarme, por la franqueza a la hora de hablar y por los consejos e incluso regaños despues de cada arrebato. Eres como esa voz de la conciencia que siempre nos hace caer en cuenta de nuestros errores.

A Aleja simplemente gracias.

Ao Pablo, por me corrigir o portunhol e fazer deste documento um texto razoável para português-falantes. Pelo apoio, as palhaçadas, as jantas (comida é importante) e por me ensinar o verdadeiro significado das palavras companheirismo, amizade, amor e a diferença entre "sono" e "sonho". A expressão "choque cultural" faz muito mais sentido do seu lado!

“de nada sirven los triunfos si la paz no los corona”

Antonio Nariño

RESUMO

Cubillos EG. O papel de dois fatores de transcrição ApiAP2 no controle da transcrição de genes variantes em *Plasmodium falciparum.* [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

O parasita *Plasmodium falciparum* causa a forma mais grave da malária humana e as pessoas mais vulneráveis são crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas. Para evadir a constante resposta imune do hospedeiro, as formas assexuadas do parasita usam a variação antigênica de genes associados à virulência ou podem se diferenciar em formas sexuais como estrategia para sobreviver e garantir a sua transmissão para o mosquito. A base molecular desses processos ainda é pouco compreendida e até agora apenas um fator de transcrição que pertence à família ApiAP2 descoberto recentemente foi associado à formação de gametócitos. Além disso, alguns fatores epigenéticos foram envolvidos no controle da variação antigénica e diferenciação sexual. No entanto, não se sabe como o parasita organiza estes fenómenos, ou os mecanismos que desencadeiam estes processos e quais outros fatores de transcrição podem estar envolvidos. Por manipulação genética, nos identificamos a participação fundamental de um fator de transcrição da família ApiAP2 (PF3D7_1143100), no controle da transcrição de genes variantes, bem como no desenvolvimento em formas sexuais na fase intraeritrocítica. Demonstramos ainda que outro membro desta família, PF3D7_1466400, não é essencial no ciclo assexual de *P. falciparum,* já que seu silenciamento não afetou o desenvolvimento normal do parasita.

Palavras-chave: Malaria. *P. falciparum*. Fatores de transcrição ApiAP2.

ABSTRACT

Cubillos EG. The role of ApiAP2 transcription factors in the control of variant gene transcription in *Plasmodium falciparum*. [Masters thesis (Biology of Host Pathogen Relationship)].University of São Paulo; 2015.

The protozoan parasite *Plasmodium falciparum* causes the most severe form of human malaria and the most vulnerable persons are children under the age of 5 years and pregnant women. To evade the constantly evolving host immune response to infection, asexual parasite forms employ antigenic variation of virulence-associated genes or differentiation to gametocytes as a means to survive and secure their transmission to the mosquito. The molecular basis behind these processes is still poorly understood and until now a transcription factor belonging to the recently discovered ApiAP2 family was associated to gametocyte formation. Also, an increasing number of epigenetic factors was involved in the control of antigenic variation and sexual differentiation, however, it is not known how the parasite orchestrates these phenomena and which other transcription factors are possibly involved. By genetic manipulation, we indentified the decisive participation of a putative ApiAP2 transcription factor, PF3D7_1143100, in the control of variant gene transcription as well as in the switching from asexual to sexual development in the intraerythrocytic stage. We also demonstrate that the ApiAP2 factor PF3D7_1466400 is not essential in the asexual stage of *P. falciparum*, since its knockdown did not affect the normal development of the parasite.

Keywords: Malaria. *P. falciparum*. ApiAP2 transcription factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países com transmissão de malária. 18

Figura 2. Número de casos de malária registrados anualmente (1961-2013) no Brasil de acordo com as espécies de *Plasmodium*. 19

Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium*..... 21

Figura 4. Antígenos exportados por *P. falciparum* à superfície da hemácia infectada.. .. 23

Figura 5. Estrutura das proteinas *var*iantes PfEMP1 25

Figura 6. Variação antigênica de PfEMP1. 26

Figura 7. Motivos de ligação de três fatores de transcrição ApiAP2 30

Figura 8. Mapa dos vetores usados para transfecção..... 39

Figura 9. Esquema do processo de recombinação após a transfecção e integração nas regiões homólogas do genoma do parasita. 42

Figura 10. Parasitas sincronizados nas três diferentes fases intraeritrocíticas. 48

Figura 11. NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS, NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS e NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 mostra formas integradas dos plasmídeos transfectados. 51

Figura 12. Expressão de proteínas quiméricas nas linhagens transgênicas. 52

Figura 13. Confirmação da integração em linhagens clonais de NF54::PF3D7_1466400_HA_LoxP e da expressão de proteínas com etiqueta de HA..... 54

Figura 14. Figura 12. Confirmação da integração em linhagens clonais de NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 e da expressão de proteínas com etiqueta de HA. 55

Figura 15. Confirmação da integração do plasmídeo no *locus* original nas linhagens NF54:PF3D7_1143100_HA_glmS_TK e NF54:PF3D7_1466400_HA_glmS_TK..... 57

Figura 16. Silenciamento do gene PF3D7_1143100 induzido pela auto-clivagem da ribozima glmS na presença de N-Acetil glucosamina. 59

Figura 17. Degradação da proteína PF3D7_1143100 modificada com o domínio desestabilizador..... 60

Figura 18. Diferenciação de parasitas na fase assexual em possíveis gametócitos após adição de N-Acetil glucosamina na linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS. 61

Figura 19. Diferenciação de parasitas na fase assexuada em possíveis gametócitos após retirada do Shield-1 na linhagem NF54::PF3D7_1143100 _GFP_HA _DD. 62

Figura 20. Efeito do silenciamento do gene PF3D7_1143100 ao longo de 72 horas. 63

Figura 21. Análise do efeito do silenciamento de PF3D7_1143100 na transcrição de genes associados às primeiras fases de formas sexuadas de *P. falciparum*. 65

Figura 22. Perfil de transcrição de genes *var* na linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS sem glucosamina e 72 horas após knockdown de PF3D7_1143100 induzido pela ribozima glmS na presença de glucosamina.. 67

Figura 23. Perfil de transcrição de genes *var* após knockdown transiente de PF3D7_1143100. 688

Figura 24. Efeito da N acetil glucosamina na transcrição do gene PF3D7_1466400 modificado.. 69

Figura 25. Efeito do silenciamento de PF3D7_1466400 no desenvolvimento de *P. falciparum*. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação por PCR de PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100......366

Table 2 Oligonucleotídeos para RT-PCR de genes associados ao desenvolvimento das primeiras fases de gametócitos.....64

Tabela 3. Desenvolvimento das linhagens construídas no início do projeto. 72

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

µL – microlitro

µg – micrograma

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros para o Controle e Prevenção de Doenças)

cDNA – ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar

DNA – ácido desoxirribonucleico

gDNA – DNA genômico

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

h – horas

M – molar

min – minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

ng – nanograma

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – pares de bases

PBS – salina em tampão fosfato

PCR – reação em cadeia de polimerase

pH – potencial hidrogênio

RNA – ácido ribonucleico

RT – transcrição reversa

RT-PCR – reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida por transcrição reversa

RPM- Rotações por minuto

s – segundos

Tris – Tris-hidroximetilaminometano (tampão)

%- Porcentagem

GFP- *Green fluorescence protein*

ApiAP2- *Apicomplexan apetala family 2*

CSA- C*hondroitin sulfate A*

Ct- *Treshold cycle*

DAPI- 4´, 6 diamidino-2-phenylindole

DD24- Dominio desestabilizador variante 24

EPCR- *Endothelial protein c receptor*

HA- Hemaglutinina

PfEMP1- *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein*

RPM1- Roswell Park Memorial Institute (meio de cultivo)

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TAE- tampão tris-acetato

TBE- tampão tris-borato

NaCl- cloreto de sódio

GlcN- N acetil glucosamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Malária: Aspectos gerais 17
1.2 Malária no Brasil 18
1.3 Malária: O parasita 19
1.4 Plasmodium falciparum 22
1.4.1 Genes variantes 24
1.4.2 Controle na transcrição de genes var 26
1.5 Fatores de transcrição ApiAP2 28
2 JUSTIFICATIVA 31
3 OBJETIVO 32
3.1 Objetivo geral 32
3.2 Objetivos específicos 32
4 MATERIAIS E MÉTODOS 33
4.1 Isolado de *P. falciparum* 33
4.2 Cultivo de *P. falciparum* 33
4.3 Extração de gDNA de *P. falciparum* 34
4.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR) 34
4.5 Purificação do produto de PCR 35
4.6 Ligação de DNA e transformação de bactérias 36
4.7 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep) 37
4.8 Sequênciamento 37
4.9 Extração de DNA plasmidial em grande escala (Maxiprep) 39
4.10 Transfecção em P. falciparum 40
4.11 Microscopia de fluorescência 422
4.12 Clonagem dos parasitas por diluição limitante 43
4.13 Western Blot 43
4.14 Seleção de fenótipos aderentes a células CHO-CD36 (Panning) 44
4.15 Cultivo de P. falciparum com Shield-1 44
4.16 Ensaio da retirada de Shield-1 45
4.17 Cultivo de *P. falciparum* com Ganciclovir 45
4.18 Cultivo de P. falciparum com N-Acetil glucosamina 45

4.19 Cálculo das parasitemias 46
4.20 Extração de RNA e transcrição reversa 46
4.21 Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real 46
4.22 Análises estatistica 47
5 RESULTADOS 48
5.1 Sincronização de *P. falciparum* 48
5.2 Transfecção em *P. falciparum* 48
5.3 Confirmações de integração dos plasmídeos 49
5.4 Linhagens clonais de parasitas transgênicos 52
5.5 Obtenção de parasitas integrados com os plasmídeos pHHApiAP2_glmS_TK 55
5.6 Elucidando o papel do fator de transcrição PF3D7_1143100 58
5.6.1 Avaliação do sistema glmS 58
5.6.2 Avaliação da expressão de PF3D7_1143100 com domínio desestabilizador 59
5.6.3 Fitness de P. falciparum após knockdown de PF3D7_1143100 induzido pela ribozima glmS e o domínio DD 24 60
5.6.4 O papel do fator de transcrição PF3D7_1143100 na transcrição de genes var 65
5.6.5 Ausência temporária de PF3D7_1143100 leva a reorganização da transrição de genes var ("reset") e apaga a memória epigenética 66
5.7 Elucidando o papel do fator de transcrição PF3D7_1466400 69
5.7.1 Avaliação do sistema glmS 69
5.7.2 Fitness de P. falciparum após knockdown induzido pela ribozima glmS 70
6 DISCUSSÃO 72
7 CONCLUSÕES 77
REFERÊNCIAS 78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: Aspectos gerais

A malária humana é causada por parasitas protozoários do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos naturalmente pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. Esta doença ainda causa um grande impacto sobre a saúde mundial, especialmente em países da África Subsaariana. Dados da organização mundial da saúde indicam que aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas, em 97 países e territórios, estão em risco de contraírem a doença e 1,2 bilhões em risco elevado (>1 caso de malária por 1000 habitantes todos os anos) (figura 1). Estima-se que a cada ano 300 milhões de pessoas são afetadas pela malária e mais de 600.000 morrem como consequência das complicações da doença, sendo mais vulneráveis crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas [1].

Aproximadamente 90% dos casos de malária registrados a cada ano se concentram na África Tropical, e os restantes estão distribuídos nas Américas Central e do Sul, Sudeste Asiático e Ilhas da Oceania. Já na América do Sul, o maior número de casos é verificado na Amazônia brasileira com registros de cerca de 300 a 400 mil pessoas infectadas por ano, o que representa 60% do total de casos da América Latina, correspondendo a 99,5% dos casos no território nacional [1].

A malária concentra-se principalmente em regiões de baixos níveis socioeconômicos, onde as comunidades mais gravemente afetadas são também as mais pobres e marginalizadas. Essas comunidades possuem risco mais elevado de infecção e o acesso a serviços de prevenção, diagnóstico e tratamento menos eficaz [1]. A doença é responsável por um atraso do desenvolvimento humano e apesar dos recentes esforços de países com áreas de transmissão e organizações internacionais, focados na eliminação do vetor e a redução do risco de adoecer e morrer de malária, ainda há milhões de pessoas que não têm acesso a essas intervenções. Também, a resistência e/ou fracasso do tratamento contra a droga mais eficaz, a artemisinina, já foi registrada em várias regiões de Camboja, República Democrática Popular Lao, Myanmar, Tailândia, Vietnã e Guiana Francesa [2].

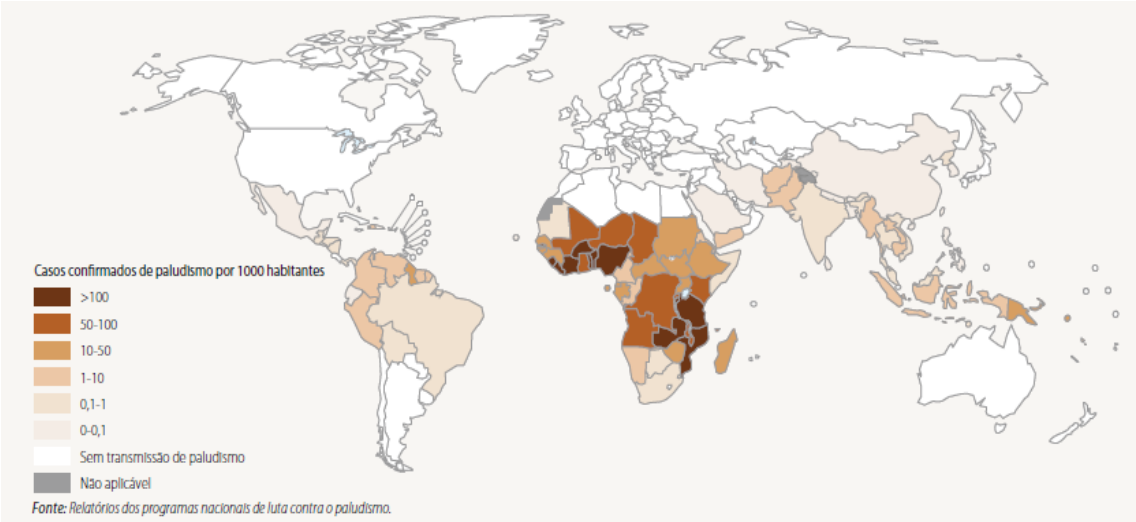


Figura 1. Países com transmissão de malária. Estima-se que a metade da população mundial esteja em risco de contrair a doença. A partir do ano 2000, o financiamento e a cobertura dos programas de luta contra a malária aumentaram consideravelmente o que levou a uma redução em larga escala de: incidência e mortalidade da doença. Fonte World Health Organization, 2014 [1].

1.2 Malária no Brasil

No final do século XIX, a malária esteve presente em todo o território brasileiro. Durante algum tempo a situação manteve-se inalterada, sem surtos epidêmicos, até dois movimentos migratórios importantes que ocorreram na Amazônia. Atraídos pela atividade da extração de látex e a construção da estrada Madeira Mamoré, um grande número de trabalhadores ficaram expostos à malária na região amazônica, resultando em uma intensa transmissão da doença que, consequentemente causou milhares de mortes. Nesta época foram estimados cerca de seis milhões de casos por ano (ou seja, 15% da população total do país), dos quais 80.000 vieram a óbito [4].

Depois de uma campanha de erradicação ser iniciada em 1956 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de casos diminuiu drasticamente fora da Amazônia brasileira e a doença atingiu o seu nível mais baixo no Brasil, com 36,9 mil casos em 1960. Foi só no final de 1970 e início de 1980 que a intensa, rápida e desorganizada ocupação da Amazônia causou outra mudança drástica e importante na situação epidemiológica associada à malária no país. Os estados da região Norte começaram a receber um grande número de migrantes em busca de projetos de colonização, recursos ambientais e ganhos econômicos. Esses migrantes vieram de áreas onde não existia a doença ou já havia sido eliminada. Mais uma vez, o resultado foi a exposição de um grande número de indivíduos não imunes ao *Plasmodium* [4].

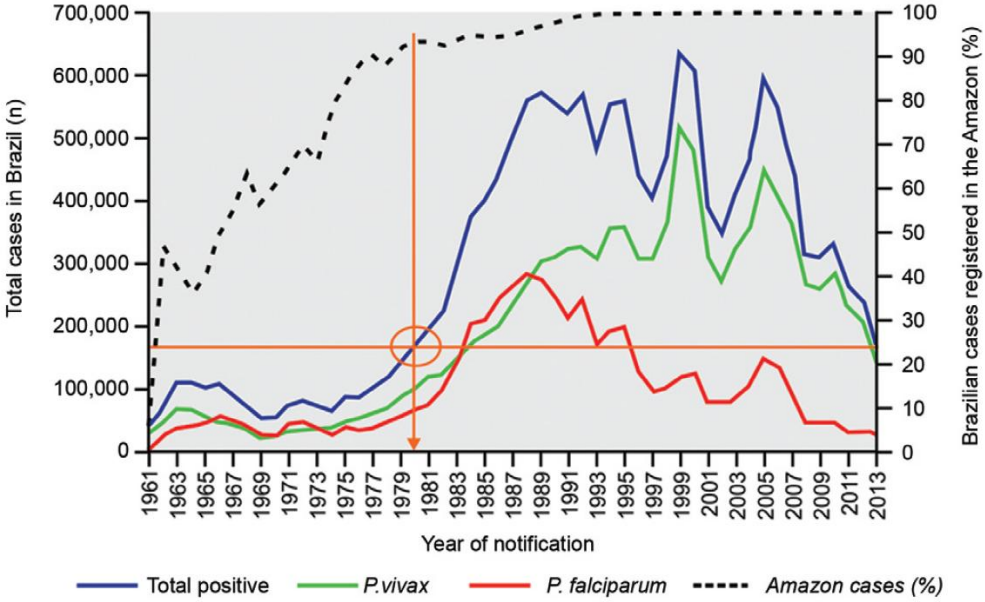


Figura 2. Número de casos de malária registrados anualmente (1961-2013) no Brasil de acordo com as espécies de *Plasmodium*. Fonte: Pina-Costa et al. [4].

Na figura 2 evidencia-se o número de casos de malária no Brasil desde 1961. Ao contrário dos baixos números relatados em meados dos anos 1970, o número total de casos de malária foi 615.246 no início do século XXI. Atualmente, a malária é endêmica em nove estados brasileiros: Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Maranhão. Pará e Amazonas registraram quase 70% dos casos em 2012; destes, 14,4% foram nas áreas urbanas, 25% em outras áreas de exploração de minérios e o restante em assentamentos rurais e áreas indígenas. Fora da Região Amazônica, houve 914 casos registrados em 2012, em diferentes estados brasileiros, principalmente em São Paulo (SP) (188), Rio de Janeiro (130), Minas Gerais (105), Goiás (82) e Piauí (72) [3].

1.3 Malária: O parasita

Os protozoários do gênero *Plasmodium* pertencem ao filo Apicomplexa. Este filo contém um grupo de parasitas unicelulares que são os agentes causadores de algumas das doenças infecciosas de maior relevância no mundo. Entre as características distintivas dos parasitas pertencentes a este filo encontra-se uma maquinaria especializada na região anterior do corpo para a invasão das células hospedeiras, denominada complexo apical. Também em alguns destes parasitas existe uma organela derivada da endosimbiose com uma alga

vermelha, conhecida como o apicoplasto onde ocorre principalmente a biossíntese de isoprenoides. Os parasitas humanos *Plasmodium spp*. e *Toxoplasma gondii* são os mais amplamente estudados por ser de grande impacto na saúde mundial [5].

Cinco são as espécies de *Plasmodium* capazes de infectar o homem e desencadear a doença: *P. vivax, P. malériae, P. ovale, P. knowlesi* e *P. falciparum.* As primeiras três são principalmente responsáveis pelas formas não complicadas da infecção, cujos sintomas caracterizam-se por sudorese, mal estar, vômitos, cefaleia, mialgia e febres altas intermitentes, enquanto que as infecções por *P. falciparum,* a espécie mais virulenta, podem evoluir para a forma mais complicada da doença conhecida como malária grave, que pode ocorrer em varias sintomatologias como malária cerebral e/ou gestacional, síndrome pulmonar e anemia grave, sendo esta evolução dependente da idade e da exposição do indivíduo ao parasita [3]. A infecção com *Plasmodium knowlesi* ocorre exclusivamente no sudeste asiático (Malásia) e pode ser considerada zoonose, sendo que o orangotango é o hospedeiro mais importante. A evolução da infecção com *P. knowlesi* muitas vezes é perigosa levando um número considerável de pessoas infectadas a óbito [73].

O ciclo de vida dos *Plasmodium* é complexo e alterna-se entre o hospedeiro definitivo (o mosquito vetor) onde ocorre a fase sexuada, e o hospedeiro intermediário (vertebrado) onde ocorre a fase assexuada.

No humano a infecção inicia-se com a picada de uma fêmea *Anopheles* infectada que injeta formas sexuadas do parasita chamadas esporozoítos junto com a saliva. Os esporozoitos migram até o fígado através da corrente sanguínea e infectam os hepatócitos onde se multiplicam assexuadamente formando esquizontes hepáticos (Figura 3). Após 6 a 14 dias são liberados merozoítos que começam a invadir hemácias (é de notar, que em *P. vivax* e *P. ovale* existe um estágio dormente denominado hipnozoíto que pode persistir no fígado e causar recaídas de infecções patentes semanas ou mesmo até meses mais tarde). Após essa replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica), ocorre a multiplicação assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica). Nessa fase o parasita passa pelos estados morfológicos de anéis, (as formas mais jovens observadas após a invasão dos merozoítos), trofozoítos e esquizontes. Estes últimos rompem a hemácia infectada liberando novos merozoítos que irão invadir outros eritrócitos não infectados. Além dos merozoítos as hemácias infectadas também liberam toxinas, dando início às diferentes manifestações clínicas da doença. Embora a grande maioria dos parasitas continua a ter uma replicação assexuada, eventualmente alguns esquizontes liberam merozoítos já destinados a se diferenciar em formas eritrocitárias sexuais

(gametócitos). Em *P. falciparum*, o comprometimento para formação de gametócitos é mediada ao menos pelo fator de transcrição ApiAP2-G [6].

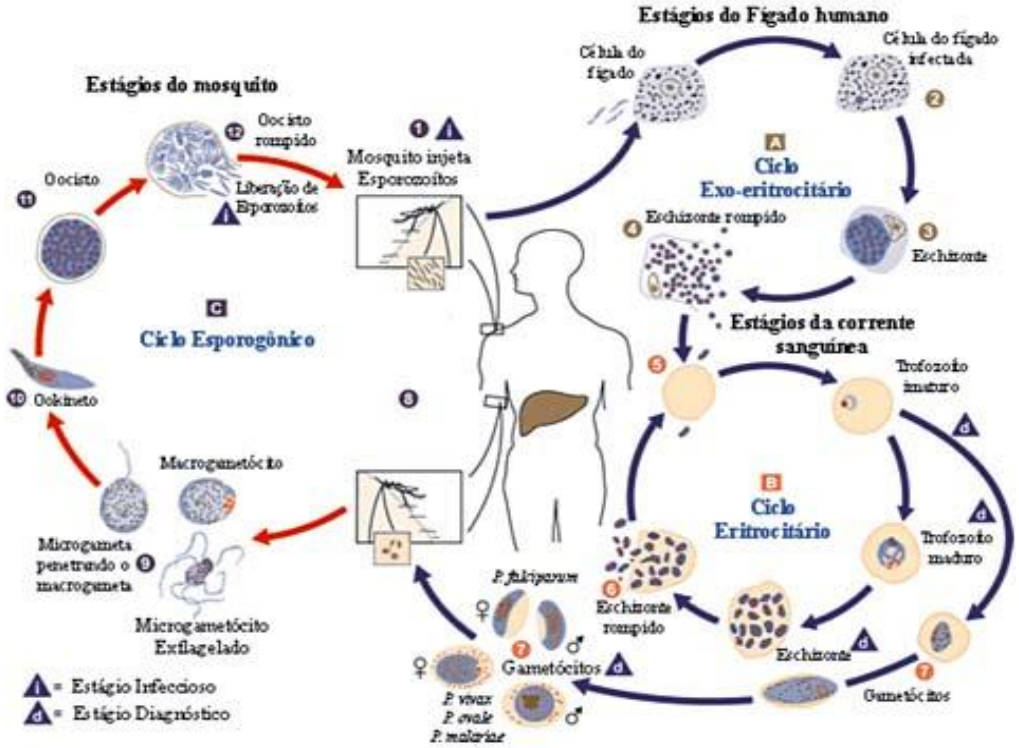


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium*. O ciclo de vida tem duas fases, uma assexuada no hospedeiro humano e uma sexuada que ocorre no vector *Anopheles spp*. Durante a alimentação sanguínea, a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoitos no hospedeiro humano (1). Os esporozoitos infectam as células do fígado (2). Formando esquizontes hepáticos (3). A ruptura dos hepatócitos leva a liberação dos merozoítos (4). Após a replicação no fígado, os parasitas sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos. Os merozoítos infectam as hemácias (5). O estágio de anel diferencia-se em trofozoito e esquizonte (6). Alguns parasitas diferenciam-se em gametócitos (7), os quais são ingeridos pelo mosquito (8). No mosquito a multiplicação é conhecida como ciclo esporogônio. No estomago do mosquito, ocorre a geração dos zigotos (9). Os oocinetos (10) invadem a parede do estômago, onde se desenvolvem em oocistos (11). No oocisto são produzidos os esporozoitos (12) os quais, após liberados, migram até a glândula salivar, e após o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, se dá a continuidade no ciclo do parasita. Fonte: CDC-DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern- Malária [7].

Estas formas são transmitidas ao mosquito quando sugadas durante um novo repasto sanguíneo. A multiplicação dos parasitas no mosquito é conhecida como o ciclo esporogônico. No estômago do mosquito, ocorre o processo de exflagelação dos microgametas (gametocitos masculinos) que posteriormente fecundam os macrogametas (oriundos de gametócitos feminino) gerando zigotos. Os zigotos por sua vez, tornam-se móveis e alongados (oocinetos) e invadem a parede do intestino médio do mosquito, onde se instalam na parte distal do lumen intestinal. Aqui ocorre a meiose e desenvolvimento para oocistos. Estes, por sua vez, crescem e liberam esporozoítos, que migram para as glândulas salivares do mosquito, onde, em um novo repasto sanguíneo poderão ser inoculados em um novo hospedeiro dando assim continuidade ao ciclo parasitário [7].

1.4 *Plasmodium falciparum*

Esta espécie causa a forma mais grave da doença e os índices mais altos de mortalidade. Sua transmissão e a maior prevalência ocorrem na África subsaariana, embora seja encontrada em outras regiões do mundo. Os principais vetores desta espécie são o *Anopheles gambiae* na África e o *Anopheles darlingi* no Brasil.

Uma diferença importante entre *P. falciparum* e outras espécies de *Plasmodium* que provavelmente o torna letal para hospedeiros humanos não imunes é a grande capacidade de evitar sua passagem pelo baço através do sequestro de eritrócitos infectados na microvasculatura de órgãos. Este fenômeno conhecido como citoadesão ou citoaderência provoca obstrução vascular, processos inflamatórios locais e é uma causa direta da malária cerebral e placentária [8].

As formas maduras do parasita (trofozoitos e esquizontes) se aderem em tecidos de vários órgãos, incluindo o coração, pulmão, cérebro, fígado, rim, placenta e tecidos subcutâneos. Tanto as células endoteliais nesses órgãos quanto os sincício-trofoblastos na placenta expressam diferentes receptores que o parasita deve reconhecer para aderir com êxito a estas células. O fenótipo de adesão não é homogêneo e diferentes parasitas podem ligar-se a diferentes tipos de receptores do hospedeiro. Acredita-se que essas variabilidades afetam a distribuição nos tecidos e a patogênese de parasita [8].

Esta adesão é mediada por antígenos variantes codificados pelo próprio parasita e exportados à superficie da hemácia infectada onde se agrupam em regiões específicas da membrana formando pequenas protuberâncias chamadas "*knobs*" que são os pontos de contato com as células hospedeiras. O transporte destas proteínas é possível graças à existência de um sistema composto pelos sinais de secreção PEXEL [76] ou VTS, um complexo de estruturas membranosas denominadas *Maurer's clefts* e o sistema de exportação PTEX (*Plasmodium translocon of exported proteins*), que medeiam no intercambio de proteínas entre a membrana do parasita e a hemácia infectada através da membrana do vacúolo parasitóforo [9]. Tambem existem proteínas secretadas que não possuim estas sinais PEXEL [75].

Os diferentes antígenos que são transportados para superfície da hemácia infectada podem possuir papel de transportador, canal de ions ou função desconhecida. Uma parte destes antígenos expostos pertencem a famílias de antígenos variantes como RIFINs (*repetitive interspersed family proteins*), STEVOR (*sub-telomeric variable open reading frame proteins*), SURFIN (*surface-associated interspersed family*) e PfEMP1 (*P. falciparum*

erythrocyte membrane protein 1), sendo que estes últimos são os principais responsáveis pelo sequestro dos eritrócitos infectados [17] (Figura 4).

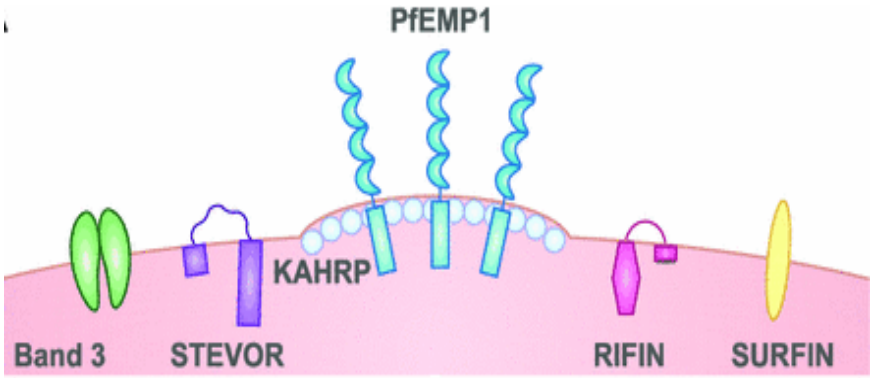


Figura 4. Antígenos exportados por *P. falciparum* à superfície da hemácia infectada. Fonte: Chan et al 2014 [17].

A família RIFIN compreende aproximadamente 180 membros que estão divididos em dois subgrupos RIFIN A e RIFIN B. Antígenos do tipo RIFIN A parecem estar localizados na superfície da hemácia infectada enquanto que os membros do subgrupo RIFIN B encontram-se internos no parasita [10]. A família STEVOR possui cerca de 40 membros que são localizados no complexo *Maurer's clefts* e associados à membrana de formas sexuais e assexuais. Estes antígenos foram associados à ligação de eritrócitos infectados com outras hemácias, provavelmente facilitando o sequestro do parasita na vasculatura de tecido profundo e também parecem desempenhar um papel importante na invasão de merozoítos fazendo desta família um dos principais contribuintes para a patologia do parasita [11]. Outro grupo de antígenos exportados à superfície da hemácia infectada é a família SURFIN que contém 10 membros. Estas proteínas de alto peso molecular (~280 – 300 KDa) são codificadas por genes que se encontram nas regiões subteloméricas dos cromossomos. Apesar de dois membros SURFIN serem relacionados a uma estrutura associada á invasão de merozoítos, a função destes antígenos ainda não é clara [12].

A família PFEMP1 consiste de aproximadamente 60 alelos antigenicamente diferentes. Estes antígenos são responsáveis pelo fenômeno de adesão e tem um importante papel na virulência e patogenicidade do parasita [16]. O parasita direciona estas proteínas para a membrana do eritrócito infectado, sendo que as porções estendidas para o meio extracelular são altamente variáveis e podem interagir com um grande número de receptores de outras hemácias e de células do endotélio dos vasos sanguíneos, incluindo ICAM1, EPCR, CD-36 e o glicosaminoglicano condroitina sulfato A (CSA), presente em abundância na placenta [17].

A interação PfEMP1-receptor pode desencadear diferentes manifestações da doença que variam de leve a letal, dependendo de qual PfEMP1 é expressa e o quanto este fenótipo é reconhecido pelos anticorpos do hospedeiro [13-14].

PfEMP1 são compostas de várias subunidades, denominadas domínios tipo *Duffy binding like domains* (DBL) ou domínios ricos em Cisteína, *Cystein-rich interdomain regions* (CIDR) os quais podem ser classificados em subfamílias [4], cada um destes pode interagir com receptores endoteliais específicos, dependendo da sua sequência de aminoácidos (figura 5). Para alguns domínios a interação com receptores específicos já foi demonstrada, e há evidência de que a expressão de pelo menos um deles pode ser associada à doença grave: os domínios DBL3γ / DBL3X associados à malária gestacional em mulheres na primeira gravidez [15].

1.4.1 Genes variantes

No contexto genômico as proteínas PFEMP1 são codificadas pela família de genes variantes *var*, composta por cerca de 60 genes. As sequências codificantes destes genes mostraram uma associação a sequências promotoras específicas de regiões *upstream* 5' (ups). A estrutura do domínio *var*/PfEMP1 esta em muitos casos ligada a promotores específicos, inicialmente divididos em 5 grupos upsA-E, dependendo da região do cromossomo onde se encontram (figura 6) [22].

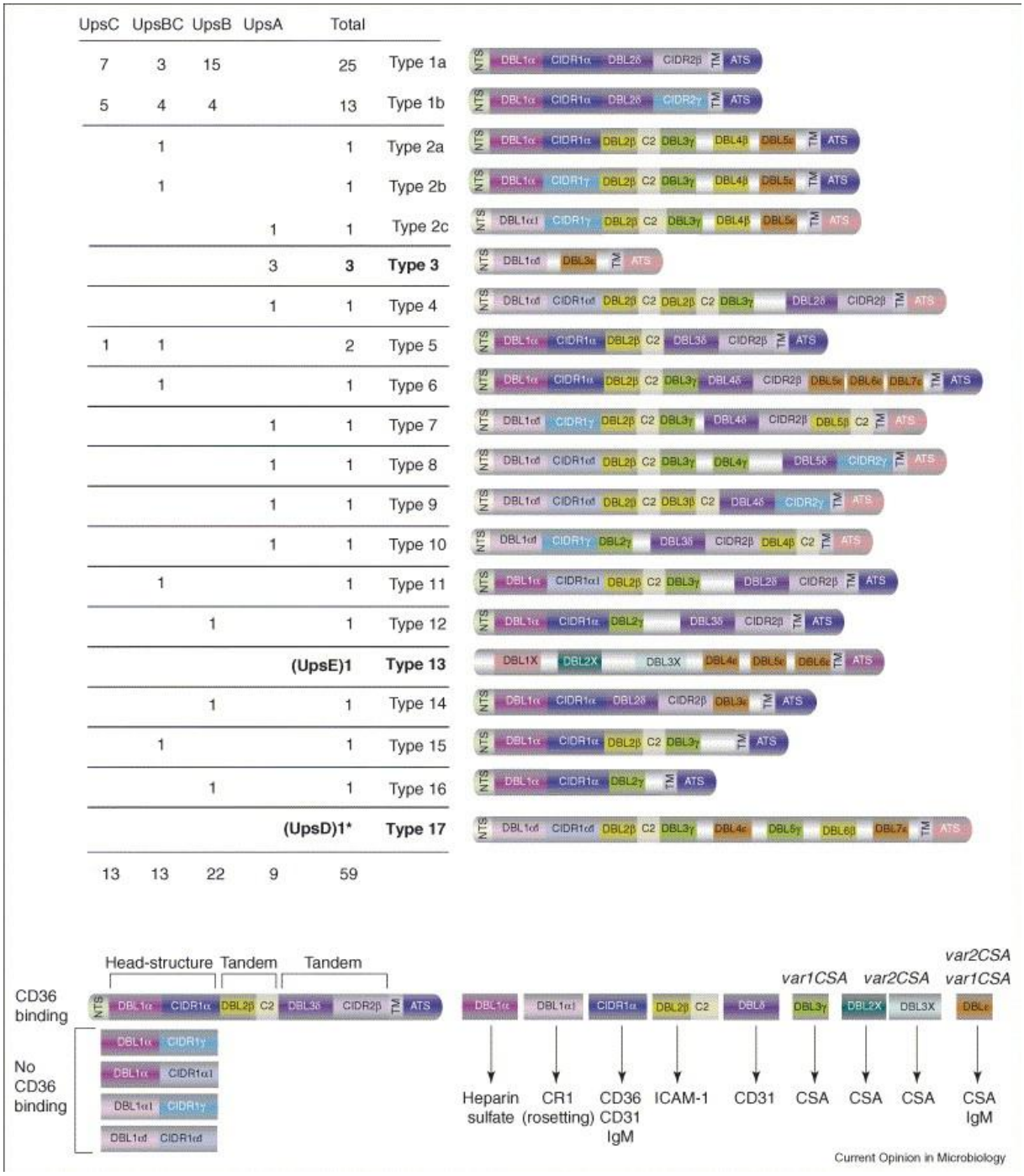


Figura 5. Estrutura das proteinas *var*iantes PfEMP1 e dominios de ligacao associados. Classificação Ups A-C indica os tipos de promotor associados a diferentes genes que codificam as PfEMP1. Fonte: Kraemer & Smith. 2006 [16].

Os genes *var* são transcritos de uma maneira especial. Dois grupos de pesquisadores independentes descobriram em 1998 que apenas um gene *var* é transcrito por cada hemácia infectada, em quanto todos os outros estão transcricionalmente silenciados, fenômeno conhecido como exclusão alélica, que consequentemente faz com que apenas uma proteína PfEMP1 variante seja exposta pelo parasita na superfície do eritrócito infectado [18-19].

Indivíduos com um sistema imune saudável podem apresentar uma resposta de anticorpos adequada contra a PfEMP1 exportada à superfície do eritrocito infectado, no entanto, o parasita tem a capacidade de mudar o perfil de transcrição dos genes *var*, através de um processo conhecido como "*switching*". Isto faz com que sub-populações de parasitas apareçam transcrevendo um gene *var* diferente, que por sua vez leva à expressão de uma nova PfEMP1 resultando em uma infecção persistente tipificada por sucessivas ondas de parasitemia. Este mecanismo conhecido como variação antigênica, confere ao parasita um amplo repertório de antígenos variantes como estratégia de evasão do sistema imune do hospedeiro (figura 6)[19].

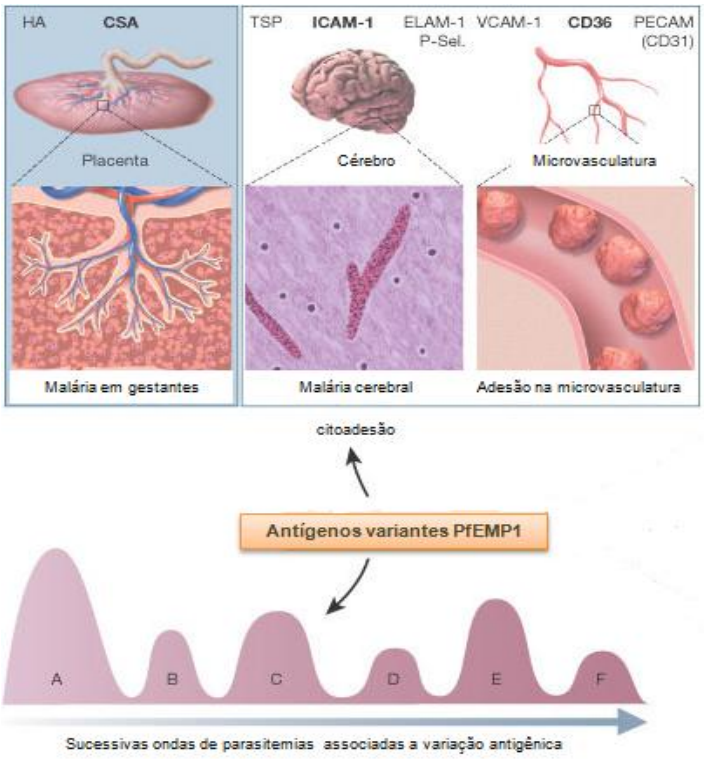


Figura 6. Variação antigênica de PfEMP1. Diversos fenótipos aderentes associam com as diferentes sequelas da malaria grave. Mudança sucessiva de fenótipos (letras A a F na figura abaixo) leva a constante evasão da resposta imune sem perda da capacidade de citoaderência da hemácias infectadas. Fonte: Miller et al. 2002 [8].

1.4.2 Controle na transcrição de genes var

O controle da expressão destes genes ocorre a nível transcricional, o que significa que quase todos os promotores são silenciados enquanto um único promotor *var* é induzido nos estágios de anel e trofozoíto jovem [20-21]. Porém, recentemente foram encontradas exceções para este modelo [23]. Há evidências de que além do controle da expressão no nível da

transcrição, existe também uma repressão de tradução, pelo menos para o gene *var*2CSA, associado a malária gestacional [24] e alguns genes com sequências do tipo upsC [25].

Em nível epigenético, mostrou-se que modificações locais da cromatina, especificamente na histona 3 lisina 9 (H3K9), desempenham um papel crucial na atividade ou silenciamento de promotores *var*: A H3K9 quando acetilada (H3K9ac) foi associada ao *locus var* transcricionalmente ativo [26,27], enquanto a H3K9 trimetilada (H3K9me3) foi encontrada em *loci* silenciados [28]. A primeira enzima modificadora de histona que foi claramente associada ao controle da expressão de genes *var* é a deacetilase de histona PfSIR2A [26]. Em seguida, uma segunda deacetilase denominada PfSIR2B foi relacionada com a regulação de um subconjunto de genes *var* e genes de outras famílias variantes [29]. Recentemente, a importância da histona-metil-transferase PfSET2 foi revelada quando linhagens de parasitas *knockout*, ativaram praticamente todos os genes *var* no núcleo do parasita o que também levou à expressão de diferentes PfEMP1 na superfície de eritrócitos infectados [30].

No parasita selvagem o padrão de transcrição dos genes *var* que permanecem silenciados é mantido ao longo do tempo (memória epigenética de transcrição) e apenas alguns clones parasitários parecem expressar outros antígenos PfEMP1 na sua superfície [18]. Isso implica que a variação na transcrição dos genes *var* é um processo controlado e sincronizado, que pode ser dependente da posição cromossômica dos mesmos [31-32]. Esta memória do estado ativo de um gene específico durante várias reinvasões é epigeneticamente marcada ("*earmarked*") pela dimetilação da H3K4 [33-34].

Há também evidências experimentais de que variantes de histonas especiais desempenham uma função importante na transcrição dos genes *var*: a histona H2A.Z está associada a *var loci* ativo [35], enquanto a proteína heterocromatina 1 (HP1) associa-se a regiões promotoras dos genes *var* inativos [36], e quando silenciada evita a exclusão alélica dos genes *var* [37]. Também foram descobertos RNAs não codificantes que são transcritos a partir de repetições telómericas e é possível que tenham uma influência sobre a transcrição dos genes *var* [38,39]. Por fim, mais recentemente foi descrito um mecanismo de silenciamento de genes envolvendo a degradação de RNA nascente mediada por uma exoribonuclease associada á cromatina, denominada PfRNase II que controla o silenciamento de genes *var* do grupo upsA [40]. De maneira interessante, muitas destas modificações relacionadas até agora também são encontrados na família de genes *rif* de antígenos variantes [41,42], embora estes não pareçam seguir exatamente o modo rigoroso de exclusão alélica na transcrição [43].

1.5 Fatores de transcrição ApiAP2

Apesar de toda a informação disponível para a modificação da cromatina, existem poucos dados sobre os fatores básicos que se ligam aos promotores *var* inativos ou ativos (exceto para HP1), e inclusive até recentemente acreditava-se que poucos fatores de transcrição existiam em *P. falciparum* [44]. No entanto, uma mudança neste contexto ocorreu com a descoberta de uma família de proteínas conservadas, denominada Apetala 2 do grupo Apicomplexa (ApiAP2) [45]. Estas proteínas contém domínios de ligação ao DNA, homologos aos fatores de transcrição Apetala 2 presentes em plantas. Este estudo deu a primeira indicação de que os parasitas Apicomplexa codificam uma família de proteínas reguladoras, gerando um novo foco de estudo na regulação da transcrição [46]. Em *Plasmodium* foram identificados 27 membros desta família, e apenas alguns deles foram associados a funções específicas.

Em *P. berghei* os ortólogos de *P. falciparum* PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100, foram relacionados no desenvolvimento de oocineto e esporozoitos na fase sexual do parasita, já que quando mosquitos do genero *Anopheles* foram alimentados com linhagens *knockout* para cada um dos genes não foi observado um desenvolvimento do parasita tanto nos estomagos quanto nas glandulas sa*livare*s do mosquito [50,51]. Também, os ortologos de PF14_0271, PF13_0235 e PF3D7_1466400 em *P. yoelii*, mostraram um aumento da expressão nos oocistos e esporozoitos, o que pode indicar que eles exercem uma função nessa fase.

Já em *P. falciparum* foi descrita a função de alguns deles sendo que PfSIP2 (PlasmoDB ID antiga PF3D7_0604100) foi associado na formação de heterocromatina e integridade de telómeros [47] e o fator de transcrição PfAP2-G foi relacionado com a formação de gametócitos e parece ser o principal regulador no início da gametocitogenese [48,49]. De forma conjunta outros membros ApiAP2 parecem estar envolvidos na progressão de desenvolvimento da fase sexual a assexual (PFF1100c, PF11091, PFD0985w, PF3D7_1143100 e PF3D7_0604100 [52,53]). Contudo, em *P. falciparum* apenas três proteínas ApiAP2 foram analisados detalhadamente (PF3D7_0404100, *knockout* sem fenótipo, PF3D7_0604100/PfSIP2 e PfAP2-G [PF3D7_1222600 [54]), e para os demais genes ainda não foram descritas funções específicas.

Por outro lado, os motivos de ligação ao DNA da família ApiAP2 em *P. falciparum* já foram analisados e em três proteínas (PF3D7_0604100, PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100)

foram encontrados domínios com afinidade de ligação aos elementos presentes em regiões 5' não traduzidas de genes *var* [54]. Flueck e colaboradores sugeriram uma função aparentemente específica de PF3D7_0604100 para o "tethering" da cromatina no grupo de genes *var* tipo upsB [47]. Já para as duas proteinas restantes não há informação disponível na literatura sobre a sua função e não foi reportado se um *knockout* de PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100 é possível, e se estes desempenham uma função crucial na transcrição de genes *var*, já que contém os domínios de ligação descritos anteriormente (Figura 7) [54]. Não está claro se estes fatores ligam-se sempre a motivos específicos, ou se eles são recrutados após ativação/silenciamento de qualquer *locus* determinado.

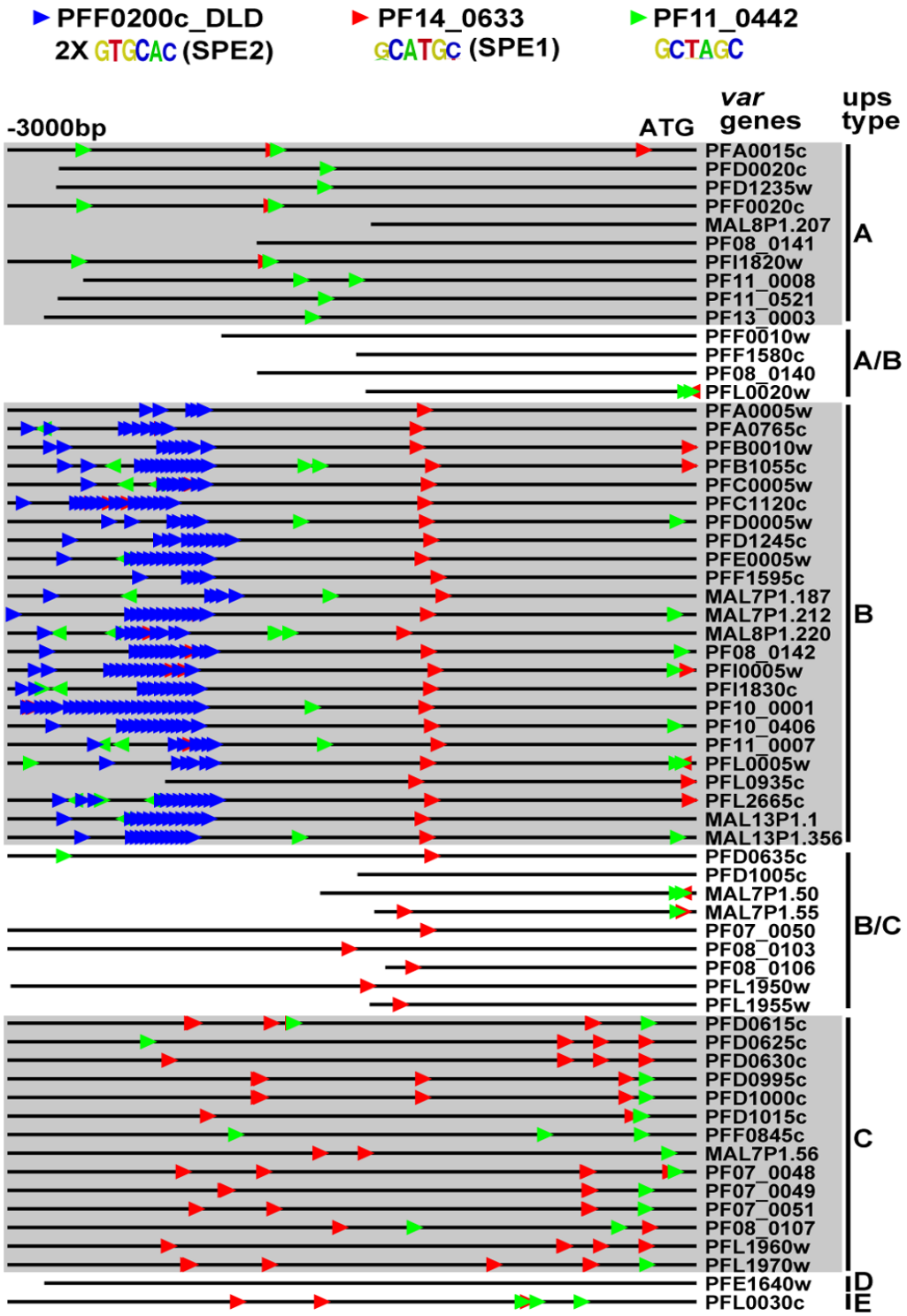


Figura 7. Motivos de ligação de três fatores de transcrição ApiAP2 a sequencias de regiões promotoras 5´não traduzidas de genes *var*. Mostrados são aproximadamente 2000 bp em 5' do codon *start* de genes *var*. Os códigos de identidade novos de PFF0200c, Pf14_0633 e Pf11_442 são PF3D7_0604100, PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100 respectivamente. Fonte: Campbell e colegas [54].

2 JUSTIFICATIVA

Apesar do sequenciamento completo do genoma de *P. falciparum* no ano de 2002 [55], ainda existe um vasto número de genes sem função conhecida (~2700 genes). Entre estes se encontram a grande maioria de fatores de transcrição ApiAP2, os quais quando estudados em outras espécies de *Plasmodium* parecem ter uma função importante no controle de diferentes pontos do desenvolvimento do parasita tanto nas fases sexuadas no mosquito quanto no hospedeiro vertebrado. Embora a visível importância destas proteínas em *P. falciparum*, apenas duas foram amplamente estudadas e associadas a processos cruciais no ciclo do parasita como a regulação de gametocitogenese controlada pelo PfAP2-G ou o "*tethering*" da cromatina no grupo upsB de genes *var* mediado pelo PFF0200c.

Também foram descritos motivos com afinidade de ligação a elementos promotores dos genes *var* em três proteínas ApiAP2, porém, apenas uma delas já foi amplamente estudada (PF3D7_0604100) enquanto que ainda não há informações detalhadas na literatura sobre as duas proteínas restantes. Sendo assim este trabalho busca elucidar a função de PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100 no controle de transcrição de genes variantes, focados principalmente na família dos genes *var*. Tal procedimento é por meio de manipulação genética do parasita introduzindo na extremidade 3' do gene alvo: i) um domínio desestabilizador que controla a estabilidade da proteína [59,60,61], ii) uma sequência da ribozima glms, que desestabiliza a transcrição controlada por clivagem do sinal poliA [62] ou iii) a introdução de uma sequência de terminação flanqueada por sítios 'loxP', que pode ser excluída pela expressão controlada da enzima diCre-recombinase [63].

A nossa hipótese é que o knockdown de PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100 conduzem ao silenciamento ou a ativação de (todos/alguns) genes *var*, ou para um fenótipo letal.

O projeto contribuirá com novas informações sobre a transcrição de fatores de virulência importantes para o parasita e pode apontar para alvos de medicamentos novos já que, i) a interferência na expressão de fatores de virulência torna o parasita vulnerável ao ataque do sistema imunológico e, ii) os fatores ApiAP2 de transcrição estão ausentes no hospedeiro humano.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Identificar a função das proteínas ApiAP2: PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100, concentrando-se na sua influência no controle da transcrição dos genes *var*.

3.2 Objetivos específicos

1. Obter linhagens de parasitas modificados geneticamente para controlar tanto a transcrição do gene alvo quanto a estabilidade da proteína.
2. Estudar e comparar o perfil de transcrição de genes *var* em parasitas com e sem knockdown para os dois genes de interesse.
3. Estudar a memória transcricional dos genes *var* após o knockdown transiente dos fatores de transcrição ApiAP2 em parasitas selecionados previamente para expressar determinados genes *var*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolado de *P. falciparum*

Neste trabalho foi utilizado o isolado de *P. falciparum* NF54 (obtido no ano 1979 de amostra sanguínea de paciente infectado na cidade de Amsterdã, Holanda). A linhagem 3D7 cuja sequencia está depositada no PlasmoDB é um clone de NF54. Assim, pode se assumir que a sequência genômica de NF54 é idêntica a do 3D7.

4.2 Cultivo de *P. falciparum*

Os parasitas foram cultivados *in vitro* em 4% de hematócrito em meio RPMI-HEPES (Embriolife, Campinas) suplementado com 0,5% Albumax 1 (Invitrogen-São Paulo) e 0,23% bicarbonato de sódio a 37 ºC. O meio foi trocado todos os dias e os parasitas foram alimentados com sangue fresco do tipo B^+ a cada quatro dias ou mais frequente dependendo da parasitemia na cultura. A porcentagem de parasitas foi monitorada por verificação microscópica de esfregaços corados com o kit Panótico Rápido (LabClin São Paulo).

Para armazenagem dos parasitas, as hemácias infectadas foram lavadas com RPMI e centrifugadas a 1500 RPM durante 5 minutos. Em seguida foram adicionados 1,66 vezes o volume do sedimento do reagente *glycerolyte* (45,3 V/V glicerol, 2,26% lactato de sódio, KCI 5mM, pH 7,2 acertado com $NaHCO_3$) e transferido para criotubos que foram mantidos a -80 ºC por uma noite e depois conservados em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento das amostras foram utilizadas soluções estéreis de NaCl 12% (pH 6) e NaCl 1,6% (pH 5,5). Alíquotas descongeladas foram transferidas de criotubos para tubos de 15 ml do tipo falcon e adicionado 1/5 do volume total das hemácias de NaCl 12% gota a gota. Após repouso por 1 minuto foram adicionados 10 volumes de NaCl 1,6% e a suspensão foi centrifugada a 1400 RPM durante 5 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi aspirado e as hemácias compactadas foram resuspensas em RPMI-Albumax e transferidas para garrafas e mantidas em condições de cultura como descrito acima.

Com o objetivo de obter culturas sincronizadas, parasitas foram sincronizados usando Voluven 6% (Fresenius Kabi, Campinas, Brasil), que seleciona parasitas nas formas de trofozoitos e esquizontes, seguindo os protocolos estabelecidos [56]. Quando foram necessários parasitas sincrônicos em fases de anel, culturas com predominantemente esta forma (até 8 h após a re-invasão) foram tratadas durante 10 minutos com 20 volumes de

solução de sorbitol (Sigma) a 5%, seguindo os protocolos descritos por Ljungström e colaboradores [57].

4.3 Extração de gDNA de *P. falciparum*

A 100 µl de sangue compactado com no mínimo 5% de parasitemia foi acrescentado 1,25 ml de PBS (1X) mais 150 µl de saponina 1%. Os parasitas foram levemente misturados por inversão e incubados no gelo por 5 minutos, até a solução ficar translúcida. Logo após, os parasitas agora liberados das hemácias foram centrifugados por 5 minutos a 12000 RPM, o sedimento obtido (~50 µl) foi lavado uma vez com PBS 1X e dissolvido em 250 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 e 1 mM EDTA pH 8). Posteriormente, foi incubado com 100 µl de tampão de lise 4 X (40 mM Tris-HCl pH 8; 4 mM EDTA pH 8; 0,8 mM NaCl e 4% SDS) acrescentando 20 µl de Proteinase K (10 mg/ml) por um período de 3 horas a 37 ºC. Durante este tempo, espera-se que proteínas sejam degradadas e membranas totalmente solubilizadas.

Subsequentes extrações com fenol, fenol clorofórmio e clorofórmio (400 µl de cada, incubação de 10 minutos na gangorra, e centrifugação a 8000 RPM durante 5 minutos para cada solução, centrifuga Eppendorf) foram feitas para a eliminação de lipídeos e proteínas. Na última extração o sobrenadante foi retirado e precipitado com 800 µl de etanol 100% por 15 minutos no gelo. Depois foi centrifugado a 8000 RPM durante 10 minutos e o sedimento foi lavado uma vez com etanol 70%. Por fim, foi centrifugado mais uma vez e o sobrenadante foi retirado até o tubo ficar seco, neste ponto o sedimento foi resuspenso em 50-200 µl de TE e armazenado a 4 ºC.

4.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Para a amplificação dos fragmentos de PF3D7_1143100 e PF3D7_1466400 e clonagem em plasmídeos usados para inserir diferentes modificações no gene original, foram desenhados diferentes pares de oligonucleotídeos apresentados na tabela 1. Também foram desenhados oligos para posterior confirmação da integração dos plasmídeos no genoma. Estes oligos amplificam fragmentos de cerca de 1000 pares de bases imediatamente anterior ao códon de parada com sítios de restrição para as enzimas Bgl2 (5’ do amplicon) e Pst1 (3’ do amplicon).

A reação de PCR foi feita num volume total de 15 µl em água *nuclease free* usando 100 ng de gDNA de *P. falciparum*, 5 pM de cada oligo, dNTPs, e *Taq* polimerase Elongase (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

A amplificação dos fragmentos iniciou-se com uma etapa de desnaturação por 5 minutos a 95 ºC, seguida de 30 ciclos de desnaturação de 40 segundos a 94 ºC, hibridando por 40 segundos a 53 ºC e extensão de 65 ºC durante um minuto e meio. Quando terminados os 30 ciclos foi feita uma etapa adicional de extensão a 72 ºC por 10 minutos. Estas reações foram feitas no termociclador Eppendorf Mastercycler.

O produto final foi analisado em gel de agarose 1% corado com *crystal violet* (0,18 µg/ml) e visualizado sob luz branca. O fragmento observado foi cortado do gel, purificado e ligado no vetor pGEM T-easy® (Promega, Belo Horizonte). Posteriormente bactérias químio-competentes foram transformadas com esta ligação e os clones obtidos foram purificados e analisados tanto por digestões enzimáticas quanto por sequenciamento.

As seguintes reações de PCR seguiram as mesmas condições, porém foi utilizada *Taq polimerase* convencional (Fermentas), e o DNA foi marcado com Brometo de etidio (0,2 µg/ml) e visualizado com luz ultravioleta.

4.5 Purificação do produto de PCR

O procedimento para purificação do DNA do gel foi feito usando sílica "*Glassmilk"* [57]. Às bandas cortadas foram adicionados três volumes de NaI 6M e incubados a 37 ºC até dissolver a agarose. Depós foram adicionados 5 µl de *Glassmilk* (100 mg/ml em 3 M NaI) e incubado por 5 minutos. Logo foi centrifugado e o sedimento branco foi lavado com 1 ml de New Wash Buffer (20 mM Trish-HCl pH 7.5 0,1 M de NaCl, 2 mM de EDTA, em 55% v/v de etanol). O sedimento foi seco a temperatura ambiente e após foi misturado em 20 µl de TE. Por fim, foi centrifugado novamente e o sobrenadante contendo o fragmento purificado foi transferido para um novo tubo que foi armazenado a -20 ºC.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação por PCR de PF3D7_1466400 e PF3D7_1143100. Os sítios de restrição introduzidos são destacados em negrito.

Oligonucleotídeos	Tamanho do produto amplificado
PF3D7_1466400 fw: 5'- **AGATCT**GATATGGTTCATCGTATGAATAATAATATG	1023 bp
PF3D7_1466400rev: 5'- **CTGCAG**CAGATTCAGAATTATCATATGAATTTGAC	
PF3D7_1466400fw: 5'- check GATTTATATAGAGGAAATGTATCACC	
PF3D7_1143100 fw: 5'- **AGATCT**ACAAATATAAATAATTCTGAGGAAG	1037 bp
PF3D7_1143100rev: 5'- **CTGCAG**CTGTTAACTTATTTCCATTATATATTATCG	
PF3D7_1143100 fw: 5'- check CATCAAAATGGATTTAATAATTGTTC	
PF3D7_1466400 3' UTR fw **GAAT**TCCCTTTCATGGGAAATTATAAAATTTAG	785 bp
PF3D7_1466400 3' UTR rev **CCAT**GGCACCACCCTTTGAACCATTTTC	
PF3D7_1143100 3'UTR fw **GAAT**TCATAACATGGTACATTTAAAATTGG	811 bp
PF3D7_1143100 3'UTR rev **CCAT**GGTTTATATAGACGAAGCGCAAC	

4.6 Ligação de DNA e transformação de bactérias

Para a ligação foram utilizados 0,5 µl (5 ng) do vetor de clonagem (pGEM® T-easy) ou vetores de transfecção previamente cortados com Bgl2/Pst1 (pRESA-GFP-HA-DD24, pTEX150-HA-loxTerm e pTEX150-HA-glmS [plasmídeos construídos e cedidos gentilmente pelo ex-pós-doutorando do laboratório, Mauro Ferreira de Azevedo] e pHH-TK [plasmideo construído como opção alternativa aos anteriores, que permite uma seleção negativa de parasitas nos quais não ocorrer recombinação (66)]) e 1,5 µl do inserto (fragmentos amplificados e purificados como descrito acima).

Inserto e plasmideo foram incubados junto com a enzima T4 ligase (Thermo Scientific) e 1 µl desta ligação foi usado para transformar 25 µl de células quimio-competentes *E. coli* DH10B ou XL1-Blue preparadas como descrito por Sambrook et al. [64]. Para os plasmídeos de transfecção, como controle de ligação, o vetor cortado também foi submetido aos mesmos procedimentos. Logo depois da transformação foi aplicado um choque térmico de 1 min a 42 °C e acrescentado meio LB sem antibiótico. Após adicionais 10-20 min a 37 °C, as transformações foram espalhadas em placas pré-aquecidas de Agar LB com ampicilina e incubadas a 37 ºC durante 12-16 horas.

4.7 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep)

O procedimento foi realizado como descrito por Sambrook et al. 1991 [64], que consiste da troca do meio LB ou TB das bactérias por um tampão isotônico e posterior lise com detergente iónico e álcali para desnaturação parcial de plasmideos e total de gDNA. Depois precipitação de complexos SDS/proteína/gDNA e renaturação dos plasmídeos, o DNA plasmidial foi precipitado com isopropanol. Posteriormente ocorreu a eliminação de sais e contaminantes por precipitação com isopropanol e etanol 70%.

Da placa Agar LB-amp foram escolhidas colônias para inocular em 1,5 ml de LB ou TB-amp em tubo de 15 ml. Os cultivos foram incubados sob agitação por 16 horas a 37 ºC, com a tampa semiaberta. Posterior à incubação, as culturas crescidas foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas a 12000 RPM durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi resuspendido em 200 µl de tampão 1 (Trish-HCl 0,1 M pH 8, glicose 1% e 2 mM EDTA pH 8) e as bactérias foram lisadas por adição de 400 µl tampão 2 (NaOH 0,2 M, SDS 1%). As proteínas e DNA genômico de *E. coli* foram precipitados com 300 µl de tampão 3 (acetato de potássio 3 M e ácido acético 5 M) e incubados por 5 minutos no gelo. Depois foi centrifugado a 12000 RPM durante 5 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o material foi precipitado com 600 µl de isopropanol incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12000 RPM durante 5 minutos a 4 ºC. O sedimento foi então lavado com etanol 70% e centrifugado por 2 minutos a 12000 RPM. Por fim, o sobrenadante foi retirado e o material foi resusspenso em 50 µl de TE suplementado com RNAse (10 µg/ml, Invitrogen).

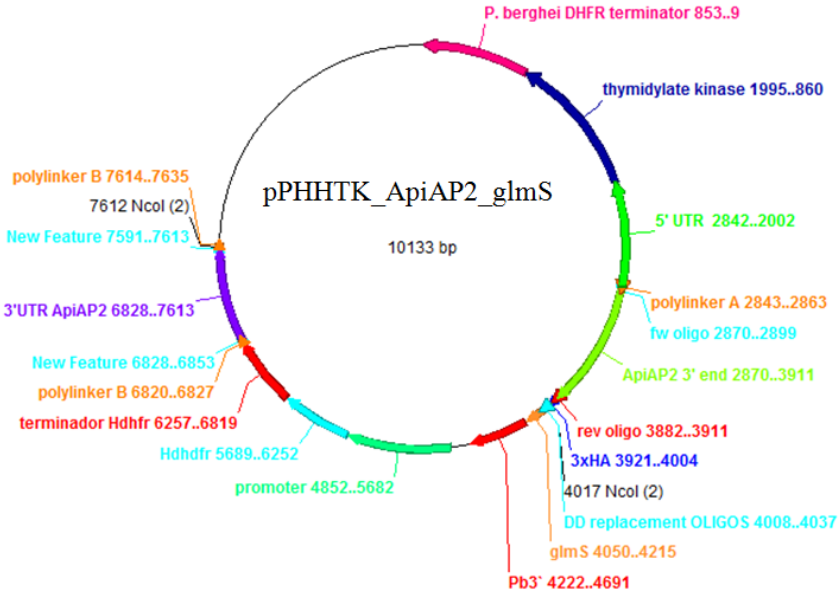
Para análise e confirmação da clonagem, 4 µl do DNA plasmidial obtido foram incubados com as respectivas enzimas de restrição (Fermentas tipo comum ou *fast digest*) a 37 ºC seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel TAE de agarose 1% e o DNA foi marcado com brometo de etídio e observado em luz ultravioleta.

4.8 Sequênciamento

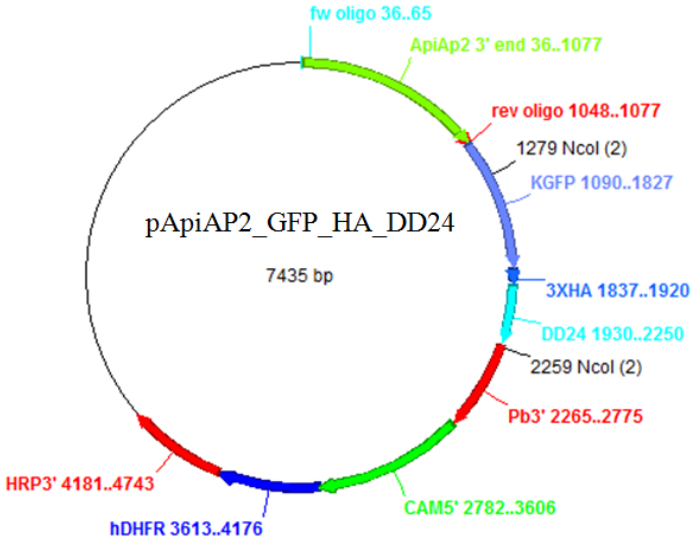
Após analise de restrição os fragmentos inseridos nos vetores pGEM –Teasy foram enviados para sequênciamento de DNA do próprio departamento que utiliza sequenciador ABI 3550 e componentes BigDye 3.1 (Applied Biosystems). Após confirmação de 100% de

identidade dos fragmentos ApiAP2 com as sequências depositadas no plasmoDB, estes foram excisados e clonados nos vetores de transfecção (Figura 8).

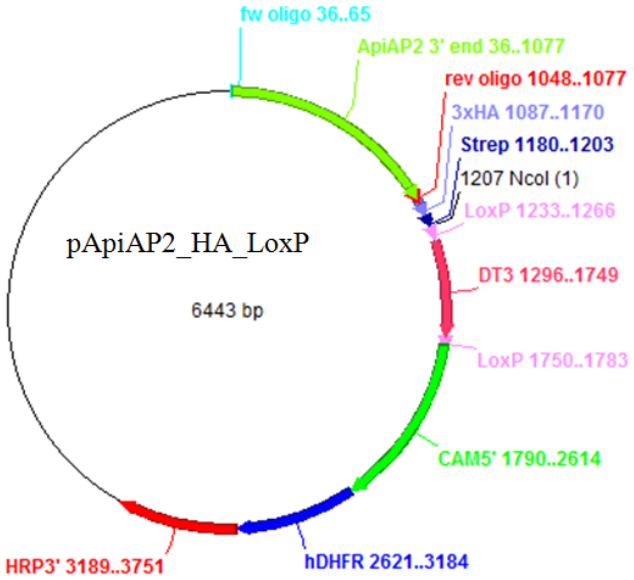
A.



B.



C.



D.

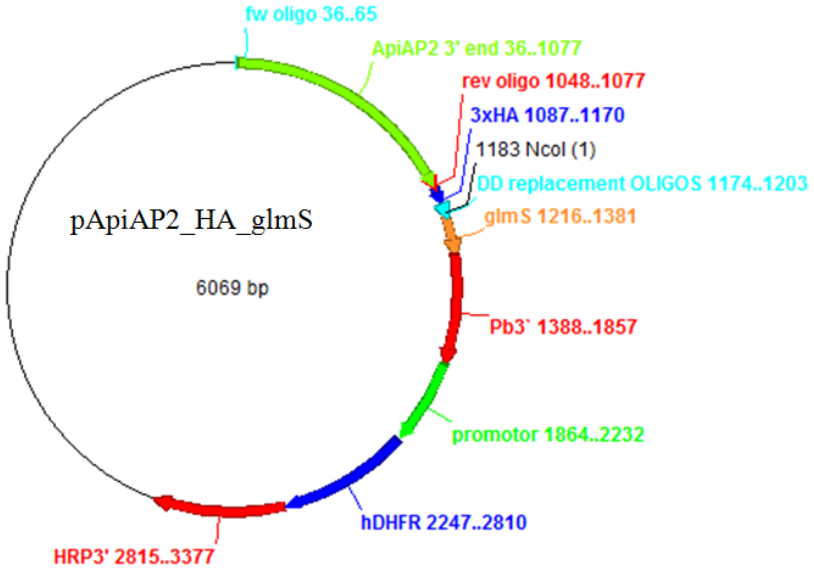


Figura 8. Mapa dos vetores usados para transfecção. A. Plasmídeo base pHH-TK-glms com a extremidade 3' do gene alvo e a região 3' UTR para induzir dupla recombinação. B. Plasmídeo contendo o domínio desestabilizador DD24 além de *tag* HA e sequência de GFP. C. Plasmídeo com sítios LoxP e *tag* HA. D. Plasmídeo com sequência glmS e *tag* HA. Os últimos três plasmídeos contém apenas a extremidade 3' do gene que permite eventualmente recombinação homóloga simples.

4.9 Extração de DNA plasmidial em grande escala (Maxiprep, segundo Sambrook et al. 1991)

Após confirmação por restrição, 0,2 µl dos plasmídeos positivos foram usados para re-transformação de células competentes *E. coli* XL1 blue ou DH10B. Uma colônia foi inoculada em 5 ml de LB-amp + 2% de glicose e foi incubada em agitação a 37 ºC durante o dia e transferido a 100-200 ml de TB-Amp sob agitação a 37 ºC durante a noite.

No dia seguinte os cultivos foram centrifugados em tubos falcon de 50 ml a 2800 RPM durante 15 minutos a 4 ºC em uma centrifuga Sorvall RC7. O sobrenadante foi descartado e as bactérias sedimentadas foram dissolvidas em 5 ou 10 ml de tampão 1, seguido da adição de 10 ou 20 ml de tampão 2 com uma leve agitação por inversão do tubo e incubação de 10 minutos. Depois, 7,5 ou 15 ml de tampão 3 foram acrescentados seguido de agitação e incubação no gelo durante 10 minutos. O material foi centrifugado a 2800 RPM durante 10 minutos a 4 ºC na centrifuga Sorvall.

O sobrenadante foi passado por um filtro de papel umedecido para um tubo novo e 0,6 volumes de isopropanol foram adicionados, seguido de um período de incubação de 15 minutos. Uma centrifugação a 2800 RPM durante 10 minutos a 4 ºC foi feita para precipitar o material e o sedimento foi ressuspenso em 3 ml de TE e forma então acrescentados 3 ml de LiCl 5 M (gelado). Após nova centrifugação de 15 minutos a 2800 RPM e 4 ºC o sobrenadante foi transferido para um tubo novo e misturado com o mesmo volume de isopropanol, seguido de uma nova centrifugação (15 minutos a 2800 RPM e 4 ºC). O sedimento foi ressuspenso em TE-RNAse 10 µg/ml, transferido para um tubo Eppendorf e incubado por 30 minutos a 37 ºC. Depois desta incubação, 0,5 ml de PEG 6000/1,6 M NaCl foram adicionados e o material foi centrifugado 5 minutos a 12000 RPM (centrifuga Eppendorf). O sedimento foi ressuspenso em 0,5 ml de TE e subsequentes extrações com fenol, fenol clorofórmio e clorofórmio foram feitas. Ao produto obtido das extrações foram adicionados 100 µl de acetato de amônio 10 M. Por fim, os plasmídeos foram precipitados com 1 ml de etanol 100%, centrifugado 5 minutos a 12000 RPM, lavados com etanol 70% e o sedimento foi seco e ressuspenso em 100-200 µl de TE. O DNA purificado foi quantificado no aparelho *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific).

4.10 Transfecção em *P. falciparum*

Os vetores obtidos foram transfectados em parasitas NF54 usando a metodologia descrita por Hasenkamp, Russell, & Horrocks [65]. Para isso, hemácias vazias, previamente lavadas com cytomix (120 mM KCl; 0,15 Mm $CaCl_2$; 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,6; 25 mM HEPES pH 7,6; 2 mM EGTA; 3 mM $MgCl_2$) foram eletroporadas com 40 µg de cada plasmídeo. As condições de eletroporação foram 0,31 kV e 960 µF em cubetas de eletroporação de 2 mm espessura usando o GenePulser 1 (BioRad). Depois, parasitas em fase trofozoíto/esquizonte de *P. falciparum* da linhagem NF54 previamente concentrados por

plasmagel (figura 10 C) foram colocados para invadirem novamente às hemácias eletroporadas.

Uma vez que os plasmídeos utilizados possuim um *cassette* com a sequência hDHFR (dihidrofolato reductase humana) que confere resistência à pirimetamina e seu derivado WR99210, no terceiro dia após a transfecção, os parasitas foram submetidos a seleção por este fármaco para manter apenas parasitas transfectados vivos. Eventualmente ocorre também a integração do plasmídeo no *locus* de interesse. Isso acontece por recombinação simples fazendo com que o gene expresse as modificações presentes nos vetores construídos. Depois de 6 dias de tratamento com a droga, não foram observados mais parasitas vivos e o meio apenas foi trocado a cada dois dias até os parasitas reaparecerem depois de aproximadamente 20 a 25 dias. Quando as parasitemias chegaram 2-4% uma alíquota foi congelada como *backup*.

Para seleção de eventos de integração por recombinação simples em parasitas transfectados com os vetores pApiAP2_GFP_HA_DD24 e pApiAP2_HA_loxTerm foi retirada de forma intermitente a droga WR99210 por 14 a 20 dias e depois colocada novamente no meio. Desta forma, parasitas que carregam formas episomais onde não ocorreu recombinação, perdem os plasmídeos e esperava-se que apenas parasitas com integração no genoma sobrevivam à readição da droga.

Para parasitas recombinantes transfectados com o vetor pHHTK_ApiAP2_glms depois de congelar um *backup* resistente à droga WR99210, foram selecionados aqueles que integraram o plasmídeo no genoma. Isso foi feito pela adição de 4 µM Ganciclovir (Sigma) que na presença da *Thymidylate Kinase* (sequência inserida no plasmideo do vírus Herpes simplex) faz com que os parasitas que ainda carregam o vetor na forma episomal morram e sobrevivam apenas aqueles onde ocorreu recombinação dupla por homologia e assim perderam a sequência da timidilato quinase [66].

A integração dos vetores no *locus* de interesse foi detectada inicialmente por PCR utilizando diferentes pares de oligonucleotídeos dentro e fora do plasmídeo integrado usando como controles gDNA de parasitas selvagem e o plasmídeo usado para cada transfecção (Figura 9). Uma vez confirmada a modificação do gene, foi observada a correta expressão da proteína por microscopia de fluorescência para parasitas com etiqueta GFP, e por meio da técnica de *Western blot* utilizando anticorpo especifico para a etiqueta de HA.

4.11 Microscopia de fluorescência

Parasitas transfectados foram incubados com 40 µg/ml de DAPI para a marcação do DNA do núcleo por 30 minutos a 37 ºC. Após esse período os parasitas foram lavados três vezes com PBS 1X e visualizados em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager M2) com aumento de 1000 vezes.

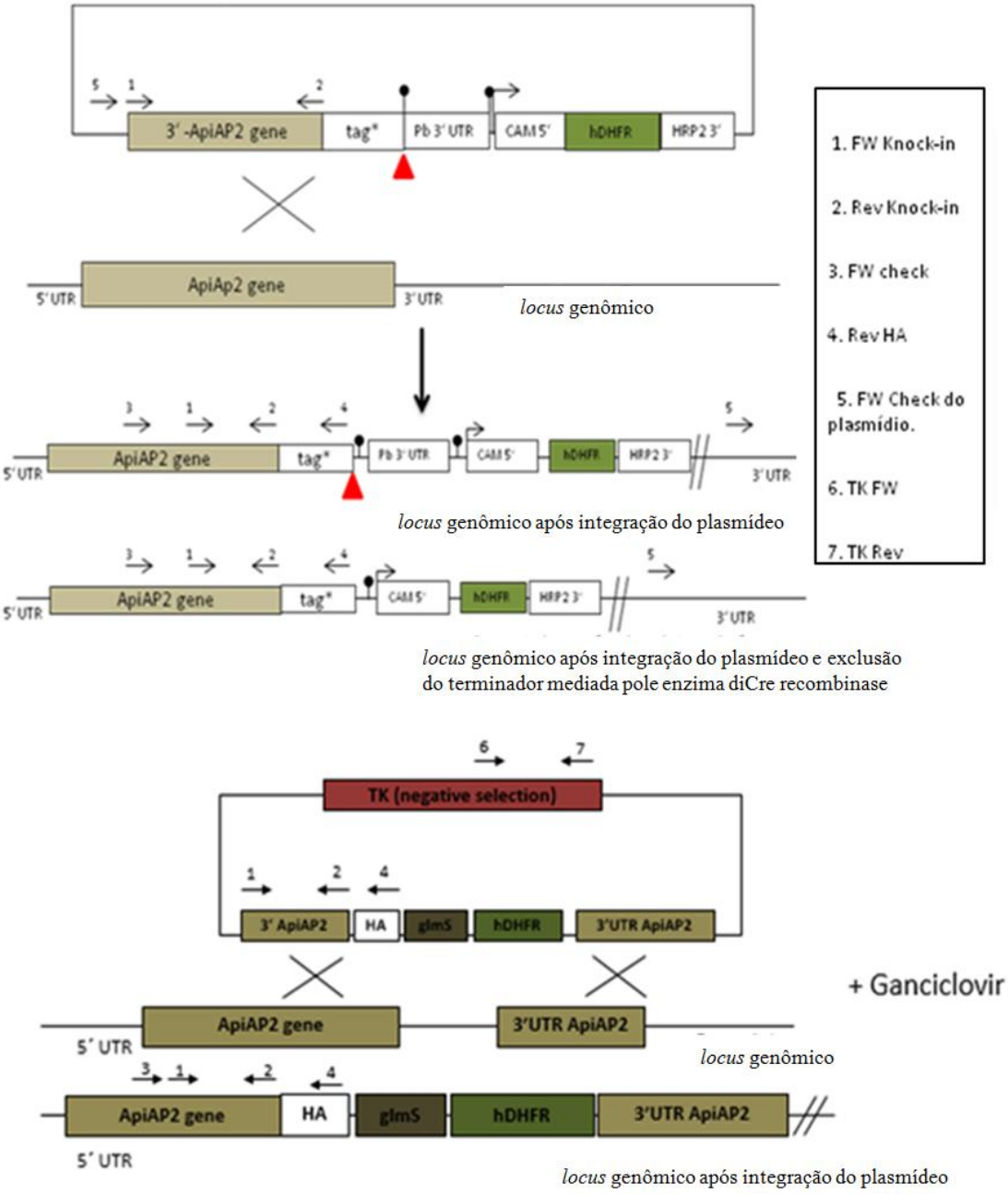


Figura 9. Esquema do processo de recombinação após a transfecção e integração nas regiões homólogas do genoma do parasita. A. Construções com vetores que possuem apenas a região terminal 3' do gene. B. Vetores que contém a região terminal 3' e a região 3' UTR do gene e o *cassette* de seleção negativa timidilato quinase que na presença de ganciclovir torna letal para o parasita as formas episomais do plasmídeo. As

sequências alvos não possuem a região do promotor, o que significa que apenas depois da integração a proteína fusionada é expressa como tal. "Tag" nestas versões dos plasmídeos são os domínios desestabilizadores (DD24) mais um domínio de hemaglutinina e uma GFP, ou uma combinação dos dois. As abreviaturas fazem referência às regiões reguladoras de *Plasmodium* murino sem sequências correspondentes no genoma de *P. falciparum*, para evitar a integração fora do *locus* de interesse. hDHFR é a diídrofolato reductase humana que torna os parasitas resistentes à pirimetamina e seu derivado WR99210. Os dois pontos pretos no limite da região UTR do Pb 3' indicam os sítios loxP. O triângulo vermelho marca o local onde a sequência da ribozima glmS de *Bacillus subtilis* está inserida em alguns vetores. As setas indicam *primers* de oligonucleotídeos que permitem a identificação de genes recombinados em linhas de parasitas transgênicos: enquanto o par de oligos 1/2 deve amplificar em todos os parasitas, o par de oligos 3/4 apenas amplifica em *loci* recombinados. Além disso, a combinação de 5 e 2 ou 4 (para os vetores com recombinação simples) e 6 e 7 (para vetores com a sequência timidilato quinase) apenas amplificam formas epissomais.

4.12 Clonagem dos parasitas por diluição limitante

Para obter linhagens de parasitas 100% integrados em transfectantes com pApiAP2_GFP_HA_DD24 e pApiAP2_HA_loxTerm, foram feitas diluições seriadas até obter aproximadamente 30 parasitas em 9,6 ml de meio em 3-5% de hematócrito, que foram distribuídos em placas de 96 poços durante duas semanas na ausência de WR99210. A detecção dos poços positivos foi feita por esfregaço sanguíneo corado com kit panótico rápido. Poços com parasitas foram expandidos até alcançarem parsitemias suficientes para extração de gDNA com kit (Promega) e amplificação do gene de interesse por PCR.

4.13 Western Blot

Amostras de parasitas purificados e sincronizados em diferentes fases (figura 10) foram lisadas com saponina 1%. Após centrifugação (5 minutos, 12000 RPM), foram ressupensasw em TE e foi acrescentado buffer 4x SDS PAGE (0,25 M Tris-Cl pH 6,8; 6% SDS; 20% glicerol). O material foi desnaturado por 5 minutos por aquecimento em banho seco a 94 ºC (Thermo Scientific). A separação das proteínas foi feita em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% em tampão de corrida 1x *Running Buffer* (0,192 M glicina; 0,025 M Tris; 0,1% SDS) durante 3 horas a 120V em aparelho mini-protean 3 (BioRad).

Após a corrida os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond C) em tampão de transferência (0,192 M glicina; 0,025 M Tris; 10% metanol) durante 1 hora a 1V por cm^2 de gel. Depois deste tempo as membranas foram coradas com solução Ponceau (0,1 g em 1% ácido acético) para observar se houve transferência de proteínas, uma vez que isto foi confirmado, as membranas foram incubadas em leite desnatado 5% em PBS 0,1% Tween20 durante 1 hora e subsequentemente lavadas três vezes com PBS 0,1% Tween20. As

membranas foram incubadas com o anticorpo primário, feito em camundongo (Anti-HA para identificar proteínas quiméricas expressando a etiqueta de HA e anti-PTEX150 como controle endógeno em proporção 1:500), diluído em 2% de leite desnatado em PBS/ 0,1% Tween20, durante 12 horas sob agitação. Após esta incubação três lavagens com PBS/ 0,1% Tween20 foram feitas e o anticorpo secundário (anti-mouse peroxidase KPL) diluído em 2% de leite desnatado em PBS/ 0,1% Tween20 em proporções 1:2000 foi adicionado, seguido de incubação sob agitação durante 2 horas. Após este período foram feitas três lavagens com PBS/ 0,1% Tween20.

Proteínas detectadas foram visualizadas mediante quimioluminescência. Para isso, as membranas foram molhadas com substrato Western Pico (KPL) que usa uma mistura de luminol e água oxigenada. A emissão de luz foi documentada de foram acumulativa no sistema Eagle eye (GE).

4.14 Seleção de fenótipos aderentes a células CHO-CD36 (*Panning*)

Para se obter parasitas que transcrevem genes *var* definidos foram feitos ensaios de citaderência que permitiu selecionar parasitas aderentes a células CHO-CD36. Este procedimento foi realizado como descrito por Gölnitz e colaboradores [68].

Parasitas em fase trofozoíto foram flotados usando Voluven 6% (Fresenius Kabi, Campinas, Brasil) (figura 10 C), e colocados em garrafas de cultura contendo células CHO-CD36 em RPMI / plasma pH 6,8. Os parasitas foram incubados junto com as células durante uma hora a 37 ° C e movimentadas de forma circular suavemente a cada 15 min. Após 1 h, as hemácias não aderentes foram aspiradas e a cultura foi lavada três vezes com meio RPMI (pH 6,8). As hemácias que aderiram às células CHO-CD36 foram depois retiradas utilizando RPMI / plasma, (pH 7,2) e devolvidas para condições normais de cultura. O processo foi repetido de 4 a 5 vezes até obter populações homogêneas de parasitas expressando dominantemente o gene *var* PFD0615c (que medeia a adesão ao receptor CD36).

4.15 Cultivo de *P. falciparum* com Shield-1

Shield-1 (Clontech inc) foi armazenado a -20 ºC numa concentração de 1 mM diluído em etanol. Para o uso na cultura de parasitas transfectados com vetores que contém o Domínio Desestabilizador tipo 24 [70] foi adicionado diariamente em concentração final de

0,5 µM. Este domínio tem sua base em formas mutadas de FKBP (FK506 humano/ *rapamycin-binding-protein*) que já foi estabelecida em diversos tipos de células para explorar a função de proteínas. O Shield-1 é um derivado de rapamicina, altamente eficiente e não apresenta toxicidade nas concentrações usadas [61].

4.16 Ensaio da retirada de Shield-1

Para estes experimentos, culturas de parasitas transgêncios que continham o domínio DD24 foram lavados com RPMI e centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os parasitas foram colocados em condições normais de cultura sem o Shield-1.

4.17 Cultivo de *P. falciparum* com Ganciclovir

Uma vez congeladas as alíquotas de parasitas transfectados com o vetor pHHTK_ApiAP2_glms estes foram submetidos à pressão da droga Ganciclovir numa concentração final de 4 µM. As culturas foram monitoradas por esfregaços corados com kit Panotico rápido. Após o ressurgimento de parasitas (entre 6-10 dias) uma alíquota foi congelada e amostras de gDNA e proteínas foram extraídas para confirmar a seleção negativa/eliminação de parasitas que carregavam o plasmídeo em forma episomal.

4.18 Cultivo de *P. falciparum* com N-Acetil glucosamina

Os RNAs de auto-clivagem, conhecidos como ribozimas, são elementos modulares que retêm a função de RNA em diferentes contextos. A ribozima de *Bacillus subtillus* glmS é única, uma vez que tem um co-factor específico (glucosamina ou seus derivados) e apenas na sua presença induz a degradação do mRNA [62]. Então, para induzir a clivagem do transcrito alvo, parasitas transfectados com vetores que contem a sequência da ribozima glmS (pHHTK_ApiAP2_glms) foram sincronizados e mantidos em cultura com N-Acetil glucosamina 5 mM, e depós de 24 e 48 horas de incubação o RNA foi extraído para posteriores análises de transcrição dos genes de interesse.

4.19 Cálculo das parasitemias

A quantidade de parasitas nas diferentes condições experimentais foi analisada por esfregaço sanguíneo corado com kit Panotico Rapido. Foram contadas as hemácias vazias e parasitadas de um total de 10 campos e calculada a média. As medias e desvios padrão foram estabelecidos e os resultados plotados em gráficos usando o programa GraphPad Prism® 5.3.

4.20 Extração de RNA e transcrição reversa

As coletas de RNA dos parasitas para análise do efeito da retirada do Shield-1 e da incubação com N-Acetil Glucosamina foram feitas com culturas sincrônicas em diferentes fases do parasita. Estas amostras foram tratadas com 0,1% de saponina em 1x PBS durante 15 minutos no gelo. Após centrifugação a 3000g, o material sedimentado foi ressuspenso em 100 µl de 1 X PBS e lisado com 1 ml de Trizol (Invitrogen). Posteriormente o RNA foi extraído seguindo as instruções do fabricante.

Após a obtenção do RNA, uma alíquota foi submetida a eletroforese em gel de TBE 0,8% agarose para obse*rvar* a integridade e qualidade da amostra. O material foi marcado com brometo de etídio e visualizado com luz ultravioleta.

Para a reação de transcrição reversa RT foram utilizados 10 µg de RNA total que foram digeridos três vezes consecutivas pela enzima DNAse I (Fermentas). O material obtido desta reação foi utilizado para síntese de cDNA usando transcriptase reversa RevertAid (Fermentas) fazendo uso de oligonucleotideos hexamêricos randômicos.

Para testar a qualidade do cDNA obtido, foi amplificado por PCR convencional o gene considerado como controle interno, seryl-tRNA sintetase “K1”. Como controles negativos foram utilizadas as reações de RT-qPCR com os mesmos oligonucleotídeos, sem transcriptase reversa.

4.21 Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real

Os oligonucleotídeos específicos para cada gene foram desenhados baseados nas sequências de mRNA dos genes anotados no Plasmodb.org, usando o programa Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). A eficiência dos pares de oligonucleotídeos foi testada com DNA genômico de *P. falciparum* da cepa NF54 usando diferentes diluções onde o Ct

(*threshold cycle*, que o ciclo da PCR onde a reação entra na fase exponencial e o amplicon começa a emitir fluorescência pela intercalação de SYBR Green acima do *background*) podia *var*iar de +/- 1 entre pares de oligos diferentes.

Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados 50 ng de RNA convertido para cDNA (por reação individual), em SYBR Green Master Mix (Fermentas) e os experimentos foram conduzidos no aparelho Realplex 2 (Eppendorf) segundo as instruções do fabricante.

Todas as reações tanto para cada gene foram feitas em triplicata e um controle negativo. Os dados foram analisados usando a formula $2^{-\Delta CT}$ em relação ao controle endógeno "K1" (PF3D7_0717700) segundo proposto por Livak e Schmittgen [67].

4.22 Análises estatísticas

Para calcular se havia diferencias entre as parasitemias em diferentes condições foi feito o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis que compara medias entre mais de 3 grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Sincronização de *P. falciparum*

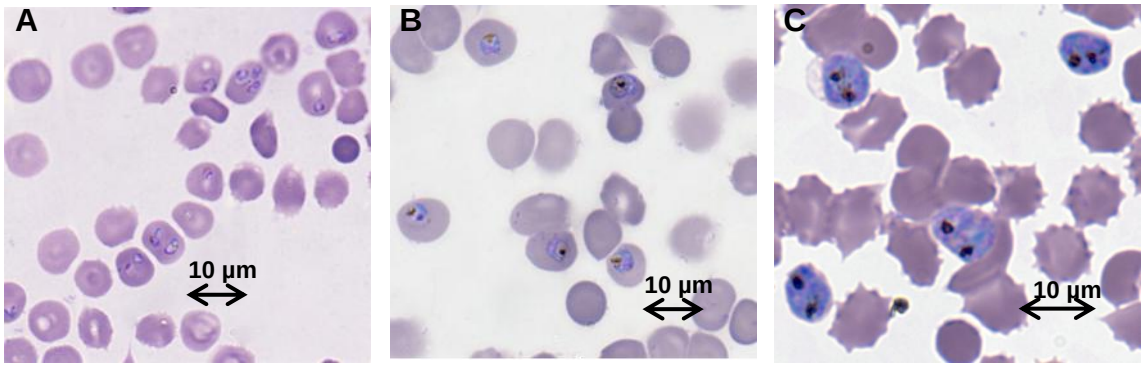


Figura 10. Parasitas sincronizados nas três diferentes fases intraeritrocíticas. Estas formas foram monitoradas por esfregaços corados com kit Panótico Rapido por microscopia com ampliação de 1000X com objetiva de imersão. A. Parasitas em fase anel. B. Trofozoitos. C. Esquizontes**.** Tratamento com sorbitol 5% leva a purificação de parasitas como mostrados em A, enquanto flotação com Voluven 6%/plasmagel leva a purificação de predominantemente parasitas como em C e um pouco de formas em B.

Com o objetivo de obter parasitas sincronizados em diferentes fases do ciclo intraeritrocítico os parasitas foram tratados com voluven para selecionar esquizontes e em sorbitol para recuperar anéis de 4 a 8 horas após reinvasão (metodologia descrita) e mantidos em condições normais de cultivo. Pelo uso destas duas metodologias foram obtidas culturas altamente sincrônicas que foram monitoradas por esfregaço sanguíneo. Para transfecção de parasitas, analise da transcrição de genes *var*, extração de proteínas para western e ensaios de retirada do Shield-1 e adições de glucosamina foram usadas culturas com mínimo 80% de parasitas sincrônicos (figura 10).

5.2 Transfecção em *P. falciparum*

Os vetores inicialmente construídos (pPF3D7_1143100_GFP_HA_DD24, pPF3D7_1143100_HA_loxTerm, pPF3D7_1143100_HA_glmS, pP14_1466400_GFP_HA_DD24, pPF3D7_1466400-HA-glmS e pPF3D7_1466400_HA_loxTerm) foram transfectados seguindo a metodologia descrita. Neste ponto os eventos de recombinação (esquematizados na figura 9) foram cruciais para atingir o objetivo de controlar a expressão dos genes já que apenas o plasmídeo integrado leva à expressão do transgene modificado (que permite controlar tanto o transcrito quanto a proteína

alvo), devido aos plasmídeos não possuirem as regiões promotoras dos genes ApiAP2 a expressão das diferentes modificações não ocorre quando o vetor ainda está em forma circular no parasita. Portanto, era de se esperar que parasitas transfectados com o vetor pApiAP2_GFP_HA_DD24 expressassem proteínas ApiAP2 com a etiqueta de HA (epitope principal de hemaglutinina), um domínio GFP (*green fluorescence protein*) e o domínio desestabilizador DD24 que tornaria a proteína instável na ausência do ligante Shield-1. Já nos parasitas transfectados com o vetor pApiAP2_HA_loxTerm, os genes adquirem um novo terminador flanqueado por sítios loxP e expressam uma proteína fusionada à etiqueta HA (figura 9. A). Por fim, em parasitas com a sequência da ribozima glmS espera-se que há a presença de uma etiqueta HA e no transcrito do gene alvo esteja presente a ribozima que converte o transcrito instável na presença de N-Acetil glucosamina.

Depois de repetidas transfecções foram obtidas as linhagens de parasitas transgênicos (resistentes à droga WR99210) NF54::PF3D7_1466400_HA_LoxTerm, NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS, NF54::PF3D7_1143100_HA_LoxTerm, NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS e NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24. O plasmídeo pPF3D7_1466400_GFP_HA_DD24 foi transfectado quatro vezes, porém, não foi possível obter uma linhagem inicial transfectada de forma estável.

As demais culturas foram cicladas com adição intermitente de WR99210, como descrito na metodologia, com o objetivo de obter apenas parasitas que integraram os plasmídeos no *locus* de interesse por recombinação simples. Porém, foi observado que as linhagens NF54::PF3D7_1143100_HA_LoxTerm e NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS não sobreviveram à readição de WR99210 após o primeiro ciclo, indicando que talvez estes parasitas carregassem os plasmídeos em formas episomais e não havia ocorrido a recombinação por homologia, fazendo com que, quando cultivados na ausência da droga, perdessem os vetores que lhes conferiria resistência e em uma nova adição de WR99210 os parasitas não sobreviveriam.

5.3 Confirmação de integração dos plasmídeos

Após quatro ciclos de retirada e reintrodução da droga WR99210 para seleção de parasitas recombinantes e eliminação de parasitas com plasmídeos episomais foi testada a integração no *locus* por PCR, Western blot e microscopia nas linhagens NF54::PF3D7_1466400_HA_LoxTerm, NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS, e

NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 que foram as únicas que sobreviveram às ciclagens.

Para confirmação por PCR foram extraídos os gDNA das três linhagens e feitas diferentes reações com pares de oligonucleotídeos dentro e fora dos plasmídeos integrados, usando como controles gDNA de parasitas selvagem (NF54) e o plasmídeo usado para cada transfecção. Na figura 11 observa-se que houve a integração no *locus*, já que os oligos "check" para cada gene e rev HA (para as linhagens NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS e NF54::PF3D7_1466400_HA_LoxP) ou revDD (para a linhagem NF54::PF3D7_1143100_GPF _HA _DD) apenas amplificaram usando DNA dos transfectados, pois os plasmídeos não continham as sequências de hibridação dos oligos "check" e o parasita selvagem não possuia a sequência do HA ou DD. Porém, as três linhagens ainda apresentavam formas circulares do plasmideo, já que, quando usados oligos especificos para amplificarem apenas as formas episomais, foi observada uma banda na mesma altura tanto nos plasmídeos controles quanto nos parasitas transfectados, indicando que ainda existia uma mistura de parasitas com loci integrados e epissomais.

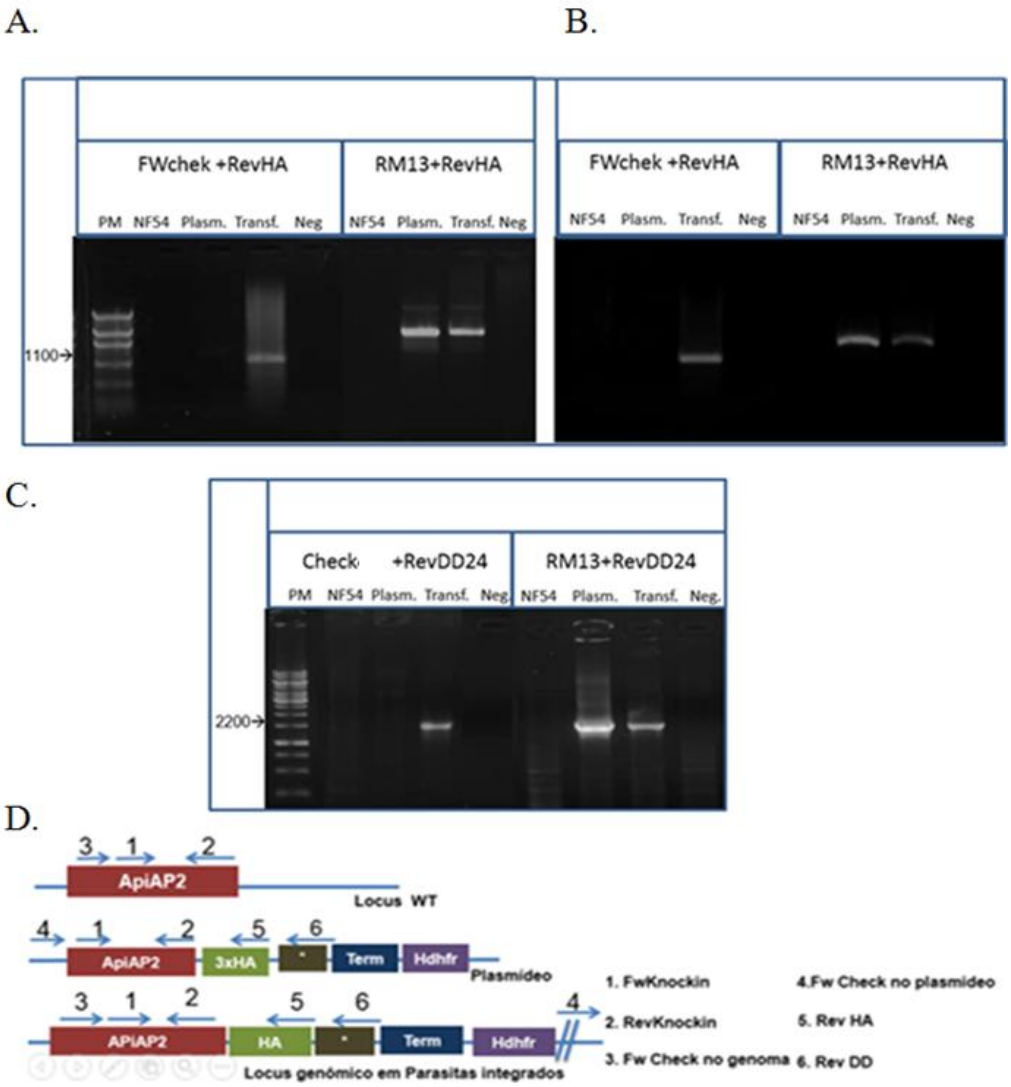


Figura 11. NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS, NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS e NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 mostra formas integradas dos plasmídeos transfectados. A, B e C respectivamente. Reações de PCR usando dois pares diferentes de oligos esquematizados em D. Uma combinação do oligo reverso HA ou DD com o "check oligo" especifico para cada gene que está ausente no plasmídeo. Como esperado, amplificou apenas nos parasitas transgênicos, já que o DNA genômico de NF54 selvagem não possui as sequências HA/DD e o plasmídeo não contém a sequência do Oligo check. Na segunda reação foram utilizados os reversos HA/DD com o oligo RM13 localizado no plasmídeo, antes da região do oligo knock-in, esta reação que detecta a presença de plasmídeos epissomais amplificou tanto no plasmídeo quanto nos transfectantes, o que significa que apesar de ter parasitas integrados, ainda havia parasitas com formas episomais.

Para confirmar a correta expressão das proteínas foi feito um Western Blot usando o anticorpo especifico anti-HA que reconhece o peptideo HA presente nas extrações proteícas das linhagens NF54::PF3D7_1466400_HA_LoxTer, NF54::PF3D7_1466400_glmS e NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD. Também foi observada a expressão de proteínas quiméricas contendo o domínio GFP na linhagem NF54::PF3D7_1143100 _GFP_HA _DD, por microscopia de fluorescência. (Figura 12).

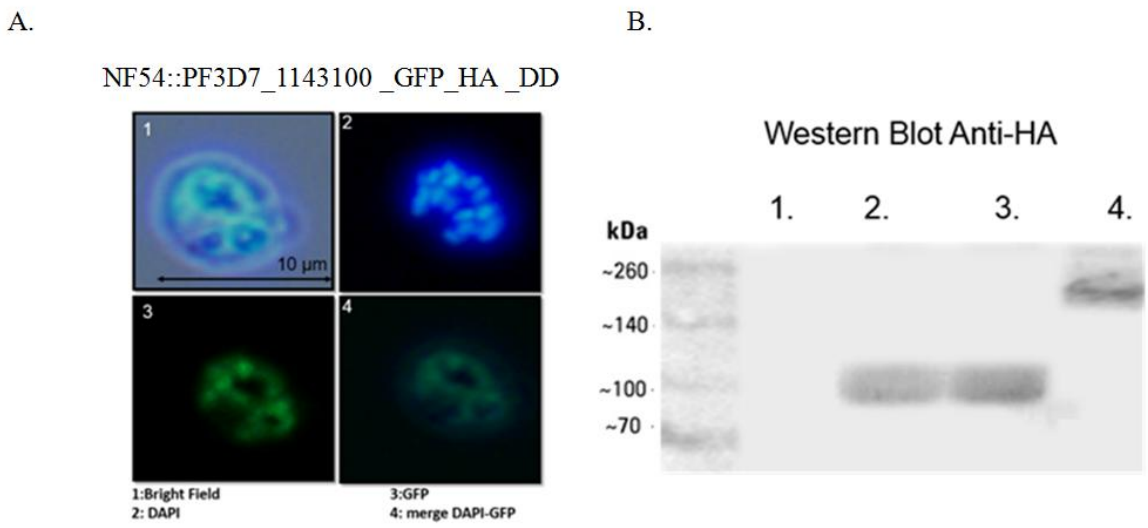


Figura 12. Expressão de proteínas quiméricas nas linhagens transgênicas. A. Parasitas transgênicos expressando GFP. B. Western blot para identificar a expressão de proteínas através da etiqueta de HA. B.1 controle negativo NF54. B.2 NF54::PF3D7_1466400_HA_LoxP. B.3. NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS. B.4. NF54::PF3D7_1143100 _GFP_HA _DD.

5.4 Linhagens clonais de parasitas transgênicos

Para obter parasitas 100% integrados de cada linhagem, foram feitas diluições seriadas até obter aproximadamente 30 parasitas em 10 ml de cultivo, que foram distribuídos em placas de 96 poços e mantidos em condições normais de cultura durante duas semanas na ausência de WR99210. Depois foram confirmados os poços com parasitas por esfregaço. Quando o número de poços positivos foi menor que 30 estes foram aumentados, e submetidos à pressão da droga novamente. Linhagens clonais que sobreviveram foram analisadas por PCR para confirmar qual ou quais destes eram clones sem formas epissomais.

A linhagem NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS foi clonada em repetidas ocasiões e apesar de observarmos poços positivos não foi possível expandir as culturas quando adicionada a droga.

No caso da clonagem do NF54::PF3D7_1466400_LoxTerm foram encontrados 22 clones os quais foram crescidos durante duas reinvasões na presença de WR e apenas 5 sobreviveram, indicando que os outros 17 provavelmente foram parasitas com formas episomais que perderam o plasmídeos durante as duas semanas que cresceram sem a droga.

Na figura 12 é mostrado o PCR realizado para estes clones. A primeira reação foi feita apenas para amplificar o gene com o oligo “check” e o reverso observando-se um padrão de bandas do mesmo tamanho, tanto dos clones quanto no parasita selvagem (figura 13A). Para saber qual destes clones tinha a versão integrada do plasmídeo no *locus* original foi usado

uma combinação do oligo “check” e o reverso HA (figura 13B). Nesta reação se observou que todos amplificaram, indicando que provavelmente estes não eram mais culturas mistas, tendo em conta que eram produtos de um único parasita. Finalmente, para confirmar que estes parasitas tiveram o locus em questão modificado integrados e não possuíam mais epissomos, foi feito um terceiro PCR usando os oligos específicos para amplificarem nestas formas (figura 13C). Interessantemente todos os clones também amplificaram nesta reação. Tendo em conta que a clonagem apresentou 22 poços positivos dos quais 5 sobreviveram à droga, pode se inferir que cada um era produto de um único parasita. Por isso, neste caso seria pouco provável que estes clones fossem culturas mistas de formas epissomais e integradas, razão pela qual se acredita que houve uma integração homóloga de dois plasmídeos no *locus* original o que levou à duplicação do plasmídeo integrado.

Esta hipótese seria confirmada através de um southern blot usando o fragmento 3’ do gene PF3D7_1466400. No entanto, primeiramente foi feito um western blot para observar se essa possível dupla integração não impedia os parasitas de expressarem proteínas quiméricas com a etiqueta HA. Como controle negativo foi utilizada extrato protéico de NF54 selvagem e como controle positivo proteína extraída da linhagem NF54::pRESA_GFP_HA (linhagem clonal previamente obtida no laboratorio) que contém a proteína RESA (*ring infected erythrocyte surface antigen*), fusionada a etiqueta de HA. Na figura 12C observa-se que nenhum dos clones estava expressando proteínas com HA o que nos leva a pensar que no momento da recombinação houve alguma mutação que alterou o marco de leitura e fez com a proteína não fosse traduzida corretamente. Já que o controle positivo é reconhecido pelo anticorpo Anti-HA foi descartada a possibilidade do anticorpo não funcionar. Estes clones foram congelados e não se procedeu a fazer o Southern blot já que não seria possível usar estes para os ensaios de silenciamento do gene.

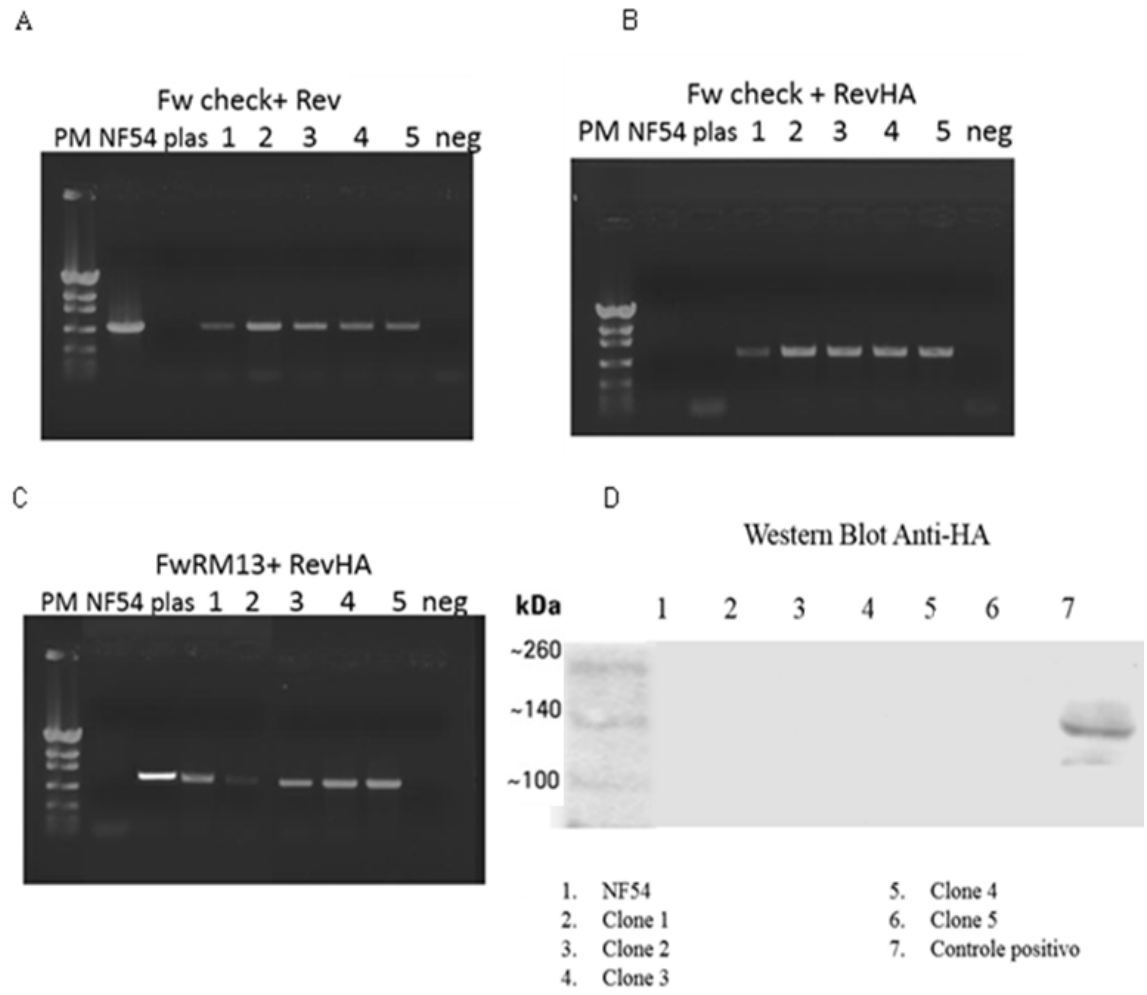


Figura 13. Confirmação da integração em linhagens clonais de NF54::PF3D7_1466400_HA_LoxP e da expressão de proteínas com etiqueta de HA. A. Amplificação do locus de interesse usando como controle positivo DNA selvagem. B. Amplificação do plasmídeo integrado no *locus* original. C. Amplificação dos oligos HA e RM13, para detectar a presença de formas epissomais. D. Western blot.

Já na linhagem NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 foram obtidos 15 clones que cresceram durante duas reinvasões na presença de WR e apenas 7 sobreviveram. Na figura 14 é mostrado o PCR feito para estes clones. Na primeira reação, feita apenas para amplificar o gene com o oligo "check" e o reverso, observa-se um padrão de bandas do mesmo tamanho, tanto dos clones quanto no parasita selvagem (figura 14A). Para observar versões integradas do plasmídeo no *locus* original foi usado uma combinação do oligo "check" e o reverso DD (figura 14B). Nesta reação foram observados amplicones no tamanho esperado em todos os clones. Não foram observadas bandas no plasmídeo nem no parasita selvagem por não possuírem as sequências de hibridação dos oligo "check" e o DD respectivamente. Finalmente, para confirmar que estes parasitas eram integrados e não possuíam mais epissomos, foi feito um terceiro PCR usando os oligos específicos para amplificarem nestas

formas (figura 14C). Nessa vez foi observado que dois dos clones não carregavam mais formas episomais consistente com integração no *locus.* Para confirmar a correta expressão da proteína foi feito um western blot usando o anticorpo anti-HA (figura 14 D) e observou-se uma banda no tamanho esperado apenas num deles o qual foi escolhido para os experimentos de silenciamento do gene. Estes resultados mostraram que foi obtida uma linhagem clonal de parasitas que integraram o plasmídeo provavelmente de forma correta no gene de interesse.

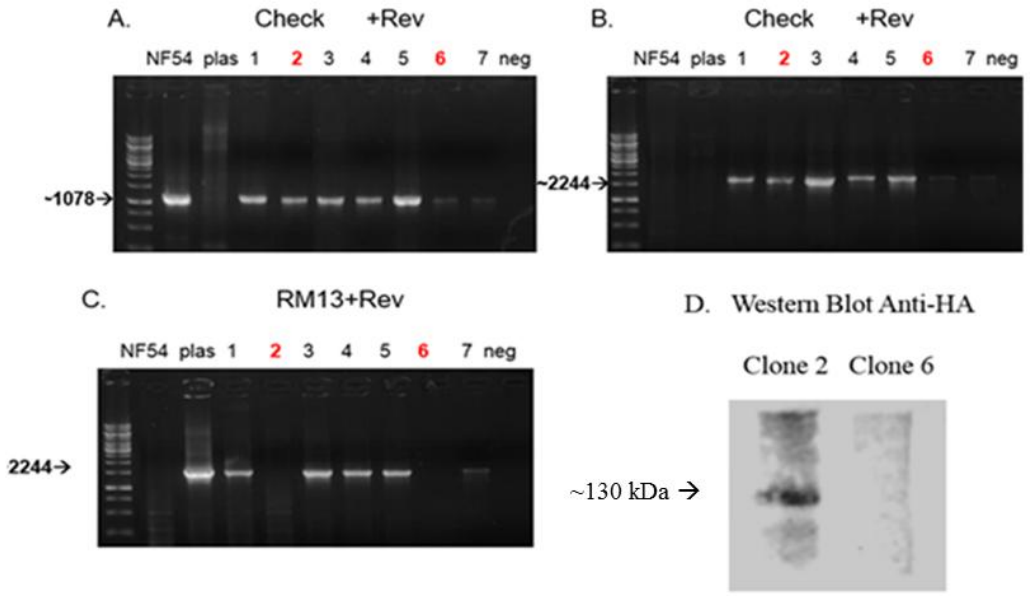


Figura 14. Figura 12. Confirmação da integração em linhagens clonais de NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 e da expressão de proteínas com etiqueta de HA. A. Amplificação do locus de interesse usando como controle DNA selvagem e o Plasmídeo usado para transfecção. B. Amplifição do plasmídeo integrado no locus original. C. Amplificação usando os oligos revHA e RM13, para detectar a presença de formas episomais. D. Western blot.

5.5 Obtenção de parasitas integrados usando os plasmídeos pHHTK_ApiAP2_glmS

Devido às dificuldades no decorrer das transfecções e clonagens, foram construídos novos vetores que permitiriam a recombinação e obtenção de parasitas transgênicos de uma maneira mais rápida e efetiva sem a necessidade de ciclar os parasitas com WR99210 de forma intermitente e possivelmente nem de clonar as linhagens.

Estes vetores foram desenhados na base do vetor pHHTK descrito por Duraisingh e colaboradores [66] onde o plasmídeo carrega a sequência da timidilato quinase que transforma ganciclovir em um análogo de nucleotídeo que é letal para a célula na qual está presente. Plasmídeos recombinantes, além de conterem a porção 3’ do gene de interesse

também contém uma parte da região 3’ UTR o que faz com que existam duas sequências homólogas ao genoma do parasita. Por fim estes vetores possuem a sequência da ribozima glmS escolhida para estratégia de silenciamento e a etiqueta de HA para posterior confirmação da expressão da proteína.

Os vetores construídos (pHHTK_PF3D7_1143100_HA_glms e pHHTK_PF3D7_1466400_HA_glmS) foram transfectados em parasitas selvagem como descrito nos métodos. Uma primeira seleção foi feita com a adição de WR99210 e depois de 18 a 20 dias foram observadas formas intraeritrocíticas do parasita nas duas linhagens (NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS_TK e NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS_TK) indicando que haviam parasitas que carregavam o plasmídeo. Depois de congelar as correspondentes alíquotas estas duas linhagens foram submetidas à seleção negativa por ganciclovir para eliminar parasitas contendo as formas epissomais pela toxicidade gerada por este composto na presença da timidilato quinase. Três dias após a adição da droga não foram mais observados parasitas e estes voltaram a aparecer apenas 14 a 18 dias depois indicando que todos aqueles que morreram eram parasitas com formas episomais e apenas aqueles com integração no *locus* de interesse sobreviveram por não possuírem mais a timidilato quinase. Para confirmar a integração do plasmídeo e a perda das formas epissomais foi extraído o gDNA das duas linhagens para análise por PCR usando diferentes combinações de oligos e a extração de proteínas para identificação por western blot. Os esquemas das reações são mostrados na figura 9 B.

No caso da linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS_TK, quando feita a reação para observar versões integradas do plasmídeo no *locus* original com os oligo “check” e rev HA, foram observadas bandas na altura correspondente apenas no gDNA dos parasitas transfectados em quanto que no DNA selvagem e o plasmídeo não foram observados produtos (figura 15 A). Em uma segunda reação, para identificar formas episomais foram usados oligos específicos para uma região da sequência timidilato quinase, presente apenas no plasmídeo, nesta vez foi observado um amplicon apenas na reação usando o plasmídeo como substrato (figura 15 B), indicando que essa linhagem possuía apenas versões integradas do plasmídeo e que aqueles parasitas com formas epissomais haviam sido eliminados pela adição de ganciclovir. Estes mesmos resultados foram observados na linhagem NF54::PF3D7_1466400 _HA_glmS_TK (figura 15 C-D). Finalmente, para confirmar que o plasmídeo havia integrado de maneira correta e a proteína era corretamente traduzida foi feito um western blot usando Anti-HA e observou-se a expressão da proteína marcada com a etiqueta de HA nas duas proteínas. (figura 15 E).

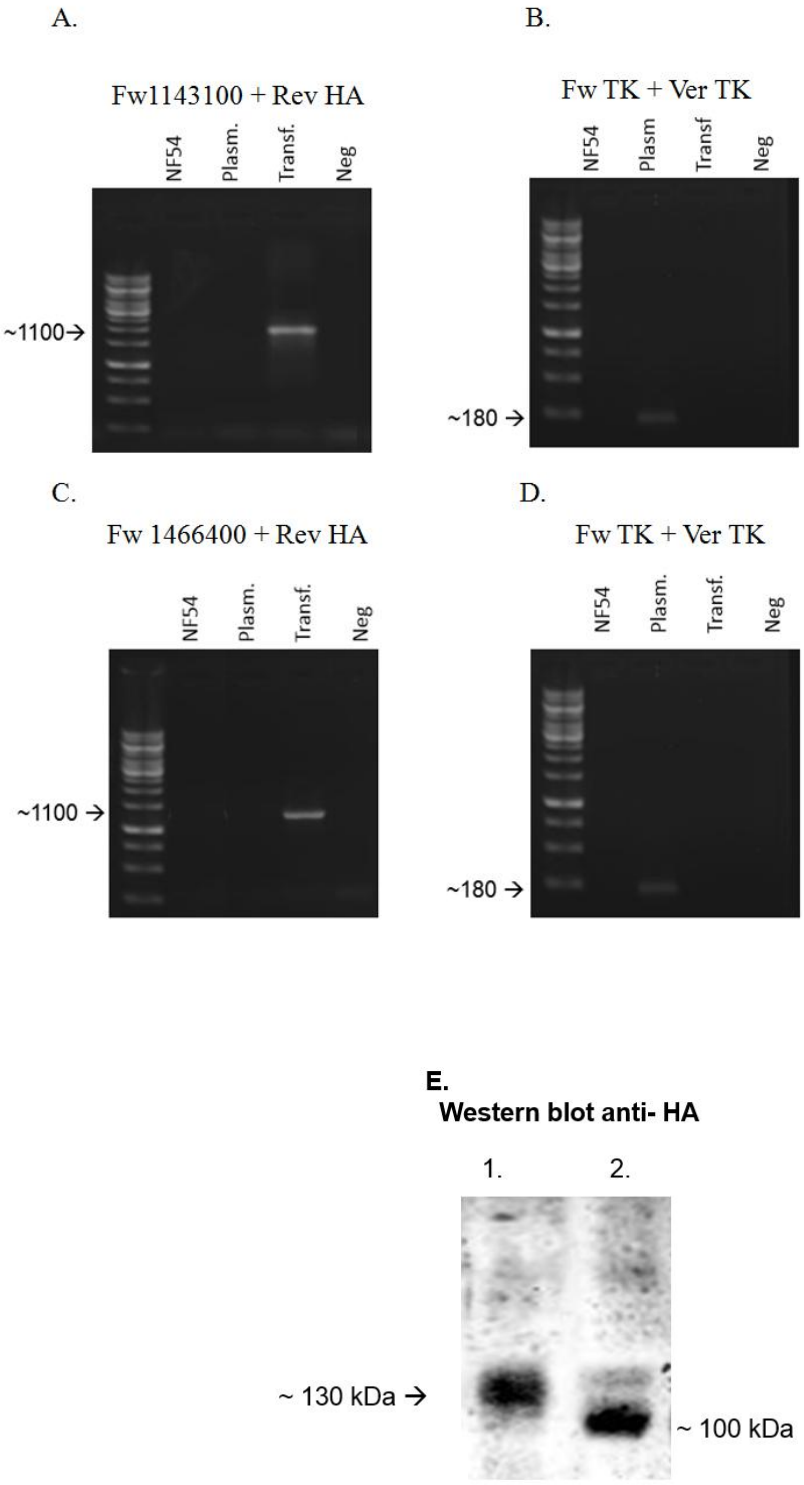


Figura 15. Confirmação da integração do plasmídeo no *locus* original nas linhagens NF54:PF3D7_1143100_HA_glmS_TK e NF54:PF3D7_1466400_HA_glmS_TK. A. PCR para amplificar formas integradas de NF54:PF3D7_1143100_HA_glmS_TK. B. Reação para confirmar a ausência de formas episomais. C. PCR para amplificar formas integradas de NF54:PF3D7_1466400_HA_glmS_TK. D. Reação para obse*rvar* formas epissomais. E. Western blot para identificar proteínas com a etiqueta de HA. E1. Extrato protéico da linhagem NF54:PF3D7_1143100_HA_glmS_TK. E2. Extrato protéico da linhagem NF54:PF3D7_1466400_HA_glmS_TK

Uma vez obtidas linhagens com parasitas com o lócus aprentemente modificado com sucesso procedeu-se a realização dos ensaios de silenciamento dos genes.

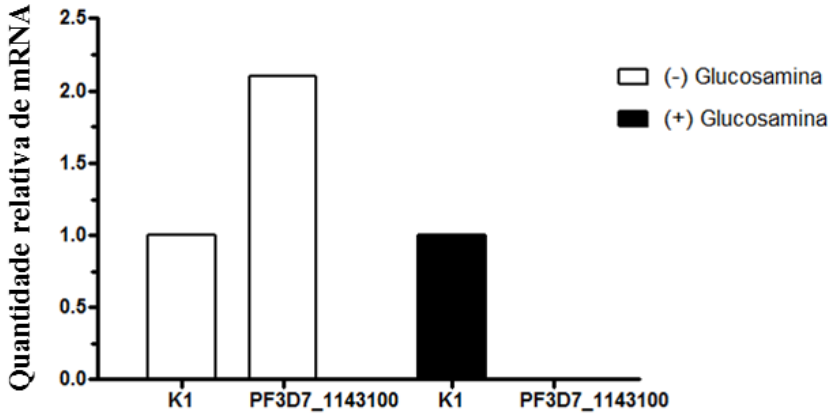
5.6 Elucidando o papel do fator de transcrição PF3D7_1143100

Já que foram obtidas duas linhagens transgênicas com este gene modificado, NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 NF54::PF3D7_1143100_HA_glms, primeiramente foi realizada uma avaliação dos dois sistemas de silenciamento com o intuito de observarmos se eram funcionais e aplicáveis para induzir o silenciamento do gene.

5.5.1 Avaliação do sistema glmS

Parasitas modificados com a inserção da ribozima glmS foram incubados por 72 horas com N-Acetil Glucosamina para induzir a auto-clivagem do transcrito e em consequência a não produção de proteína. A cada 24 horas foi coletada uma amostra de RNA para analisar a quantidade do transcrito alvo. Quando analisado o RNA extraído, foi observado que houve uma forte degradação do transcrito o que levou a não-produção da proteína evidenciando que o sistema era efetivo e podia ser usado como estratégia de knockdown. (figura 16).

A.



B.

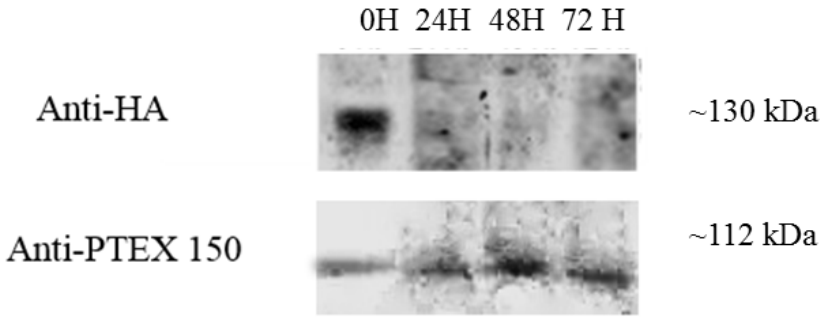


Figura 16. Silenciamento do gene PF3D7_1143100 induzido pela auto-clivagem da ribozima glmS na presença de N-Acetil glucosamina. A. Diminuição da quantidade de transcrito em parasitas transgênicos cultivados com o indutor observado por RT-PCR. K1 indica o controle endógeno do RT-qPCR. B. Western blot (Anti-HA e Anti-Ptex como controle endógeno) de amostras de parasitas não tratados (0 H) e tratados com 5 mM glucosamina por 24, 48 e 72 horas após a incubação com a mesma.

5.5.2 Avaliação da expressão de PF3D7_1143100 com domínio desestabilizador

Parasitas transfectados com o plasmídeo que contém o domínio DD24 foram incubados na ausência do ligante Shield-1. Espera-se que nestas condições o domínio perca estabilidade levando à degradação da proteína (Figura 17 A). Seguindo a metodologia descrita se procedeu a extrair proteína dos parasitas transfectados na presença do ligante após 24, 48 e

72 horas sem Shield-1 para confirmar por Western blot a diminuição progressiva da proteína. (Figura 17 B).

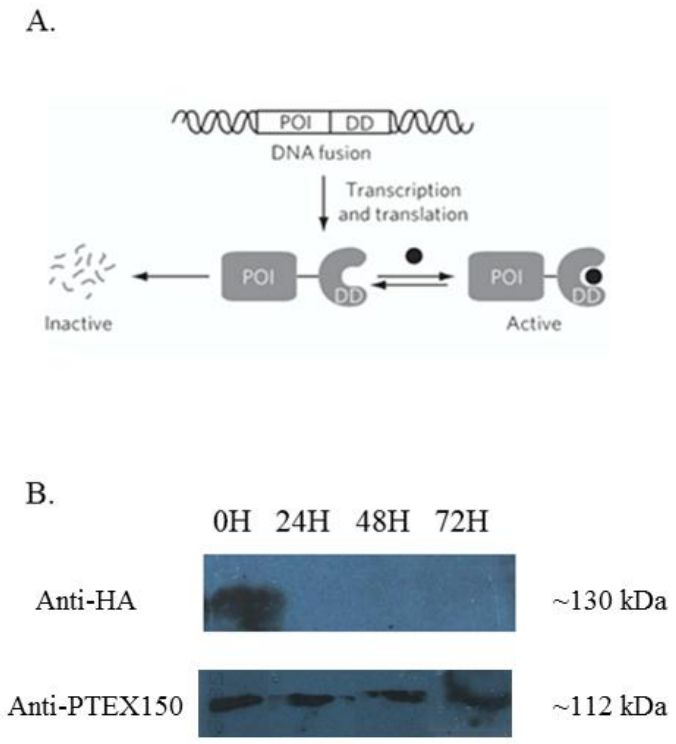


Figura 17. Degradação da proteína PF3D7_1143100 modificada com o domínio desestabilizador. A. Figura de Bonger e colaboradores [61], descrição da função do sistema DD. A. Molécula estabilizadora é um derivado da rapamicina denominado Shield-1. POI é a proteína de interesse que seria a proteína 1143100. B. Ensaio de retirada do Shield-1 durante 72 horas. Western Blot usando Anti HA para observar a degradação da proteína e Anti-Ptex150 como controle endógeno.

5.5.3 Fitness de P. falciparum após knockdown de PF3D7_1143100 induzido pela ribozima glmS e o domínio DD 24

Já que observamos que os dois sistemas de silenciamento eram funcionais foram feitos testes de sobrevivência para verificar se a proteína é essencial para o parasita e se seria possível analisar o papel deste suposto fator de transcrição na exclusão alélica dos genes *var*. Linhagens NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 e NF54::PF3D7_1143100_HA_glms foram sincronizadas em fase anel como descrito nos métodos e diluídas para parasitemias de 2%, seguido de incubação durante 72 horas tanto na presença de Shield-1 (para parasitas com domínio DD) e 5 mM N acetil glucosamina (para parasitas com a ribozima glmS), quanto na ausência dos mesmos. Também foram utilizados como controles parasitas selvagens incubados com os mesmos compostos. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas

biológicas e o desenvolvimento do parasita nestas condições foi monitorado por esfregaço corado com kit panotico rápido.

Ao monitorar o crescimento da linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glms quando incubada com N-Acetil glucosamina após 24 horas, foi observado que os parasitas não morriam e continuavam a se desenvolver normalmente indicando que o silenciamento do gene não levava a um fenótipo letal, porém, nem todos os parasitas apresentavam formas assexuadas comumente observadas nas culturas e foram observadas formas parecidas com gametócitos nas três replicatas em quantidades superiores a 20% (figura 18 A). Estas formas não foram observadas em parasitas da mesma linhagem sem o indutor e em parasitas selvagens incubados com glucosamina (figura 18 B-C). Isso parece indicar que os parasitas estavam se diferenciando nestas formas devido ao silenciamento do gene e não por causa da adição da glucosamina. As porcentagens foram aumentando conforme o período de incubação com glucosamina, apresentando taxas de conversão de mais de 60% após 72 horas de knockdown. (Figura 20). Mesmo depois de 72 h, parasitas tipo selvagem não apresentaram as formas parecidas com gametócitos.

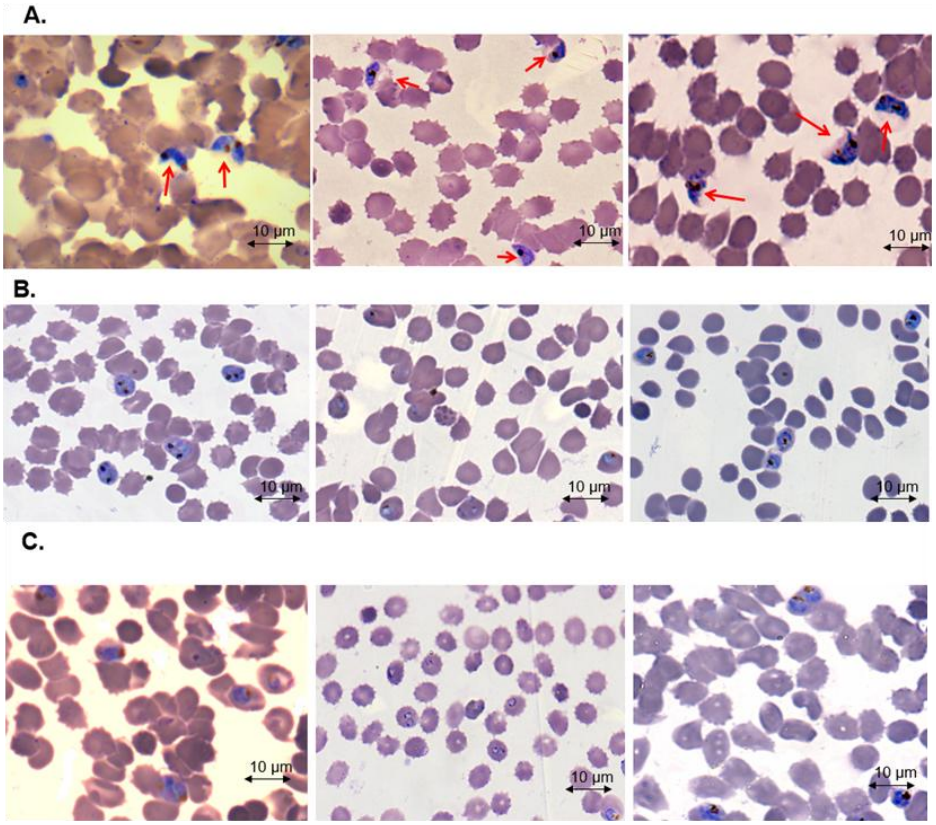


Figura 18. Diferenciação de parasitas na fase assexual em possíveis gametócitos após adição de N-Acetil glucosamina na linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS_TK. A. Parasitas transfectantes após 24, 48 e 72 horas de silenciamento do fator de transcrição PF3D7_1143100. Setas vermelhas apontam a formas parecidas com gametócitos B. Parasitas transfectantes após 24, 48 e 72 na ausência de N-Acetil glucosamina. C. Parasitas selvagens NF54 após 24, 48 e 72 horas de incubação com N-Acetil glucosamina.

Na linhagem NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 quando incubada sem Shield-1 também foi observado que os parasitas não morriam, confirmando que o silenciamento do gene não influencia na sobrevivência do parasita. Somado a isso foram observadas formas parecidas com gametócitos após 24 horas de incubação na ausência de Shield-1 (figura 19), cujas porcentagens foram aumentando ao longo do experimento observando-se taxas de conversão comparáveis com a linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glms quando incubada com N-Acetil glucosamina (figura 20). No controle NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 com adição de Shield-1 não foram evidenciadas estas formas ao longo do experimento.

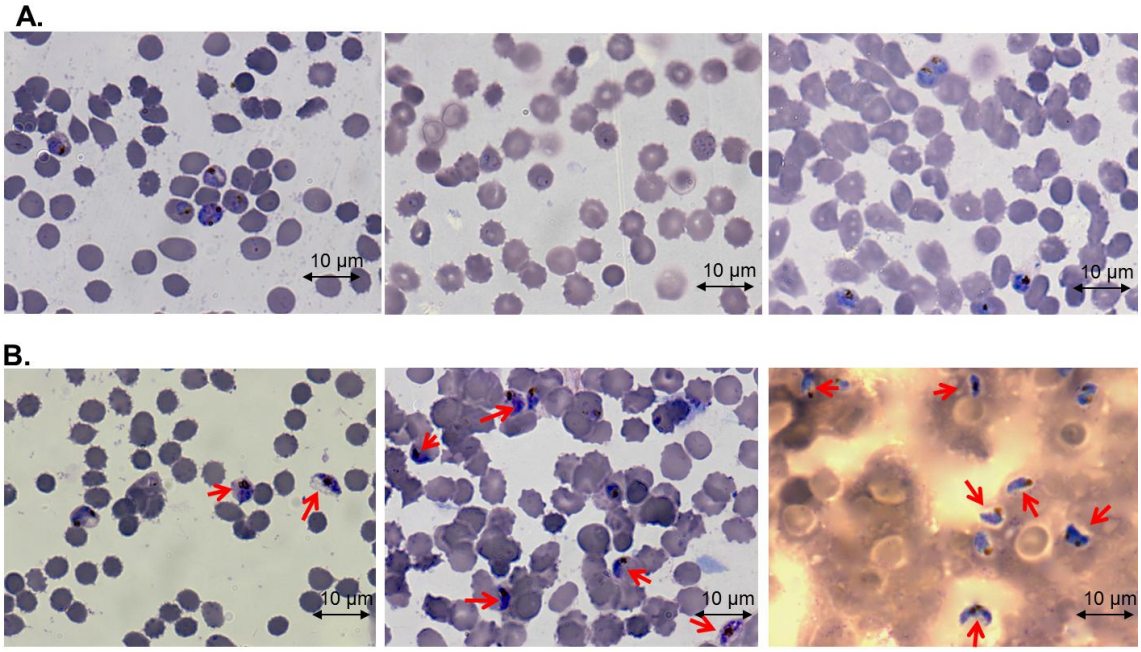


Figura 19. Diferenciação de parasitas na fase assexuada em possíveis gametócitos após retirada do Shield-1 na linhagem NF54::PF3D7_1143100 _GFP_HA _DD. A. Desenvolvimento do parasita ao longo de 72 horas na presenca de Shield-1. B. Formas observadas na ausência de Shield-1.

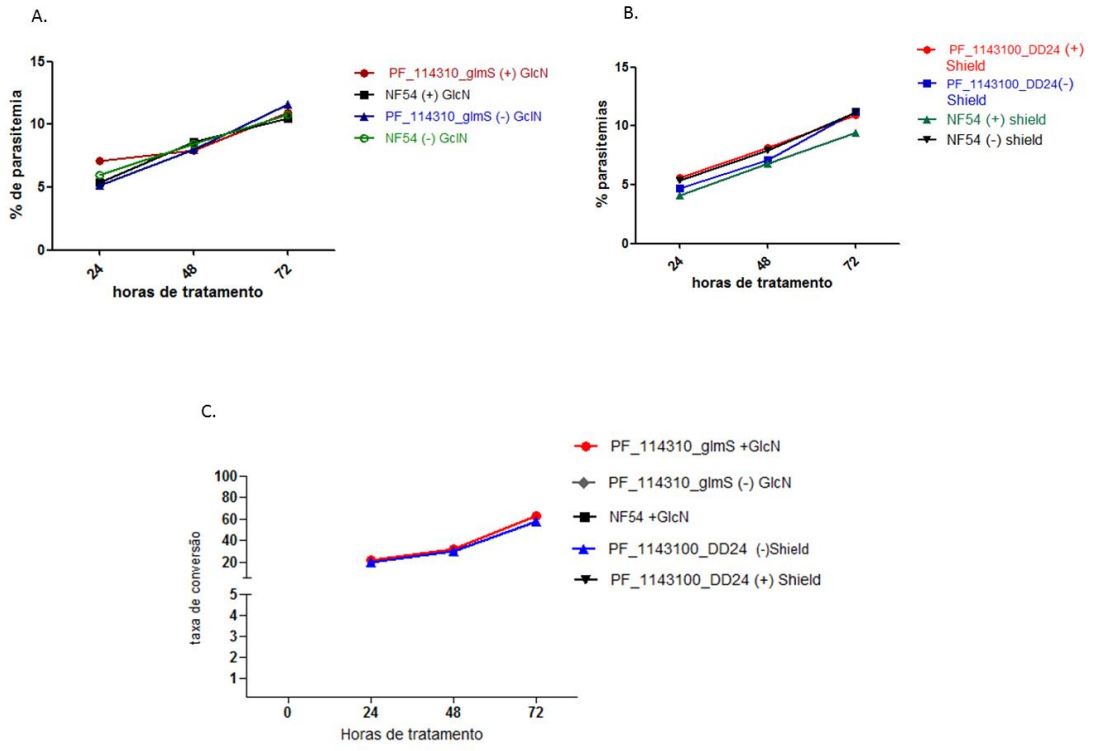


Figura 20. Efeito do silenciamento do gene PF3D7_1143100 ao longo de 72 horas. A. Curvas de parasitemia de parasitas NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS e NF54 selvagens na presença e ausência de N-Acetil glucosamina. B. Curvas de parasitemia de parasitas NF54::PF3D7_1143100_GFP_HA_DD24 e NF54 selvagens na presença e ausência de Shield-1. C. Taxas de conversão a formas parecidas com gametócitos em parasitas knockdown, controles e NF54 selvagem. Nota-se que nos controles com Shield-1, sem GlcN e selvagem não são observadas estas formas.

A observação destas formas após o tratamento com N-Acetil glucosamina e a retirada do Shield-1, pode ser atribuída à degradação do transcrito e a proteína respectivamente, porém, não podemos afirmar que estas formas são de fato gametócitos apenas com a visualização microscópica. Levando em consideração que a transcrição de determinados genes tem sido associada ao desenvolvimento de fases iniciais de gametócitos, especificamente quando o factor de transcrição PfAP2-G (tambem membro da familia ApiAP2) é expresso [6], foi testado se o knockdown de PF3D7_1143100 também regulava os transcritos induzidos na presença de PfAP2-G, assim como a transcrição do próprio PfAP2-G. Para isso foram desenhados oligos (tabela 3) para amplificar este fator de transcrição e cinco dos genes associados ao desenvolvimento das primeiras fases de gametócitos. O RNA de parasitas incubados com/sem N-acetil-glucosamina ou Shield-1 foi coletado e a transcrição destes genes foi analisada por RT PCR.

Table 2 Oligonucleotídeos para RT-PCR de genes associados ao desenvolvimento das primeiras fases de gametócitos

ApiAP2G	
left primer	TGTTCTGTACCTGTAGTTGTGGA
right primer	TCACACTTTGTTTACTTCCGGT
Marcadores de Gametocitos	
Pfg14-744	
left primer	ATGGCTCTGTTGACGGAAGAAA
right primer	AGCAAGTACTAATTCAGAGAGGCT
Pfs16(Pf_040620)	
left primer	CTCTCTTCATGCTGTTGGACCT
right primer	AGCTAGCTGAGTTTCTAAAGGCA
Pfg27-25	
left primer	ATGAAACACATGCCCCTCTC
right primer	GGATCCTTGCTAAGGGTCATC
PfGEXP17	
left primer	TGGTGAACCCAAAAGTTGTT
right primer	TGCTCTTTTGTCAACTGTATGGA
PfGEXP02	
left primer	AGTTGCCCCACATCTTTCTG
right primer	GAGCATAAGAAAAACAAAAGCAA

Nos dois casos (NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS_TK e NF54::PF3D7_1143100 _GFP_HA _DD) o knockdown do gene teve um efeito misto nos transcritos associados a gametócitos: enquanto que não foi observada diferença nas quantidades de transcritos de PfAP2-G, todos os genes previamente associado com o desenvolvimento de gametócitos foram encontrados em quantidades relativas significativamente maiores (Figura 21). A transcrição de Pfs16 parecia induzida até 50-100 vezes quando comparada com o tipo selvagem ou parasitas transfectantes cultivados sem N-acetil-glucosamina ou com Shield-1.

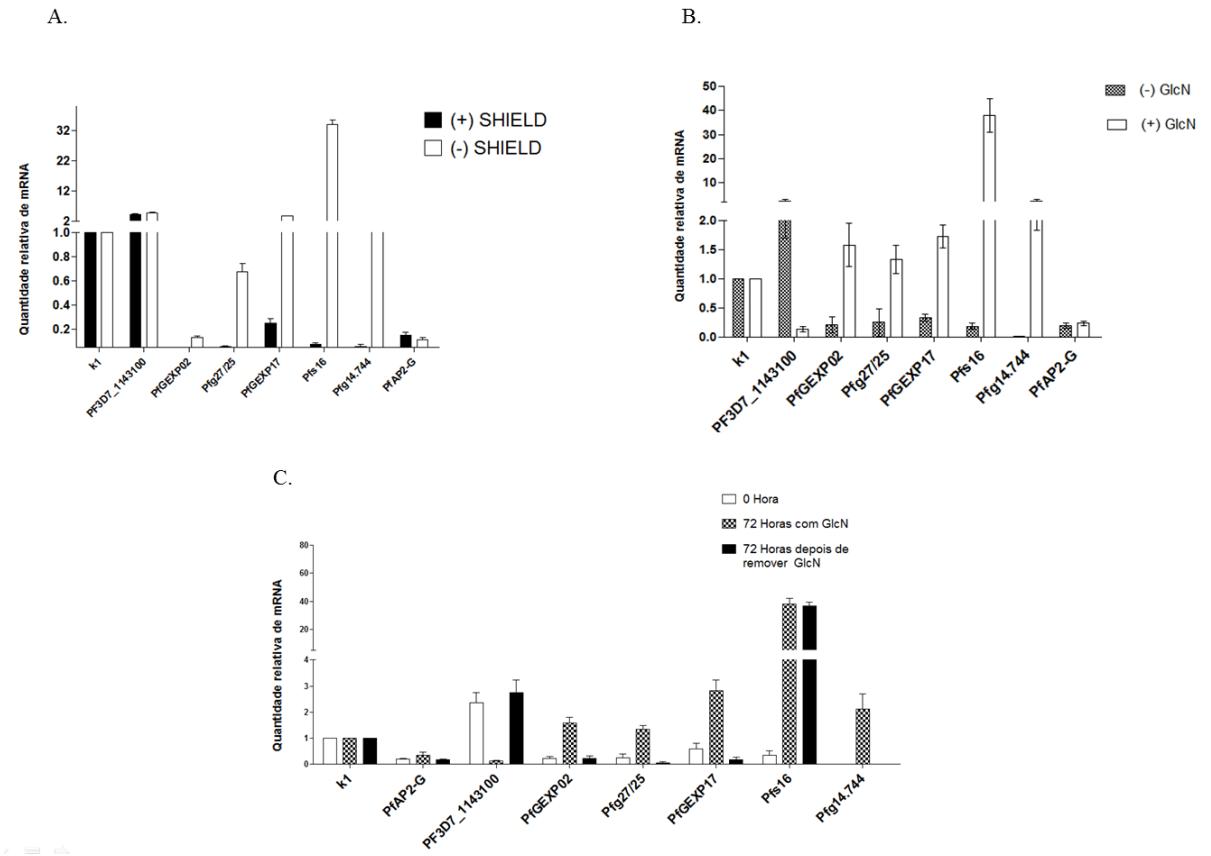


Figura 21. Análise do efeito do silenciamento de PF3D7_1143100 na transcrição de genes associados às primeiras fases de formas sexuadas de *P. falciparum*. A. Perfil de transcrição de genes específicos de formas sexuadas com e sem Shield-1. B. Quantificação de transcritos na presença de N-acetil glucosamina. C transcrição de genes associados a gametócitos 72 horas depois do knockdown mediado pelo efeito da ribozima glmS. Este último resultado é representativo de 3 experimentos.

Para observarmos o perfil de transcrição destes genes após o knockdown de PF3D7_1143100 foi coletado o RNA de parasitas 72 horas depois da retirada da N acetil glucosamina. Observou-se que com a exceção de Pfs16, que se manteve em quantidades elevadas, todos os transcritos retornaram aos níveis observados antes do tratamento com N acetil glucosamina (figura 21 C).

5.5.4 O papel do fator de transcrição PF3D7_1143100 na transcrição de genes var

Para verificarmos se o knockdown de PF3D7_1143100 tinha algum efeito na transcrição dos genes *var*, a linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS foi selecionada para conter parasitas que expressavam dominantemente o *locus var* PFD_0615c. Isto foi realizado por cinco ciclos de seleção de hemácias infectadas para aderirem em células CHO, que expressam o receptor CD36 humano como descrito na metodologia. As culturas foram submetidas ou não ao tratamento de N-acetil glucosamina e o RNA foi extraido de parasitas sincrônicos em estágio anel (10-14 h pi). Uma parte dos parasitas tratados com glucosamina

foi posteriormente submetida a um crescimento contínuo sem glucosamina e o seu RNA foi recuperado após 48 horas quando estavam novamente em fase anel.

Após o knockdown de PF3D7_1143100, um número de transcritos *var* apresentaram quantidades relativas significativamente maiores (ID antiga: PFC1120c, PFD0005w, PFD0625c, PFE1640w, PFL0005w, PFL0020w, PF13_0364) enquanto que um desapareceu (PFF1580c). O gene *var* inicialmente transcrito PFD_0615c diferiu pouco após o tratamento com N acetil glucosamina (figura 22). Analisamos se houve alguma preferência de localização cromossômica (upsA, B ou C) de indução de transcrição de genes *var* na ausência de PF3D7_1143100. Foi observado que a maioria dos genes *var* regulados eram membros do grupo subtelomerico upsB e centroméricos upsC, e apenas um (PFL0020w) era do tipo upsA / B.

5.5.5 Ausência temporária de PF3D7_1143100 leva a reorganização da transrição de genes var (“reset”) e apaga a memória epigenética

Posteriormente realizamos um experimento para observar se PF3D7_1143100 mantinha a memorial transcricional após o knockdown transiente. Para isto a N acetil glucosamina foi retirada do meio e os parasitas foram mantidos em condições normais de cultura durante 48 horas. Após este período o RNA destes parasitas em fase anel (10-12 h pi) foi coletado e a transcição dos genes *var* foi analisada pela técnica de RT PCR. Os resultados evidenciam que os genes *var* que estavam sendo predominantemente transcritos antes do tratamento com glucosamina (PF3D7_0412400 e PF3D7_0420700) não foram mais observados, indicando que a memória *var* foi completamente apagada. Em comparação, a mesma linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS selecionada para aderir a CHO-CD36, na ausência de glucosamina continuava a transcever os genes *var* PF3D7_0412400 e PF3D7_0420700 confirmando que nenhum evento de *switching* ocorreu no decorrer do experimento (figura 23).

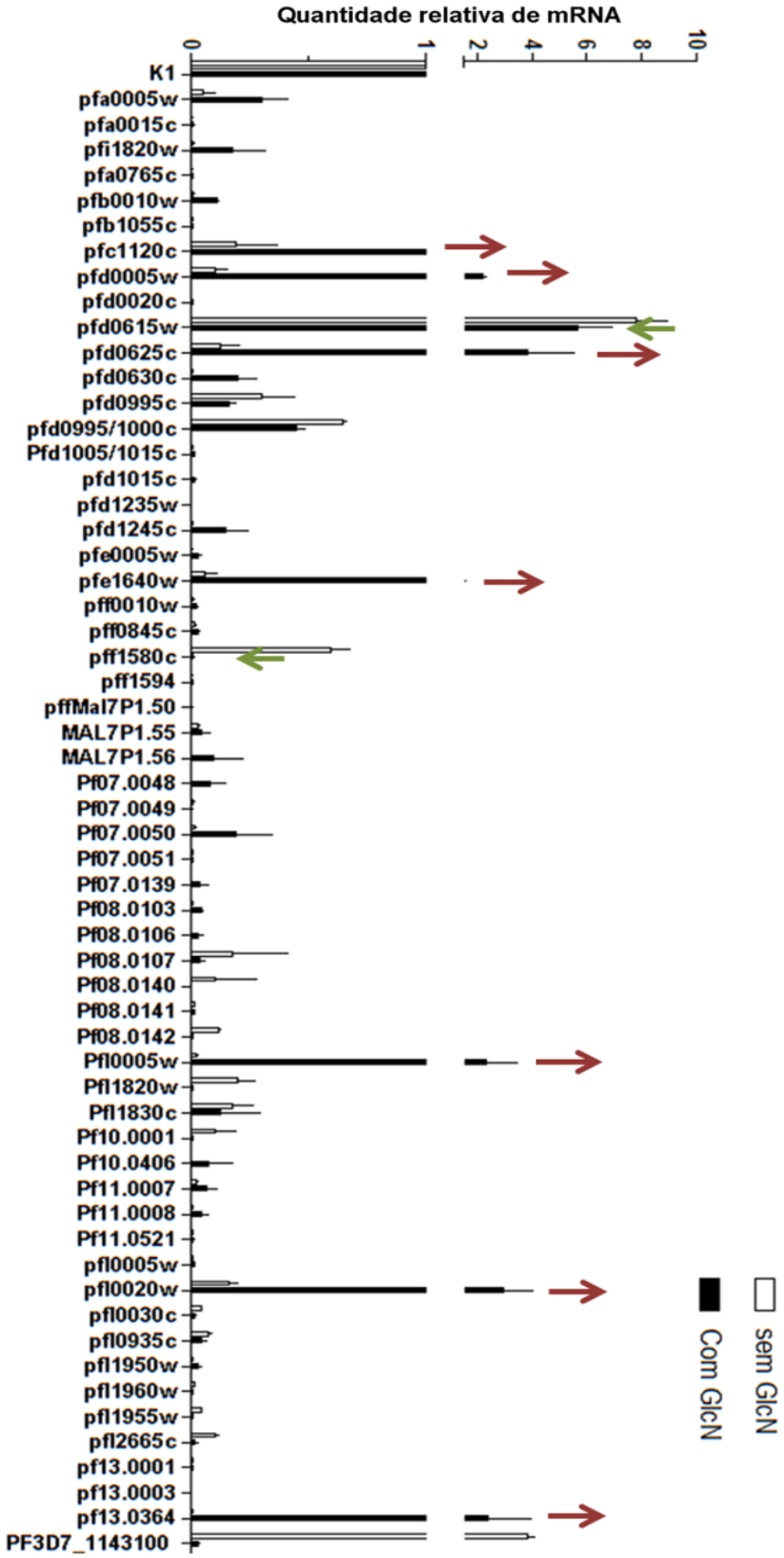


Figura 22. Perfil de transcrição de genes *var* na linhagem NF54::PF3D7_1143100_HA_glmS sem glucosamina e 72 horas após knockdown de PF3D7_1143100 induzido pela ribozima glmS na presença de glucosamina. As setas verdes indicam os genes silenciados e as setas vermelhas os induzidos pelo knockdown.

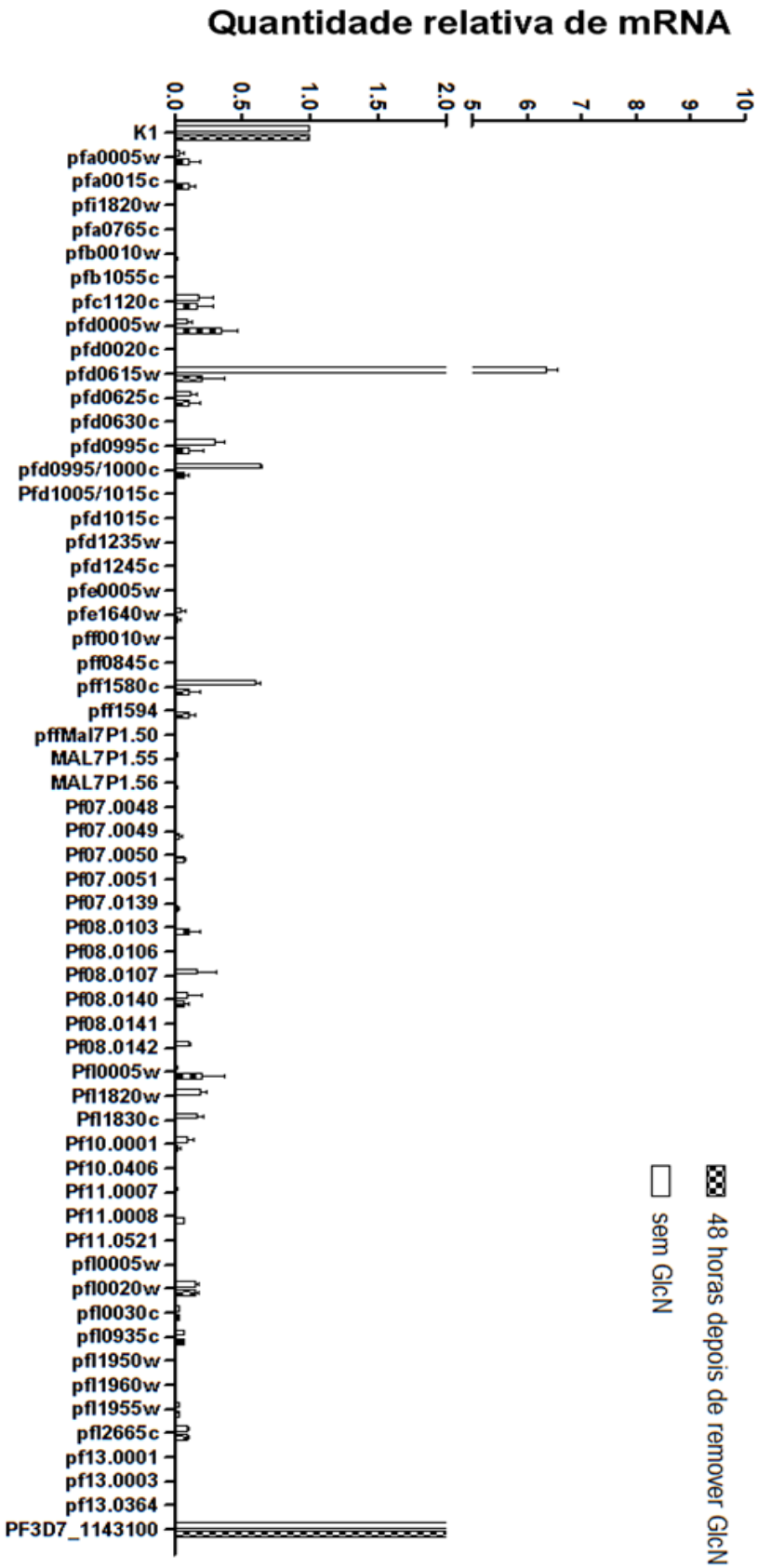


Figura 23. Perfil de transcrição de genes *var* após knockdown transiente de PF3D7_1143100.

5.6 Elucidando o papel do fator de transcrição PF3D7_1466400

Estes parasitas não puderam ser selecionados para expressar um único *var* gene mediante ensaios de citoadesão a celulas CHO devido aos problemas encontrados no decorrer das transfecções e ciclagens que impediram obter linhagens modificadas no periodo de tempo estabelecido. Por esta razão são apresentados apenas resultados dos ensaios de silenciamento e viabilidade dos parasitas após knockdown de PF3D7_1466400.

5.6.1 Avaliação do sistema glmS

Já que foi obtida a linhagem NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS que permitia controlar a expressão deste gene, primeiro foi feita uma avaliação do sistema glmS para obser*var* se o transcrito era degradado e em consequência a proteína não era produzida.

Parasitas sincrônicos em fase anel foram incubados com N acetil glucosamina durante 72 horas e o RNA foi extraído a cada 24 horas para posteriores análises por RT-PCR. Também foi analisada a expressão da proteína por western blot (figura 24). Foi evidenciado que o transcrito era degradado na presença de N acetil glucosamina que por sua vez não permitiu a expressão da proteína.

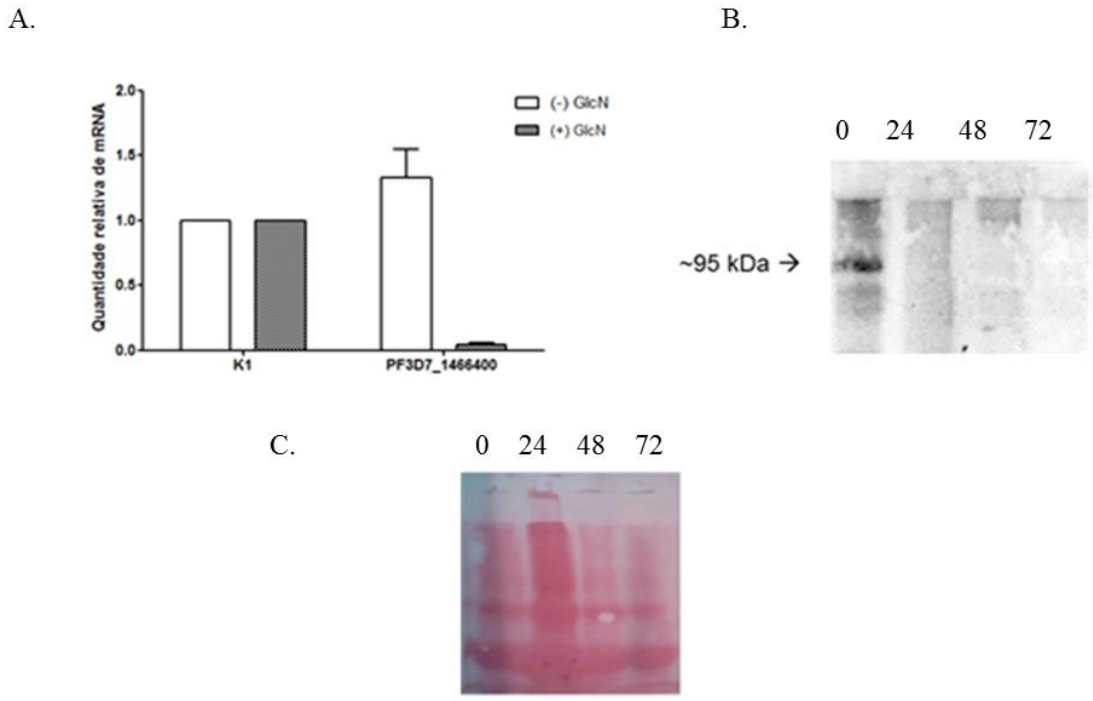


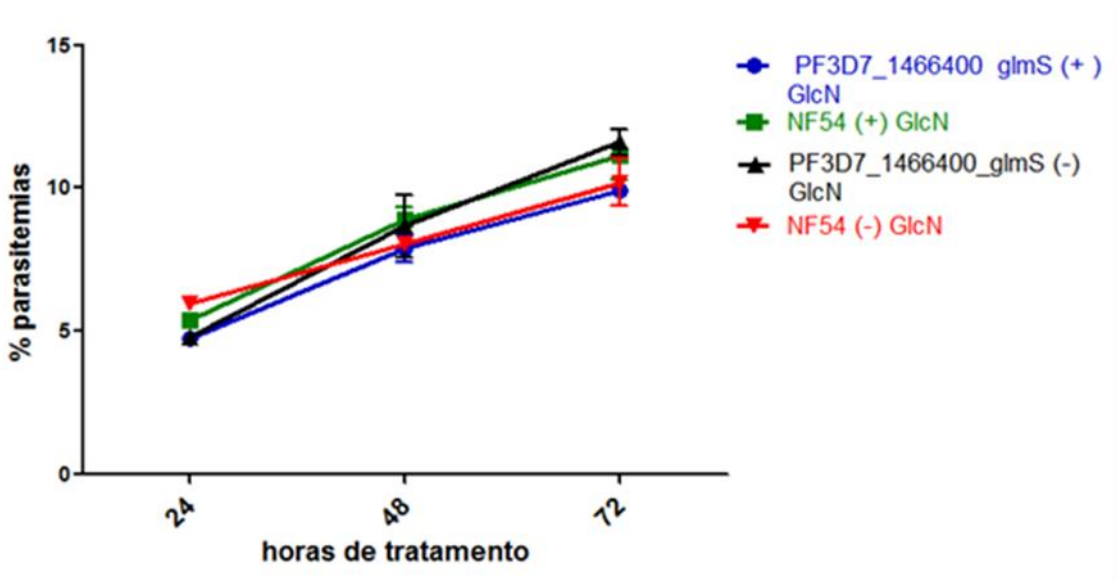
Figura 24. Efeito da N acetil glucosamina na transcrição do gene PF3D7_1466400 modificado. A. Degradação do transcrito induzida pela clivagem da ribozyma glmS analisada por RT-PCR. B. Western blot de parasitas antes do tratamento, 24, 48 e 72 horas depois da incubação com N acetil glucosamina. C. Marcação de Ponceau que permite observar proteínas transferidas em membrana de nitrocelulose.

5.6.2 *Fitness de P. falciparum após knockdown induzido pela ribozima glmS*

Para avaliarmos se a proteina era essencial para o parasita, foram conduzidos testes de sobrevivência. Parasitas da linhagem NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS foram sincronizados em fase anel como descrito em métodos e diluídos para parasitemias de 2%, seguido de incubação durante 72 horas na presença/ausência de N acetil glucosamina. Como controles foram utilizados parasitas selvagens. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas e o desenvolvimento do parasita nestas condições foi monitorado por esfregaço corado com kit panotico rápido.

Observamos que o silenciamento do gene não influenciava o desenvolvimento do parasito e que estes continuavam a crescer em porcentagens comparaveis com os controles, e quando submetidos à análise estatística não houve diferencia significativas emtre as parasitemias (P = 0,8629) (figura 25 A). Todos os parasitas pareciam formas comumente observadas na fase asexuada e não foram evidenciadas mudanças na morfologia dos mesmos ou dificuldade para reinvadir ou se desenvolver normalmente indicando que esta proteína nao é essencial na fase intraeritrocítica do parasito (figura 25 B). Neste momento estamos selecionando linhagens de parasitas NF54::PF3D7_1466400_HA_glmS para testar se há mudança no perfil de transcrição de genes *var* quando PF3D7_1466400 é diminuído.

A.



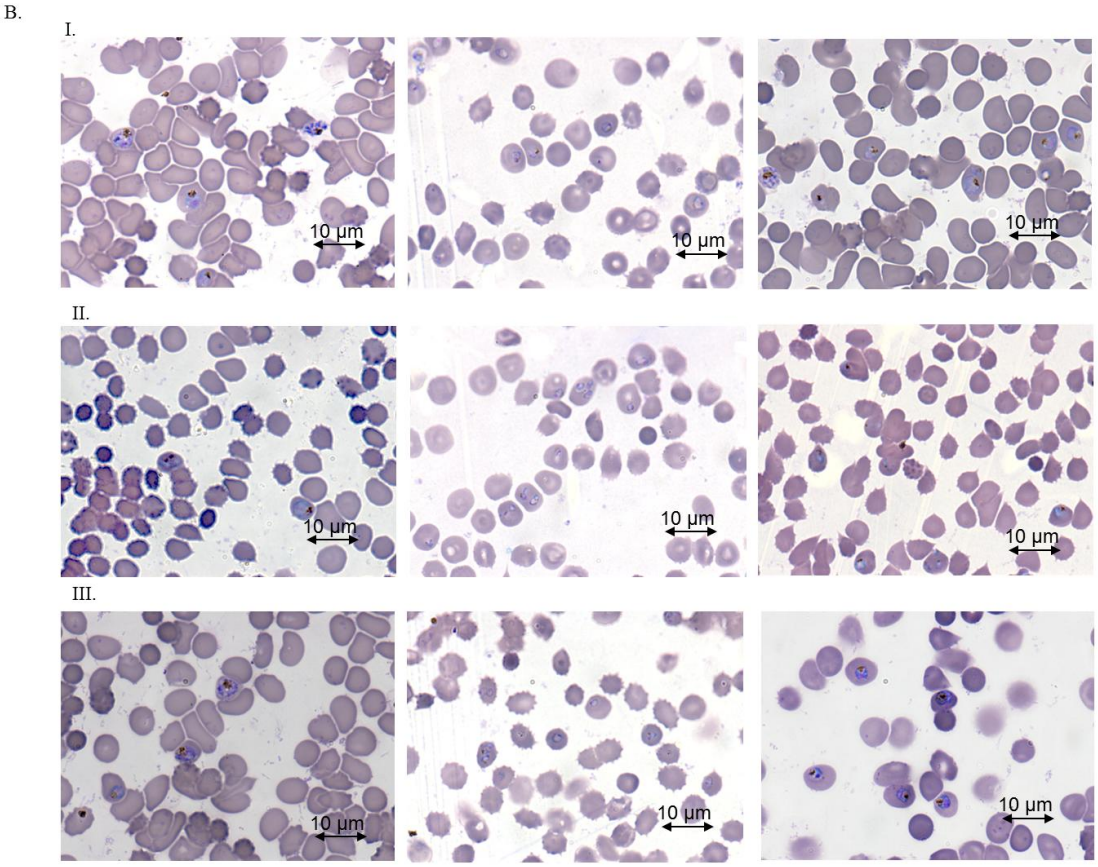


Figura 25. Efeito do silenciamento de PF3D7_1466400 no desenvolvimento de *P. falciparum*. A. Curvas de parasitemias das linhagem NF54:: PF3D7_1466400_HA_gmlS_TKe selvagem tratados ou não com N acetil glucosamina. B. Visualização microscópica de parasitas tratados ou não tratados durante 24, 48 e 72 horas. B-I. Linhagem NF54:: PF3D7_1466400 _HA_gmlS_TK tratados com N acetil glucosamina. B-II. Linhagem NF54:: PF3D7_1466400 _HA_gmlS_TK não tratada. B-III parasitas selvagens NF54 com N acetyl glucosamina.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível realizar a manipulação genética de dois fatores de transcrição membros da família ApiAP2 de *Plasmodium falciparum.* Depois de repetidas transfecções foi observado que nem todos os plasmídeos inicialmente construidos eram facilmente incorporados pelo parasita no *locus* de interesse. Os eventos de recombinação simples não ocorriam em proporções satisfatorias para obter linhagens transgênicas capazes de expressar as modificações genéticas que iriam permitir a manipulação dos genes.

Alguns autores já reportaram anteriormente a dificuldade para obter linhagens de parasitas 100% transgênicos por recombinação simples [66-62] e têm sido sugeridos longos períodos de tempo para este processo. Durante este trabalho foi observado que de oito tentativas apenas uma linhagem de parasitas transgênicos clonais foi obtida (Isto apenas depois de 12 meses) enquanto as outras sete foram perdidas ao longo do projeto por não conseguirem sobreviver à adição intermitente de WR99210 ou às repetidas clonagens por diluição limitante (Tabela 2). Também foi observado que parasita que pareciam conter o plasmídeo no *locus* não conseguiam expressar proteínas quiméricas fusionadas à etiqueta de HA. Estes resultados mostram que foi mais frequente a a manutenção do plasmídeo na forma episomal e que quando ocorreu o processo de recombinação por homologia de sequências houve alguma mudança na fase de leitura que não permitiu a correta expressão da proteína ou mesmo integração fora do lócus desejado. Para verificar se houve mesmo integração no *lócus* desejado poderiam ser conduzidos *Southern blot* simples ou *pulsed-field eletroforese* seguido de Southern blot.

Tabela 3. Desenvolvimento das linhagens construídas no início do projeto.

Linhagem	Construção do plasmídeo	Transfecção	Ciclagem	Integração confirmada	Clonagem	Obtenção de clones	Obtenção de linhagem clonal
PF3D7_1143100_HA_GFP_DD24	X	X	4X	X	X	X	X
PF3D7_1143100_HA_loxTerm	X	X					
PF3D7_1143100_HA_glmS	X	X					
PF3D7_1466400_HA_GFP_DD24	X	X					
PF3D7_1466400_HA_loxTerm	X	X	3X	X	X	X	
PF3D7_1466400_HA_glmS	X	X	3X	X	X		

Devido a estas dificuldades, em paralelo às ciclagens intermitentes com WR99210 e as clonagens foram construidos vetores que permitiam fazer uma seleção negativa dos parasitas que ainda carregavam os plasmídeos em formas episomais. Esta nova estratégia permitiu obter linhagens 100% t ransgênicas em apenas dois meses após transfecção e quando avaliadas na expressão das respectivas proteínas e os sistemas de silenciamento foi observada uma alta eficiência. Isto mostra que a estratégia de seleção negativa proposta por Duraisingh e seu grupo [66] foi mais rápida e apropiada para obter parasitas transgênicos e estudar o efeito da perda de função no nosso estudo.

Recentemente foi publicada a aplicação de tecnologia CRISPR/CAS9 para modificação genética de *P. falciparum* [71]. Este método parece acelerar a integração exata de transgenes em *loci* alvo. Entretanto, a tecnologia necessita um esforço ainda maior de clonagem em plasmídeos já grandes e ricos em AT. Testamos esta aproximação também usando o lócus PF3D7_1143100, no entano, após uma primeira tentativa frustrada e o sucesso na recombinação do PF3D7_1143100_HA_glmS na versão pHHTK, abandonamos esta estratégia por enquanto e continuamos a avaliar a função dos dois fatores de transcrição pelas metodologias já descritas.

Alguns membros da família de fatores de transcrição ApiAP2 já foram associados a participar e controlar diferentes processos ao longo do ciclo de *Plasmodium* tais como formação de gametócitos na fase intraeritrocítica [6], o *tethering* da cromatina [47] ou desenvolvimento no intestino do mosquito [50,51]. Em *P. falciparum* a regulação da transcrição depende das modificações de cromatina e nesse sentido, proteínas modificadoras de cromatina tais como metiltransferases, demetilases, acetiltransferases, e deacetilases de histonas possuem um papel central na atividade transcricional da cromatina. No entanto, ainda não está claro quais são os mecanismos que direcionam estas modificações epigenêticas que levam ao silencianciamento ou ativação de genes variantes. Neste trabalho, nós identificamos o primeiro fator de transcrição que, aparentemente, funciona antes das modificações da cromatina e regula tanto a transcrição de genes *var* quanto a transcrição de genes associados à gametocitogeneses. Interessantemente, o fator PF3D7_1143100 com efeito mais pronunciado em nossos estudos nem foi detectado em frações nucleares [72] motivo pelo qual o fator talvez não tenha sido estudado com mais ênfase até agora.

Embora sugerido por Campbell e seu grupo [54] que este fator de transcrição poderia influenciar a transcrição dos genes *var*, nenhuma informação na literatura associava o silenciamento de PF3D7_1143100 à formação de gametócitos. Nós

observamos pelas duas estratégias de silenciamento que a repressão deste gene conduzia à diferencação de formas parecidas com gametócitos. Quando foi analisada a transcrição de um grupo de genes associados aos primeiros estágios de gametócitos foi evidenciada a indução destes na ausência da proteína. Isto pode indicar que este fator de transcrição atua como um repressor de genes associados a gametócitos semelhante ao que foi descrito para o outro fator ApiAP2, PfAP2-G [69], entretanto funcionalmente diferente já que a presença de PfAP2-G induz gametócitos ao contrário de PF3D7_1143100 cuja ausência leva a formas gametocíticas.

PfAP2-G recentemente foi considerado o principal regulador da gametocitogenese em *P. falciparum*. O knockdown deste gene não teve influência significativa sobre a transcrição de PF3D7_1143100 [48] e inversamente, o knockdown de PF3D7_1143100 não teve nenhum efeito sobre o a transcrição de PfAP2-G, o pode significar que existem, pelo menos, duas vias aparentemente independentes que conduzem à formação de gametócitos.

Por outro lado, quando re-estabelecidos os níveis normais de PF3D7_1143100 houve uma reversão na formação dos possíveis gametócitos e todos os genes analisados foram de novo silenciados a exceção de Pfs16 que não retornou às condições observadas antes do knockdown. Existe a possibilidade de que a meia vida deste transcrito é tão alta que é necessária mais do que uma reinvasão para não detectá-lo mais, ou que algum *checkpoint* no processo de formação de gametócitos ainda não descoberto foi passado o que levou à persistência da sua transcrição mesmo sem formação de gametócitos.

No presente estudo, ainda não avaliamos se estas formas obsevadas após o knockdown de PF3D7_1143100 são de fato capazes de fecundar e concluir o ciclo sexual em mosquitos. Se for assim, estas linhagens poderiam ser úteis no aumento da formação de gametócitos em experimentos conduzidos na fase sexual do parasita.

Recentemente, Brancucci e colaboradores mostraram que a proteína heterocromatina 1 (HP-1) não controla apenas a transcrição de genes associados à gametócitos por de-repressão de PfAP2-G, mas também genes variantes, tais como *var*, *Rif* e *Pfmc-2TM* [37]. Assim, estabeleceu-se pela primeira vez uma conexão entre gametocitogênese e genes variantes. Nos nossos experimentos, esta conexão ficou novamente evidente já que a remoção temporária de PF3D7_1143100 também influenciava tanto na gametocitogênese quanto na transcrição de genes variantes. Observamos que quando analisada a transcrição dos genes *var* em parasitas knockdown

era induzido um grupo de genes principalmente de tipo upsB e upsC enquanto que um gene era silenciado.

Ao comparar estes resultados com o proposto por Campbell et al. [54] foi evidenciado que a maioria dos genes *var* aparentemente regulados por PF3D7_1143100 possuiam os motivos preditos, porém isto não foi observado no gene *var*1csa (PFE1640w) e no PFF1580c (silenciado). Por outro lado, muitos genes *var* que possuem o *motif* identificado por Campbell não tiveram sua transcrição alterada. Estes resultados indicam que embora o knockdown de PF3D7_1143100 exerce um efeito sobre alguns *loci var*, estes não estão relacionados exclusivamente ao indicado pelo estudo prévio citado. Podemos apenas especular se e quais outros fatores, talvez do grupo ApiAP2, ainda exercem um efeito sobre outros *loci var*.

Nós também estudamos a transcrição dos genes *var* depois de restabelecida a proteína e foi evidenciado que a memória transcricional era completamente apagada já que os transcritos presentes antes do knockdown não eram mais observados. Esta observação indica que a função de PF3D7_1143100 vai além de um simples "repressor" de genes associado a gametocitogenese ou "modulador" de alguns genes *var*. Parece que na ausência deste fator mudanças profundas na maquinaria que modifica cromatina ocorrem – especificamente de talvez todos os loci *var* (e talvez de outros genes variantes?). Neste momento estamos analisando por RNAseq quais outros genes são influenciados pela remoção temporária de PF3D7_1143100. Já que a remoção de PF3D7_1143100 não interfere profundamente na sobrevivência do parasita, é cabível especular se uma "inativação" da função da proteína ocorre de forma regular no ciclo de vida do parasita, para exatamente desencadear os efeitos aquí observados.

Em resumo, através dfos nossos resultados podemos atribuir as seguintes funções ao PF3D7_1143100: 1. Repressor de genes específicos de formas gametocíticas, 2. Repressor de alguns genes *var* e 3. Organizador geral da transcrição de genes *var*, cuja ausência temporária leva a extinção da memória epigenética. No entanto, também surgem algumas perguntas que não podem ser respondidas apenas com os resultados aqui apresentados e abrem a a porta a futuros estudos para ampliar e complementar esta informação. Por exemplo, ainda não está claro o mecanismo exato de regulação de PF3D7_1143100 nos genes que foram alterados neste estudo, existe a possibilidade que este suposto fator de transcrição se lige diretamente a regiões especificas de DNA dos genes regulados (testar por exemplo por *electrophoretic mobility shift assays* - EMSA, ou ChIPseq precipitando via antiHA a proteina nativa

PF3D7_1143100). Outra alternativa é que PF3D7_1143100 recruta enzimas modificadoras de histonas que seguidamente ativam ou reprimem a transcrição ou que está associada em forma de complexo a estas proteínas e/ou talvez outras ainda não conhecidas que regulam de forma conjunta a expressão génica (a ser testado por imunoprecipitação seguido de análise proteômica).

Por outro lado, o outro fator de transcrição ApiAP2 aquí estudado, PF3D7_1466400, não parece influenciar o desenvolvimento do parasita e foi observado que o knockdown induzido pela ribozima glmS não conduz a um fenótipo letal ou a mudanças na morfologia do parasita. Já que outros membros da família ApiAP2 foram indicados a possuirem diferentes funções no controle de processos cruciais no ciclo de vida do parasita, futuros experimentos precisam ser feitos para observar o efeito da perda da função deste gene na transcrição de genes variantes ou na transcrição global do parasita na fase intraeritrocítica. Também seria interesante observar se este gene tem alguma função específica no ciclo sexual do parasita já que seu ortólogo em *P. berghei* foi associado ao desenvolvimento no intestino do mosquito [50].

De forma conjunta os dados aqui apresentados indicam que os fatores de transcrição ApiAP2 estão associados à regulação e controle de diferentes processos no desenvolvimento e mecanismos de sobrevivência do parasita. Futuros estudos devem ser conduzidos para aprofundar a função desta família de genes e completar assim a informação até agora conhecida sobre os mecanismos de regulação gênica em *P. falciparum.* Cabe ressaltar que os fatores ApiAP2 estão ausentes em seres humanos e talvez sirvam para intervenção por fármacos.

7 CONCLUSÕES

- Para obter linhagens de parasitas transgênicos a estrategia de seleção negativa de parasitas por ganciclovir é mais rápida e eficiente.
- Para estudos de função de genes em *P. falciparum* os sistemas de silenciamento DD24 e glmS são comparáveis.
- O silenciamento dos genes PF3D7_1143100 e PF3D7_1466400 não conduz a um fenótipo letal no ciclo intraeritrocítico do parasita.
- O knockdown do fator de transcrição PF3D7_1143100 leva à repressão de um grupo de genes *var* e quando sua função é re-estabelecida a memória transcricional é apagada.
- O silenciamento de PF3D7_1143100 induz um grupo de genes associados a formas sexuais de *P. falciparum* e leva à formação de possíveis gametócitos; o reestabelecimento leva a normalização parcial dos níveis de transcritos nestes parasitas com *knockdown* de PF3D7_1143100 temporário.

REFERÊNCIAS*

1. World Health Organization. World Malaria Report 2014 [internet]. Switzerland 2014 feb. Available from: htpp://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en. [cited 2015 nov 01].

2. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. N Engl J Med. 2009;361:455–67.

3. Pimenta FP, Orfano AS, Bahia AC, Duarte AP, Rios CM, Melo F, et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015:110(1):23-47.

4. Pina-Costa A De, Brasil P, Santi SM Di, Araujo MP De, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFES, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Aug;109(5):618–33.

5. Jacot D, Waller R, Soldati-Favre D, MacPherson D, MacRae J. Apicomplexan Energy Metabolism: Carbon Source Promis cuity and the Quiescence Hyperbole. Trends in Parasitalogy. 2015 Oct;1471-4922(15)00192-0.

6. Kafsack BFC, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. Nature 2014;507(7491):248-52.

7. CDC- DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern- Malaria. 2014. [internet]. Available from: http://www.cdc.gov/dpdx/. [cited 2014 fev. 15].

8. Miller L, Baruch D, Marsh K, Doumb O. The pathogenic basis of malaria. Nature. 2002;415:673-9.

9. Elsworth B, Matthews K, Nie CQ, Kalanon M, Charnaud SC, Sanders PR et al. PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites. Nature. 2014 Jul 31;511(7511):587-91.

10. Bachmann A, Scholz A, Janßen M, Klinkert M, Tannich E, Bruchhaus I. et al. A comparative study of the localization and membrane topology of members of the RIFIN, STEVOR and PfMC-2TM protein families in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Malaria Journal. 2015. Jul 16;14:274.

* De acordo com:
International commitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscript submitted to biomedical journals. [2011 July 15].Available from: http://www.nlm.nih.gov./bsd/uniform_requirements.html.

11. Niang M, Bei A, Madnani K, Pelly S, Dankwa S, Kanjee S. STEVOR Is a Plasmodium falciparum Erythrocyte Binding Protein that Mediates Merozoite Invasion and Rosetting. Cell Host & Microbe. 2014. Jul 9;16(1):81-93.

12. Zhu X, Yahata K, Alexandre J, Tsuboi T, Kaneko O. The N-terminal segment of Plasmodium falciparum SURFIN4.1 is required for its trafficking to the red blood cell cytosol through the endoplasmic reticulum. Parasitalogy. 2013. Apr;62(2):215-29.

13. Warimwe GM, Keane TM, Fegan G, Musyoki JN, Newton CRJC, et al. Plasmodium falciparum *var* gene expression is modified by host immunity. Proc Natl Acad Sci. 2009. Dec 22;106(51):21801-6.

14. Ghumra A, Semblat J-P, Ataide R, Kifude C, Adams Y, et al. Induction of Strain-Transcending Antibodies Against Group A PfEMP1 Surface Antigens from Virulent Malaria Parasites. PLoS Pathog. 2012. Apr 8(4):e1002665.

15. Fried M, Duffy PE. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. Science. 1996. Jun 7;272(5267):1502-4.

16. Kraemer SM, Smith JD. A family affair: *var* genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. Curr Opin Microbiol. 2006;9:374–80.

17. Chan J, Fowkes F, Beeson J. Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. Cell Mol Life Sci. 2014. Oct;71(19):3633-57.

18. Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, et al. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of *var* genes during intra-erythrocytic development in Plasmodium falciparum. EMBO J. 1998 Sep 15;17(18):5418-26.

19. Chen Q, Fernandez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Datta S, et al. Developmental selection of *var* gene expression in Plasmodium falciparum. Nature. 1998;394:392–5.

20. Schieck E, Pfahler JM, Sanchez CP, Lanzer M. Nuclear run-on analysis of *var* gene expression in Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasital. 2007;153: 207–12.

21. Kyes S, Christodoulou Z, Pinches R, Kriek N, Horrocks P, et al. Plasmodium falciparum *var* gene expression is developmentally controlled at the level of RNA polymerase II-mediated transcription initiation. Mol Microbiol. 2007;63: 1237–47.

22. Lavstsen T, Salanti A, Jensen ATR, Arnot DE, Theander TG. Sub-grouping of Plasmodium falciparum 3D7 *var* genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. Malar J. 2003;10:2-27.

23. Joergensen L, Bengtsson DC, Bengtsson A, Ronander E, Berger SS, et al. Surface co-expression of two different PfEMP1 antigens on single plasmodium falciparum-infected erythrocytes facilitates binding to ICAM1 and PECAM1. PLoS Pathog. 2010;6(9):e1001083.

24. Amulic B, Salanti A, Lavstsen T, Nielsen MA, Deitsch KW. An upstream open reading frame controls translation of *var*2csa, a gene implicated in placental malaria. PLoS Pathog. 2009 Jan;5(1):e1000256.

25. Brancucci NM, Witmer K, Schmid C, Voss TS. A *var* gene upstream element controls protein synthesis at the level of translation initiation in Plasmodium falciparum. PloS One. 2014 Jun 17;9(6):e100183.

26. Duraisingh MT, Voss TS, Marty AJ, Duffy MF, Good RT, et al. Heterochromatin silencing and locus repositioning linked to regulation of virulence genes in Plasmodium falciparum. Cell. United States. 2005 Apr 8;121(1):13-24.

27. Freitas-Junior LH, Hernandez-Rivas R, Ralph SA, Montiel-Condado D, Ruvalcaba-Salazar OK, et al. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic *var*iation genes in malaria parasites. Cell. United States. 2005 Apr 8;121(1):25-36.

28. Chookajorn T, Dzikowski R, Frank M, Li F, Jiwani AZ, et al. Epigenetic memory at malaria virulence genes. Proc Natl Acad Sci U S A. United States. 2007 Jan 16;104(3):899-902.

29. Tonkin CJ, Carret CK, Duraisingh MT, Voss TS, Ralph SA, et al. Sir2 paralogues cooperate to regulate virulence genes and antigenic *var*iation in Plasmodium falciparum. PLoS Biol. 2009 Apr 14;7(4):e84.

30. Jiang, L, Mu, J, Zhang, Q, Ni, T, Srinivasan, P, Raya*var*a, K, Miller, L. H. PfSETvs methylation of histone H3K36 represses virulence genes in Plasmodium falciparum. Nature. 2013 Jul 11;499(7457):223-7.

31. Horrocks P, Pinches R, Christodoulou Z, Kyes SA, Newbold CI. Variable *var* transition rates underlie antigenic variation in malaria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 27;101(30):11129-34.

32. Frank M, Dzikowski R, Amulic B, Deitsch K. Variable switching rates of malaria virulence genes are associated with chromosomal position. Mol Microbiol. 2007 Jun;64(6):1486-98.

33. Lopez-Rubio JJ, Gontijo AM, Nunes MC, Issar N, Hernandez Rivas R, et al. 5' flanking region of *var* genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. Mol Microbiol. 2007 Dec; 66(6): 1296–1305.

34. Volz JC, Bártfai R, Petter M, Langer C, Josling GA, et al. PfSET10, a Plasmodium falciparum methyltransferase, maintains the active *var* gene in a poised state during parasite division. Cell Host Microbe. 2012 Jan 19;11(1):7-18.

35. Petter M, Lee CC, Byrne TJ, Boysen KE, Volz J, et al. Expression of P. falciparum *var* genes involves exchange of the histone *var*iant H2A.Z at the promoter. PLoS Pathog. 2011 Feb;7(2):e1001292.

36. Perez-Toledo K, Rojas-Meza AP, Mancio-Silva L, Hernandez-Cuevas NA, Delgadillo DM, et al. Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 binds to tri-methylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of *var* genes. Nucleic Acids Res. England. 2009 May;37(8):2596-606.

37. Brancucci NM, Bertschi NL, Zhu L, Niederwieser I, Chin WH, Wampfler R1, Freymond C, Rottmann M, Felger I, Bozdech Z, Voss TS. Heterochromatin protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. Cell Host Microbe. 2014 Aug 13;16(2):165-76.

38. Sierra-Miranda M, Delgadillo DM, Mancio-Silva L, Vargas M, Villegas-Sepulveda N, et al. Two long non-coding RNAs generated from subtelomeric regions accumulate in a novel perinuclear compartment in Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasital. 2012;185(1):36-47

39. Epp C, Li F, Howitt CA, Chookajorn T, Deitsch KW. Chromatin associated sense and antisense noncoding RNAs are transcribed from the *var* gene family of virulence genes of the malaria parasite Plasmodium falciparum. RNA. 2009 Jan;15(1):116-27.

40. Zhang Q, Siegel N, Martins RF, Wang F, Cao J, Gao Q, Scherf A et al. Exonuclease-mediated degradation of nascent RNA silences genes linked to severe malaria. Nature. 2014 Sep 18;513(7518):431-5.

41. Cabral FJ, Wunderlich G. Transcriptional memory and switching in the Plasmodium falciparum rif gene family. Mol Biochem Parasital. 2009 Dec;168(2):186-90.

42. Cabral FJ, Fotoran WL, Wunderlich G. Dynamic activation and repression of the plasmodium falciparum rif gene family and their relation to chromatin modification. PLoS One. 2012;7(1):e29881.

43. Witmer K, Schmid CD, Brancucci NM, Luah YH, Preiser PR, et al. Analysis of subtelomeric virulence gene families in Plasmodium falciparum by comparative transcriptional profiling. Mol Microbiol. 2012 Apr; 84(2):243-59.

44. Callebaut I, Prat K, Meurice E, Mornon J-P, Tomavo S. Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in Plasmodium falciparum: conserved features and differences relative to other eukaryotes. BMC Genomics. 2005 Jul 23;6:100.

45. De Silva EK, Gehrke AR, Olszewski K, León I, Chahal JS, et al. Specific DNA-binding by apicomplexan AP2 transcription factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jun 17;105(24):8393-8.

46. Balaji S, Babu MM, Iyer LM, Aravind L. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. Nucleic Acids Res. 2005 Jul 21;33(13):3994-4006.

47. Flueck C, Bartfai R, Niederwieser I, Witmer K, Alako BTF, et al. A major role for the Plasmodium falciparum ApiAP2 protein PfSIP2 in chromosome end biology. PLoS Pathog. 2010 Feb 26;6(2):e1000784.

48. Kafsack BFC, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, et al. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. Nature. 2014 Mar 13;507(7491):248-52.

49. Maier AG, Rug M, O'Neill MT, Brown M, Chakravorty S, et al. Exported proteins required for virulence and rigidity of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. Cell. 2008 Jul 11;134(1):48-61.

50. Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Mair GR, Janse CJ, et al. Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. Mol Microbiol. 2009 Mar;71(6):1402-14.

51. Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I. Transcription factor AP2-Sp and its target genes in malarial sporozoites. Mol Microbiol. 2010 Feb;75(4):854-63.

52. Young JA, Fivelman QL, Blair PL, de la Vega P, Le Roch KG, et al. The Plasmodium falciparum sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. Mol Biochem Parasital. 2005 Sep;143(1):67-79.

53. Silvestrini F, Bozdech Z, Lanfrancotti A, Di Giulio E, Bultrini E, et al. Genome-wide identification of genes upregulated at the onset of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum. Mol Biochem Parasital. 2005 Sep;143(1):100-10.

54. Campbell TL, De Silva EK, Olszewski KL, Elemento O, Llinás M. Identification and genome-wide prediction of DNA binding specificities for the ApiAP2 family of regulators from the malaria parasite. PLoS Pathog. 2010 Oct 28;6(10):e1001165.

55. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature. 2002 Oct 3;419(6906):498-511.

56. Lelievre J, Berry A, Benoit-Vical F. An alternative method for Plasmodium culture synchronization. Exp Parasital. 2005 Mar;109(3):195-7.

57. Ljungström I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M. Methods in Malaria Research. 4th ed. Manassas, VA: MR4/ATCC; 2013.

58. Bonger KM, Chen L, Liu CW, Wandless TJ. Small-molecule displacement of a cryptic degron causes conditional protein degradation. Nat Chem Biol. 2011 Jul 3;7(8):531-7.

59. Boyle JS, Lew AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification.Trends Genet. 1995 Jan;11(1):8.

60. Banaszynski LA, Chen L-C, Maynard-Smith LA, Ooi AGL, Wandless TJ. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. Cell. 2006 Sep 8;126(5):995-1004.

61. Armstrong CM, Goldberg DE. An FKBP destabilization domain modulates protein levels in Plasmodium falciparum. Nat Methods. 2007 Dec;4(12):1007-9.

.

62. De Azevedo MF, Gilson PR, Gabriel HB, Simões RF, Angrisano F, et al. Systematic Analysis of FKBP Inducible Degradation Domain Tagging Strategies for the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum. PLoS One. 2012;7(7):e40981.

63. Prommana P, Uthaipibull C, Wongsombat C, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y, et al. Inducible Knockdown of Plasmodium Gene Expression Using the glmS Ribozyme. PLoS One. 2013 Aug 30;8(8):e73783.

64. Yap A, Azevedo MF, Gilson PR, Weiss GE, O Neill MT, et al. Conditional expression of apical membrane antigen 1 in Plasmodium falciparum shows it is required for erythrocyte invasion by merozoites. Cell Microbiol. 2014 May;16(5):642-56.

65. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. CSHL Press; 1991.

66. Hasenkamp S, Russell KT, Horrocks P. Comparison of the absolute and relative efficiencies of electroporation-based transfection protocols for Plasmodium falciparum. Malar J. 2012 Jun 21;11:210.

67. Duraisingh M, Triglia T, Cowman F. Negative selection of Plasmodium falciparum reveals targeted gene deletion by double crossover recombination. Int J Parasital. 2002 Jan;32(1):81-9.

68. Livak KJ1, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.

69. Golnitz U, Albrecht L, Wunderlich G. *var* transcription profiling of Plasmodium falciparum 3D7: assignment of cytoadherent phenotypes to dominant transcripts. Malar J. England. 2008 Jan 14;7:14.

70. Yuda M, Iwanaga S, Kaneko I, Kato T. Global transcriptional repression: An initial and essential step for Plasmodium sexual development. PNAS. 2015 Oct 13;112(41):12824-9.

71. Bernard W. Chu, Laura A. Banaszynski, Ling-chun Chen, and Thomas J. Wandless. Recent Progress with FKBP-Derived Destabilizing Domains. Bioorg Med Chem Lett. 2008 Nov 15;18(22):5941-4.

72. Ghorbal M, Gorman M, Macpherson C, Martins R, Scherf A, Lopez-Rubio J. Genome editing in the human malaria parasite Plasmodium falciparum using the CRISPR-Cas9 system. Nature Biotechnology. 2014 Aug;32(8):819-21.

73. Oehring S, Woodcroft B, Moes S, Wetzel S, Diet O, Voos T. et al. Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite Plasmodium falciparum. Genome biology. 2012 Nov 26;13(11):R108.

74. Millar S, Cox-Singh J. Human infections with *Plasmodium knowlesi*—zoonotic malaria. Clinical Microbiology and Infection. 2015. 21(7):640-8.

75. Heiber A, Kruse F, Pick C, Grüring C, Flemming, Spielmann T, et al. Identification of new PNEPs indicates a substantial non-PEXEL exportome and underpins common features in Plasmodium falciparum protein export. PLoS Pathog. 2013;9(8):e1003546.

76. Marti M, Good RT, Rug M, Knuepfer E, Cowman AF. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. Science. 2004 Dec 10;306(5703):1930-3.