FLAVIA MENEZES ZIMBRES

**Identificação e interferência de proteínas
integradas na superfície do eritrócito infectado por
*Plasmodium falciparum***

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

São Paulo
2016

FLAVIA MENEZES ZIMBRES

**Identificação e interferência de proteínas
integradas na superfície do eritrócito infectado por
*Plasmodium falciparum***

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Carsten Wrenger

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Menezes Zimbres, Flávia
Identificação e interferência de proteínas
integradas na superfície do eritrócito infectado por
Plasmodium falciparum / Flávia Menezes Zimbres;
orientador Prof. Dr. Carsten Wrenger; coorientador
Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich. -- São Paulo,
2016.
124 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Malária. 2. Proteínas de superfície
eritrocítica. 3. Piridoxal Quinase. 4. Tecnologia
SELEX. 5. Terapia. I. Wrenger, Prof. Dr. Carsten,
orientador. II. Ulrich, Prof. Dr. Alexander
Henning, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Flávia Menezes Zimbres

Título da Tese: Identificação e interferência de proteínas integradas na superfície de eritrócito infectado por *Plasmodium falciparum*

Orientador(a): Prof. Dr. Carsten Wrenger

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **616/13** referente ao projeto intitulado: "*Identificação e interferência dos transportadores de nutrientes integrados á superfície eritrocítica pelo parasita causador da malária humana: Plasmodium falciparum*" sob a responsabilidade de **Flávia Menezes Zimbres**, 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 nº196 de 1996.

São Paulo, 05 de setembro de 2013.

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

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

*Dedico este trabalho
a minha família e ao meu marido,
com todo o meu amor!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carsten Wrenger por toda orientação, suporte profissional, confiança e apoio pessoal durante estes anos de trabalho juntos, um agradecimento especial. Foi um prazer desenvolver este trabalho sob sua orientação.

Agradeço ao Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich por todos os conselhos e discussões durante todo o percurso do trabalho. Sua co- orientação foi essencial para o desenvolvimento deste projeto.

Agracedimento especial ao Dr. Arthur Nery por ter me ensinado os primeiros passos deste trabalho e por estar presente durante todo o percurso.

À Prof. Dra. Claudiana Lameu, Dr. Arquimedes Cheffer, Dra. Isis Cristina Do Nascimento, Ana Paula Santos, Erica Molina, Ricardo Pereira e Lucas Nishida, meus infinitos agradecimentos por todos os momentos de discussão. Para sempre serão os “aptamerólogos”.

Agradeço ao meu querido grupo de pesquisa formado por Sory Bosch, Thales Kronenberger, Kamila Meissner, Jasmin Lindner e Marleen Linzke por todo o suporte e contribuições durante estes anos de convivência.

Meus agradecimentos especiais ao Prof. Gerd Wunderlich, e ao seu grupo Wolfgang Fischer, Tatiane Macedo Silva, Rosana Duque, Eliana Galindo, Yelina Brito e Wesley Fotoran por proporcionarem um ambiente de trabalho produtivo e divertido.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber por ter me permitido entrar em seu laboratório, e adquirir os conhecimentos iniciais da pesquisa, e por estar presente até hoje, meu muito obrigada.

Meu agradecimento especial a Dra. Lisvane Paes de Vieira por me passar parte de seus conhecimentos científicos e pela amizade que a vida nos permitiu.

Agradeço meus eternos queridos amigos, Elizabeth Furusho Pral, Dra. María Julia Barisón, Dra. Ludmila Nakamura Rapado, Flávia Damasceno, Marcell Crispin, Carolina Manchola, Gustavo Baptista, Raíssa Melo, Richard Girard e Rodolpho Ornitz por todos os anos que compartilhamos o espaço físico deixando tudo mais leve e muito engraçado.

Aos meus futuros doutores Letícia Marchese e Higo Fernando, muito obrigada pela nossa amizade maravilhosa.

Agradeço minha família por toda confiança e por acreditar que eu sempre podia mais. Devo tudo a isso à vocês!

Por fim, e não menos importante, gostaria de agradecer ao meu marido Dr. Brian Alejandro Suárez Mantilla por todo apoio, estímulos, compreensão e atenção durante todos estes anos de trabalho e de família. Você desde sempre foi fundamental!

Ah! Agradeço a Misha e ao Nino pelas baladas noturnas durante a escrita da tese.

A todos o meu muito obrigada e meus sinceros desejos.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

ZIMBRES, F.M. **Identificação e interferência de proteínas integradas na superfície de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*. 2016. 124 f.** Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A malária humana é uma doença infecciosa transmitida por um mosquito que está atrelada a uma alta taxa de mortalidade. Dentre os parasitas que causam a malária humana a espécie *Plasmodium falciparum* é responsável por 90% dos casos letais. Sua virulência é ocasionada por modificações na célula hospedeira provenientes do tráfego de proteínas para a superfície de eritrócitos infectados. Com o intuito de interferir com estas proteínas, aplicamos a técnica *Cell-SELEX* (do inglês: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). Após ciclos iterativos de seleção obtivemos moléculas de DNA simples- fita, conhecidas como aptâmeros, que possuem alta afinidade e especificidade contra proteínas alvo presentes na superfície de eritrócitos infectados por *P. falciparum*. Ensaio de *pull-down* usando aptâmeros selecionados em sistema de purificação por streptavidina-biotina seguidos por análises de espectrometria de massa revelaram a interação destas moléculas de DNA com proteínas como RIFIN, *PfEMP*, RAP1, entre outras incorporadas na superfície de eritrócitos infectados. Como consequência destas interações, os aptâmeros selecionados demonstraram ser inibidores potenciais na proliferação dos parasitas, como demonstrado por testes *in vitro*. Outra estratégia usada foi a produção de aptâmeros contra a piridoxal quinase de *P. falciparum* (*PfPdxK*) expressa. Usando tanto SELEX-proteína, bem como, ensaios de eletroforese capilar, selecionamos aptâmeros com capacidade para inibir a atividade enzimática da *PfPdxK*. Nossos dados constituem evidências sobre as aplicações da tecnologia SELEX no desenho racional de compostos contra a malária humana.

Palavras-chave: Malária. Proteínas de superfície eritrocítica. Piridoxal Quinase. Tecnologia SELEX. Terapia.

ABSTRACT

ZIMBRES, F.M. **Identification and interference of integrated proteins in the infected-erythrocytes surface by *Plasmodium falciparum*. 2016. 124 p.** Ph.D (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The human malaria is a mosquito-borne infectious disease associated with a high risk of mortality. Among the parasite species that causes human malaria, *Plasmodium falciparum* is responsible by 90% of the lethal cases. The virulence of this pathogen is associated with host *cell* modifications by trafficking proteins to the surface of infected erythrocytes. Aiming to interfere with these proteins we have applied the *Cell*-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) technology. After iterative cycles of selection we obtained single stranded DNA molecules, known as aptamers, with high binding affinity and specificity against protein targets present in the surface of erythrocytes infected with *P. falciparum*. Pull-down assays using the selected aptamers in a streptavidin-biotin affinity assay followed by mass spectrometry analysis revealed the interaction of these DNA molecules with proteins such as RIFIN, PfEMP, RAP1, among others embedded in the surface of infected erythrocytes. As consequence of these interactions, the selected aptamers demonstrated to be potent inhibitors of parasite proliferation, as validated by *in vitro* tests. Another strategy used was the production of aptamers against the recombinantly expressed plasmodial pyridoxal kinase (*Pf*PdxK). Using both protein-SELEX as well as capillary electrophoresis assays, we selected aptamers with capacity to inhibit the enzymatic activity of *Pf*PdxK. Our data constitute evidences about the application of SELEX technology in the rationale design of inhibitors against human malaria.

Keywords: Malaria. Erythrocyte Surface proteins. Pyridoxal Kinase. SELEX technology. Therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ocorrência global, controle e eliminação da malária.....	20
Figura 2 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	21
Figura 3 - Representação esquemática da proteína PfEMP1 de <i>Plasmodium falciparum</i>	25
Figura 4 - Ilustração do mecanismo da técnica SELEX utilizando biblioteca de DNA para identificação celular.....	29
Figura 5 - Componentes da estrutura secundária de aptâmeros.	30
Figura 6 - <i>Plasmodium falciparum</i> isolado 3D7.	42
Figura 7 – Representação do ensaio de purificação dos alvos.	50
Figura 8 - Padronização do número de ciclos e massa de <i>template</i>	56
Figura 9 – Avaliação do tamanho do DNA molde utilizando <i>primer</i> modificado.	57
Figura 10 - Separação da dupla- fita de DNA.	50
Figura 11- Ensaio de <i>Real-Time PCR</i>	61
Figura 12 – Motivos conservados identificados entre as sequências de DNA.	63
Figura 13 – Predição da estrutura secundária dos aptâmeros de DNA obtidos após o sequenciamento.....	66
Figura 14 - Estrutura secundária dos aptâmeros de DNA resultantes da etapa final da seleção.....	71
Figura 15 - Motivos conservados entre as sequências de DNA do 7º ciclo e do último ciclo.	72
Figura 16 – Microscopia de fluorescência.....	74
Figura 17 - Proliferação celular na presença de aptâmeros.	82
Figura 18 - Estrutura secundária dos aptâmeros de DNA selecionados.	83
Figura 19 - Efeito dose-resposta dos aptâmeros obtidos por <i>Cell-SELEX</i> em culturas de eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i>	84
Figura 20 - Expressão e purificação da proteína recombinante <i>PfPdxK</i> em <i>E. coli</i> ...87	
Figura 21 - Piridoxal quinase de <i>Plasmodium falciparum</i> analisada por eletroforese capilar.....	80
Figura 22 - Padronização da corrida de eletroforese capilar para a moléculas de ssDNA e complexo ssDNA- <i>PfPdxK</i>	89
Figura 23 - Análise do complexo <i>PfPdxK</i> -ssDNA mediante eletroforese capilar.	90

Figura 24 - Programa de coleta por Eletroforese Capilar.....	91
Figura 25 - Produto de amplificação após a coleta mediante eletroforese capilar. ...	92
Figura 26 - Estrutura secundária dos aptâmeros de DNA selecionados contra <i>Pf</i> PdxK	96
Figura 27 - Ensaio enzimático da PdxK de <i>Plasmodium falciparum</i> na presença de aptâmeros.	97
Figura 28 - Ensaio enzimático da PdxK de <i>Plasmodium falciparum</i> na presença de aptâmeros específicos.	98
Figura 29 – Esquema do processo SELEX realizado neste trabalho contra proteínas de superfície de eritrócito infectado.	108
Figura 30 - Representação esquemática do ensaio do Eletroforese Capilar.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ciclos de seleção para o <i>Cell</i> -SELEX realizado contra eritrócitos infectados por <i>P. falciparum</i>	60
Tabela 2 - Determinação de sequências e análise de bioinformática.....	62
Tabela 3 – Classificação de aptâmeros segundo os motivos conservados.....	64
Tabela 4 - Aptâmeros marcados com isotiocianato de fluoresceína.	67
Tabela 5 - Determinação das sequências prévias de DNA do último ciclo de seleção e análise bioinformática.....	68
Tabela 6 – Classes dos aptâmeros prévios.	69
Tabela 7 – Classificação dos aptâmeros em comparação.	73
Tabela 8 – Aptâmeros selecionados contra eritrócitos infectados com o <i>Plasmodium falciparum</i>	75
Tabela 9 – Avaliação do enriquecimento dos aptâmeros selecionados contra eritrócitos infectados por <i>Plasmodium falciparum</i>	80
Tabela 10 - Comparação das análises realizadas independentemente.	81
Tabela 11 - Aptâmeros da seleção Selex contra eritrócitos infectados.	82
Tabela 12 - Proteínas de superfície identificadas pelos aptâmeros específicos.	85
Tabela 13 - Análise bioinformática das sequências de DNA obtidas após o SELEX- <i>Pf</i> PdxK.	93
Tabela 14 - Classes de aptâmeros selecionados contra <i>Pf</i> PdxK.	95

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APT	APTÂMERO
ACN	ACETONITRILA
ACT	<i>ARTEMISININ-BASED COMBINATION THERAPIES</i>
AcNa	ACETATO DE SÓDIO
AHT	ANHIDROTETRACICLINA
ATS	<i>ACIDIC TERMINAL SEGMENT</i>
BBB	TRIPLA BIOTINA
BME	β -MERCAPTOETANOL
BRASIL	BIOPANNING AND RAPID ANALYSIS OF SELECTIVE INTERACTIVE <i>LIGANDS</i>
BrEt	BROMETO DE ETÍDEO
BSA	ALBUMINA SORO BOVINO
CIDR	<i>CYSTEINE-RICH INTERDOMAIN REGION</i>
CaCl	CLORETO DE CÁLCIO
CS	CIRCUNSPURINA
CST	CONSTANTE
DBL	<i>DUFFY-BINDING-LIKE</i>
DNA	ACIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
DO	DENSIDADE OPTICA
dsDNA	DUPLA- FITA DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
DTT	DITIOTREITOL
E.C.	ELETROFORESE CAPILAR
E. COLI	ESCHERICHIA COLI
EtOH	ÁLCOOL ETÍLICO
EOF	FLUXO ELETROSMÓTICO
FA	ÁCIDO FÓRMICO
FITC	ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA
HSPGs	HEPARAN SULFATO
ICAM 1	<i>INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE 1</i>
IPTG	<i>ISOPROPYL β-D-1-THIOGALACTOPYRANOSIDE</i>
iRBC	<i>INFECTED RED BLOOD CELL</i>
KCl	CLORETO DE POTÁSSIO
L	LIGADO
LB	<i>LURIA-BERTANI MEDIUM</i>
LA	COMPLEXO LIGANTE- ALVO
MgCl ₂	CLORETO DE MAGNÉSIO
NaCl	CLORETO DE SÓDIO
NaOH	HIDRÓXIDO DE SÓDIO
NL	NÃO LIGADO
NECEEM	<i>NONEQUILIBRIUM CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF EQUILIBRIUM MIXTURES</i>

NPP	NOVAS VIAS DE PERMEABILIDADE (<i>NEW PERMEABILITY PATHWAYS</i>)
PCR	REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)
PDGF- BB	<i>PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR B</i>
PEXEL	PLASMODIUM ELEMENTO EXPORTAÇÃO
PF	<i>PRIMER FORWARD</i>
PfEMP1	<i>PLASMODIUM FALCIPARUM ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEIN 1</i>
PfPDXK	PIRIDOXAL QUINASE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>
PfRH	<i>P. FALCIPARUM RHOPTRY</i>
PfSAP	FOSFATASE ÁCIDA
PLP	PIRIDOXAL-5-FOSFATO
PM	PADRÃO DE MASSA MOLECULAR
PR	<i>PRIMER REVERSE</i>
PTEX	<i>PLASMODIUM TRANSLOCON OF EXPORTED PROTEÍNS</i>
q.s.p.	QUANTIDADE SUFICIENTE PARA
RBC	<i>RED BLOOD CELL</i>
RIFIN	<i>REPETITIVE INTERSPERSED FAMILY</i>
RNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
RPM	ROTAÇÃO POR MINUTO
RPMI	<i>ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE</i> (MEIO DE CULTIVO)
RT- PCR	REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL
SDS-PAGE	<i>SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS</i>
SEL +	SELEÇÃO POSITIVA
SEL -	SELEÇÃO NEGATIVA
SELEX	<i>SYSTEMATIC EVOLUTION OF LIGANDS BY EXPONENTIAL ENRICHMENT</i>
ssDNA	SIMPLES- FITA DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
ssDNA_FITC	SIMPLES- FITA DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA
SOC	<i>SUPER OPTIMAL BROTH</i>
STEVOR	<i>SUB-TELOMERIC VARIABLE OPEN READING FRAME</i>
SURFIN	<i>SURFACE- ASSOCIATED INTERSPERSED GENES</i>
TFA	TRIFLUORACETATO
VSA	<i>VARIANT SURFACE ANTIGENS</i>
X-gal	5-BROMO-4-CLORO-3-INDOXIL- β -D-GALACTOPIRANOSÍDEO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Malária e sua epidemiologia	19
1.1.1 Tratamento da Malária	22
1.1.2 Proteínas de superfície: sistema de citoadesão e captação de nutrientes	23
1.2 Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX)	28
1.2.1 Aptâmeros como biosensores	32
1.2.2 Aptâmeros para diagnóstico	33
1.2.3 Aptâmeros para terapia	34
1.2.4 Eletroforese capilar	36
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Seleção de aptâmeros contra eritrócitos infectados por <i>Plasmodium falciparum</i>	42
3.1.1 Cultivo do parasita <i>Plasmodium falciparum</i>	42
3.1.2 Desenvolvimento de aptâmeros de DNA através da técnica SELEX	43
3.1.2.1 <u>Extração de ssDNA por fenol: clorofórmio</u>	44
3.1.3 Ciclos iterativos de SELEX	44
3.1.3.1 <u>BRASIL (Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands)</u>	44
3.1.3.2 <u>Ciclos substrativos de SELEX utilizando células vermelhas não infectadas</u>	45
3.1.3.3 <u>Dupla seleção de SELEX (ciclo de seleção contra os epítomos alvo seguido de ciclo de subtração)</u>	45
3.1.4 Sincronização de parasitas	45
3.1.5 Análise microscópica das moléculas de DNA ligados a epítomos de superfície celular	46
3.1.6 Análise das moléculas de DNA selecionadas no processo SELEX	46
3.1.6.1 <u>Clonagem</u>	46
3.1.6.2 <u>Sequenciamento</u>	47
3.1.7 Análise de Bioinformática	47
3.1.8 Ensaio de PCR em tempo real	48
3.1.9 Ensaio de crescimento celular	48
3.1.10 Identificação da proteína alvo	49
3.1.10.1 <u>Purificação da proteína alvo acoplada ao aptâmero</u>	49
3.1.11 Identificação do alvo por Espectrometria de Massa	50
3.2 Seleção de aptâmeros contra piridoxal quinase de <i>Plasmodium falciparum</i>	51
3.2.1 Obtenção da proteína recombinante piridoxal quinase (PdxK) de <i>Plasmodium falciparum</i> em <i>E. Coli</i>	51
3.2.1.1 <u>Expressão da PfPdxK</u>	51
3.2.1.2 <u>Purificação da PfPdxK recombinante</u>	52
3.2.2 Seleção de aptâmeros contra a PfPdxK	52

3.2.3 Interação entre PfPdxK e aptâmeros por E.C.	53
3.2.3.1 Identificação dos aptâmeros selecionados	53
3.2.4 Atividade enzimática da PfPdxK e do pool de moléculas de DNA	53
3.2.5 Atividade enzimática da PfPdxK e dos aptâmeros selecionados	54
4 RESULTADOS	55
4.1 Desenvolvimento de aptâmeros de DNA	56
4.2 Seleção contra eritrócitos infectados	58
4.2.1 Seleções iterativas in vitro	58
4.2.2 Verificação da homogeneidade dos produtos obtidos com o SELEX	60
4.2.3 Clonagem e sequenciamento dos aptâmeros de maior afinidade	61
4.2.3.1 Moléculas de DNA do pool intermediário	61
4.2.3.2 Moléculas de DNA do pool final	67
4.2.4 Alinhamento das sequências obtidas no ciclo intermediário e no último ciclo	71
4.2.5 Microscopia de fluorescência	73
4.2.5.1 Imagens preliminares	73
4.2.6 Avaliação do efeito dos aptâmeros obtidos na proliferação de <i>P. falciparum</i>	74
4.2.7 Ensaio de dose-resposta dos aptâmeros afins	83
4.2.8 Identificação do alvo proteico envolvido na interação com os aptâmeros	84
4.3 SELEX contra proteína recombinante	86
4.3.1 Expressão e purificação da PfPdxK	86
4.3.2 Eletroforese Capilar (EC)	87
4.3.3 Identificação dos aptâmeros selecionados	90
4.3.4 Análise das sequências de DNA selecionadas contra PfPdxK	93
4.3.5 Atividades enzimáticas	97
5 DISCUSSÃO	99
5.1 SELEX contra eritrócitos infectados (Cell-SELEX)	100
5.2 Aptâmeros como moléculas com potencial anti-plasmódio	104
5.3 SELEX contra proteína recombinante	108
6 CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS*	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária e sua epidemiologia

A origem do nome "Malária" iniciou no século XVIII baseada na expressão italiana "mal' aria", sinônimo de "mau ar", definição originada a partir da crença que a doença estava associada com o ar insalubre de pântanos, onde "germes" eram transferidos das águas para os humanos por transmissão mecânica.

Em 1880, o médico Charles Alphonse Laveran observou através de amostras sanguíneas de pacientes febris a presença de protozoários no interior dos eritrócitos, dando início a estudos sobre o ciclo de vida e forma de transmissão do parasita então observado. Alguns anos mais tarde, o parasita foi observado no trato gastrointestinal do mosquito *Anopheles* pelo médico Ronald Ross, o qual iniciou seus estudos com o mosquito e modelo aviário infectado com o intuito de observar a importância do mosquito na transmissão da malária, definindo a partir disso, o hospedeiro intermediário. A transmissão da malária entre humanos por mosquitos do gênero *Anopheles* foi demonstrada em 1899, sendo a fase hepática da infecção identificada apenas em 1948, por Schott e Garnham (SHORTT; GARNHAM, 1948).

Indivíduos em todos os continentes estão potencialmente em risco de contrair malária, mas grupos de maiores riscos são aqueles que habitam regiões tropicais e subtropicais, locais cujas condições climáticas e topográficas favorecem o desenvolvimento do vetor. No passo dos anos, a malária tem sido considerada um sério problema de saúde devido à alta taxa de mortalidade registrada. A população, em mais de 99 países com mais de 200 milhões de habitantes, se encontra exposta à infecção pelo parasita (Figura 1). Estima-se que a infecção malárica seja responsável por aproximadamente 200 milhões de casos clínicos, resultando em mais de 627 mil mortes a cada ano, sendo crianças de até 5 anos de idade e mulheres grávidas as mais acometidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). A quimioterapia da doença é baseada no uso de fármacos, sendo a prevenção através do uso de vacinas um grande desafio para a comunidade científica da área.

Figura 1 - Ocorrência global, controle e eliminação da malária.

Em cinza indicam-se as regiões onde não há relatos de malária, em amarelo as regiões em que a malária foi erradicada, em azul escuro regiões com alta incidência de malária e que contribuem mais para as mortes mundiais e, por fim, em azul claro as regiões com baixa contribuição para os casos e mortes. Fonte: Alonso e Tanner (2013).

Pertencente ao filo Apicomplexa e gênero *Plasmodium*, o agente etiológico da doença humana é transmitido de um ser vertebrado a outro através da fêmea do mosquito *Anopheles*, responsável por inocular, durante o repasto sanguíneo, centenas de esporozoítas que através de vasos linfáticos e sanguíneos migram até o fígado, invadem os hepatócitos, transformando-se em criptozoítas e, posteriormente, em merozoítas. Até este ponto o ciclo é denominado como pré-eritrocítico. Em seguida, as células do fígado são rompidas e os merozoítas são liberados iniciando o ciclo eritrocítico. Uma vez que estes parasitas invadem as células vermelhas onde, dentro de vacúolo parasitóforo e por reprodução assexuada, se desenvolvem na forma de anel (*ring*) ou trofozoíta jovem, seguido da forma trofozoíta maduro e finalizando com divisões nucleares produzindo esquizontes contendo merozoítas. Neste momento, o vacúolo parasitóforo e as hemácias são rompidas, sendo os parasitas liberados na corrente sanguínea podendo infectar outras hemácias. Durante os ciclos de infecção, uma parcela de parasitas, na corrente sanguínea, se diferenciam nas formas sexuadas (gametócitos feminino e masculino), as quais são ingeridas pelo inseto-vetor quando este pica o hospedeiro infectado. No trato digestório do mosquito, o microgameta se funde com o macrogameta, gerando a forma móvel oocineto, que se aloja e matura na membrana basal do epitélio, originando o oocisto que se rompe liberando milhares de esporozoítos, os quais migram para o epitélio da glândula salivar da fêmea

Anopheles possibilitando assim o recomeço do ciclo (Figura 2) (GREENWOOD et al., 2008).

Figura 2 - Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*.

O complexo ciclo de vida do parasita causador da malária se alterna entre hospedeiro invertebrado e vertebrado. No hospedeiro vertebrado dois ciclos estão presentes: o ciclo pré-eritrocítico, que ocorre no fígado, e o ciclo eritrocítico, que como o nome sugere ocorre nas células vermelhas. No inseto-vetor é gerada a forma infectiva do parasita. Fonte: Scherf e colaboradores (2008).

Aproximadamente 100 espécies de *Plasmodium* são conhecidas, dentre as quais cinco são agentes etiológicos da malária humana. As espécies *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* são caracterizadas pela febre terçã benigna, com acessos febris a cada 48 horas. São espécies que possuem a forma latente do parasita, hipnozoíta, que são indetectáveis em testes sanguíneos e assintomáticos. Porém, se caracterizam por apresentarem recrudescência da doença em qualquer momento. A terceira espécie citada, o *Plasmodium malarie* causa a febre quartã com acessos febris a cada 72 horas. A última espécie descrita por infectar o homem foi *Plasmodium knowlesi* inicialmente associada somente a infecção em primatas. Por fim, temos a espécie *Plasmodium falciparum*, causadora da febre terçã maligna com acessos febris de 48 horas, essa espécie é considerada a mais virulenta pela presença de sofisticados mecanismos de sobrevivência (KIRK, 2001), sendo responsável por 90% dos casos letais (VOGEL, 2013) e alvo de estudo deste trabalho.

Os sintomas clínicos característicos de malária não complicada englobam febre alta, dores musculares, dores de cabeça, calafrios, vômitos, náuseas e

vertigem. Quando a doença está avançada sintomas clínicos mais complicados como anemia grave, prostração, disfunção de múltiplos órgãos, malária cerebral e malária placentária, começam a ser observados (CHEN; SCHLICHTERLE; WAHLGREN, 2000).

1.1.1 Tratamento da Malária

Devido à alta taxa de mortalidade relacionada à malária humana, o controle da doença se faz necessário e depende principalmente do uso de fármacos, sendo o uso de vacinas terapêuticas ainda ausente.

Ao combate diretamente focado no hospedeiro invertebrado, mosquiteiros e inseticidas ainda são os modos mais eficazes para impedir o acesso da fêmea do inseto-vetor pertencente ao gênero *Anopheles* ao hospedeiro vertebrado.

Fármacos antimaláricos como cloroquina, primaquina, mefloquina, quinina, artemisinina e sulfadoxina/pirimetamina têm sido considerados como os principais compostos contra os parasitas, sendo eficazes tanto na eliminação do parasita, quanto na tolerância por parte do hospedeiro. Essas drogas atuam de forma independente nos (I) gametócitos do *P. vivax* e *P. malarie* e sobre o *P. falciparum* atuando no vacúolo digestivo (quinina), (II) inibindo a produção de purinas e pirimidinas (pirimetamina), (III) atuando sobre a forma esquizonte do parasita durante o ciclo eritrocítico (sulfadoxina/pirimetamina), (IV) agindo na via de detoxificação do grupo heme no vacúolo digestivo (mefloquina, cloroquina, artemisinina) (KLEIN, 2013).

A artemisinina inibe o desenvolvimento das formas assexuadas do parasita durante o estágio sanguíneo ao atuar no processo de detoxificação do grupo heme. Como mecanismo de resistência, o parasita passou a promover o desenvolvimento tardio dessas fases e, portanto, diminuir o processo de degradação da hemoglobina, responsável pela ativação da droga (WHITE, 1998).

Devido a resistência adquirida pelo parasita à artemisinina, e a outras drogas até então eficazes, a combinação de drogas antimaláricas (ACT - *artemisinin-based combination therapies*) tem se mostrado uma alternativa aparentemente eficaz no combate ao parasita (PRICE et al., 2007). Por tal motivo, desde 2006 a OMS adotou a ACT como o principal método utilizado para combater o *P. falciparum* (O'BRIEN et al., 2011).

A aparente resistência a drogas antimaláricas é proveniente de mutações a nível genético. Por este motivo, considera-se que o uso de drogas combinadas que atuam sobre alvos distintos têm sido uma alternativa promissora, pois a diminuição da susceptibilidade nem sempre acontece de forma simultânea (KLEIN, 2013; WHITE, 1998).

1.1.2 *Proteínas de superfície: sistema de citoadesão e captação de nutrientes*

Uma vez que o inseto vetor inocula o parasita no hospedeiro vertebrado este torna-se um corpo estranho e, portanto, seus processos de escape do sistema imunológico do corpo humano devem ser rápidos e eficientes. Neste sentido, o parasita possui uma maquinaria celular e molecular altamente eficaz que lhe facilita a sobrevivência e proliferação.

Inicialmente, as formas esporozoítas invadem os hepatócitos dentro dos quais se propagam rapidamente. A invasão é consequência da interação entre uma região altamente conservada, denominada *II-plus*, da proteína circunsporozoita (CS) do parasita com proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) presentes nos hepatócitos (SINNIS et al., 1994). Dentro dos hepatócitos, as formas merozoítas do parasita são geradas. Estas formas são caracterizadas também pela presença das duas organelas, as roptrias e os micronemas, que caracterizam o filo Apicomplexa.

Estas duas organelas são responsáveis pelo reconhecimento e interação com receptores das células do hospedeiro humano. Ambos eventos são promovidos por proteínas das famílias *Plasmodium falciparum Rh* e *Erythrocyte Binding-like*, que apresentam uma região rica em cisteínas que reconhecem epítomos específicos dos eritrócitos, como glicoforina A, glicoforina C e proteína 4.1, por exemplo (TOLIA et al., 2005). Isso remete ao fato de que, mesmo sendo deficiente em algum destes receptores, uma pessoa não está imune à invasão pelo parasita que possui outras alternativas para mediar estes processos (MILLER; GOOD; MILON, 1994).

Um sistema locomotivo, constituído, principalmente, por cadeias de miosinas e actinas promove a entrada dos parasitas nos eritrócitos (BAUMEISTER et al., 2006). Contudo, o sucesso na invasão não garante a sobrevivência do parasita.

Seguido da invasão, o parasita induz consideráveis mudanças estruturais na membrana dos eritrócitos ao exportar um amplo número de proteínas conhecidas como VSA (do inglês: *variant surface antigens*) que atuam na citoaderência em receptores presentes nos vasos sanguíneos e linfáticos (SCHERF; LOPEZ-RUBIO;

RIVIERE, 2008) e em eritrócitos não infectados, processo conhecido como *rosetting* (SARGEANT et al., 2006).

Estas mudanças facilitam o sucesso na perpetuação da infecção, uma vez que a citoaderência previne a passagem dos eritrócitos infectados pelo baço, órgão responsável pela triagem de eritrócitos jovens e velhos (BODDEY et al., 2009), e permite que os parasitas se estabeleçam em um ambiente que, após o acúmulo de eritrócitos infectados e obstrução do vaso, apresenta baixas tensões de oxigênio (CHEN; SCHLICHTERLE; WAHLGREN, 2000).

Todas estas proteínas exportadas à superfície eritrocítica são codificadas dentro do núcleo do parasita, traduzidas pelos ribossomos fora do sistema nuclear e transportadas à superfície eritrocítica através de estruturas membranosas móveis, que brotam da membrana do vacúolo parasitóforo e são conhecidas como fendas de Maure's ou através do conjunto de proteínas denominadas PTEX (*Plasmodium translocon of exported proteins*).

As proteínas de superfície são codificadas por um sistema multigênico, onde a cada infecção um gene é transcrito unicamente enquanto os outros permanecem silenciados. Essa constante alternância na expressão dos genes permite variar os fenótipos dos eritrócitos, contribuindo dessa forma com a permanência do parasita no hospedeiro (SCHERF et al., 2008). Este sistema multigênico é formado por 3 principais famílias multigênicas que possuem em comum a estrutura do gene formada por dois exons e um intron, um amplo polimorfismo e suas distribuições ao longo dos cromossomos, em especial nas regiões subteloméricas destes (ALBRECHT et al., 2006). Ao nível proteico, estas se caracterizam pela presença de um motivo PEXEL em sua extremidade amino-terminal, assinatura esta que facilita o seu tráfego para a membrana eritrocítica (BODDEY et al., 2009; ELSWORTH et al., 2014).

Outras proteínas importantes no processo de citoadesão estão codificadas na família dos genes *var*. Esta família é constituída por genes responsáveis por expressar um conjunto de proteínas *PfEMPs* (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Descoberta em 1995, a família multigênica *var* tem sido minuciosamente estudada devido a sua importância na infectividade do *P. falciparum* (SU et al., 1995). Sessenta genes *var* por genoma haploíde apresentam, ou não, o motivo PEXEL, seguido de uma região altamente variável constituída por 3 domínios (DBL,

CIDR e C2) com subdomínios (DBL $\alpha,\beta,\gamma,\delta,\epsilon$ e CIDR α,β,γ), um domínio transmembrana e na região carboxil-terminal apresentam um pequeno domínio intracelular ATS (*acidic terminal segment*) acoplado a uma proteína rica em histidinas (KAHRP) (Figura 3) (SMITH et al., 1995).

Figura 3 - Representação esquemática da proteína *PfEMP1* de *Plasmodium falciparum*.

Uma região extracelular altamente variada é constituída por domínios e subdomínios cuja organização definiu um tipo de proteína. A região intracelular, altamente conservada, possui um domínio ATS acoplado a uma proteína rica em histidinas.

As mais variadas possíveis organizações dos domínios e dos subdomínios fazem com que o parasita seja capaz de exportar proteínas distintas a cada invasão e consequentemente reconhecer receptores distintos. O processo de formação de rosetas ocorre através da interação de DBL-1 α com receptores CR1 dos eritrócitos (ROWE et al., 1997). Outros receptores como CIDR1 α e DBL2 β foram demonstrados na interação com os receptores CD36 e ICAM-1, respectivamente (CHEN; SCHLICHTERLE; WAHLGREN, 2000). O gene *var2CSA* foi responsável por codificar *PfEMP1*s que reconhecem receptores CSA presentes na placenta, promovendo a malária gestacional (GAMAIN et al., 2007; SMITH et al., 1995).

Seguindo com as famílias multigênicas conhecidas (BOWMAN et al., 1999) temos *rif* e *stevor*. As proteínas rifinas se assemelham as *PfEMP*s por serem alvos da resposta imune do hospedeiro. A família *rif* ainda é constituída por 200 genes que codificam proteínas rifinas dos tipos A e B. As proteínas rifinas A são exportadas para a superfície celular dos merozoítas, apresentando uma sequência sinal no N-terminal e uma região transmembrana, enquanto as proteínas rifins B ficam retidas no citosol (JOANNIN et al., 2008). As funções das proteínas rifinas vêm sendo aprofundadas e tem sido relacionadas com o processo de formação de rosetas. A família dos genes *stevor* codifica as proteínas stevors que são expressas em todas as fases do parasita, sendo exportadas para a superfície do eritrócito ou

permanecendo no citoplasma dentro de estruturas vesiculares (MCROBERT et al., 2004). Sua função todavia vem sendo explorada (CHENG et al., 1998).

Outras famílias multigênicas estão presentes no genoma do parasita, porém pouco se conhece sobre suas funções. São famílias descritas como *surf*, por exemplo, que codificam proteínas surfins que foram identificadas em grande quantidade no vacúolo parasitóforo ou na superfície do eritrócito indicando possível função na invasão. Os 10 genes *surf* são polimórficos, estão localizados em regiões subteloméricas e suas proteínas apresentam semelhanças com as *PfEMP's* (WINTER et al., 2005).

A modificação na superfície eritrocítica no momento da invasão do parasita *P. falciparum* promove uma alteração também na permeabilidade celular. O aumento na permeabilidade da membrana da célula hospedeira para nutrientes, na forma aniônica, açúcares, purinas, aminoácidos e cátions orgânicos (DESAI; BEZRUKOV; ZIMMERBERG, 2000) indicam a presença de novas vias de permeabilização carregados positivamente.

Para o *P. falciparum*, novas vias de absorção de nutrientes têm sido demonstradas e denominadas como NPP ("*new permeability pathways*") (BAUMEISTER et al., 2006). Estudos de permeabilidade revelam que eritrócitos infectados possuem uma corrente não saturante muito mais intensa que os eritrócitos não infectados e que o transporte intenso de ânions, e pequenos solutos, ocorre por pequenos canais de íons dependentes de voltagem, abundantes na superfície do eritrócito. Estes tipos de canais comunicam o meio extra com o meio intracelular. Os nutrientes absorvidos chegam ao parasita através de canais, não seletivos, presentes na membrana do vacúolo parasitóforo (DESAI et al., 2000).

Estruturas membranosas, conhecidas como redes túbulovesiculares, partem da membrana do vacúolo parasitóforo criando uma extensão até a superfície do eritrócito. Por este canal alguns nutrientes chegam diretamente ao parasita (LAUER et al., 1997).

Por outro lado, canais endógenos também desempenham um papel na absorção dos nutrientes, em especial na absorção de açúcares, importantes fornecedores de energia para o parasita. O canal de absorção de glicose está associado na membrana do eritrócito infectado e permite a absorção de glicose em concentrações moderadas que chegam até o parasita através da membrana do

vacúolo parasitóforo e da membrana do parasita (GINSBURG et al., 1983; KIRK; HORNER; KIRK, 1996).

Outras proteínas exportadas também assumem o papel de transportadores de nutrientes, tais como a fosfatase ácida (*PfSAP*) envolvida na desfosforilação extracelular de nutrientes (MULLER et al., 2009). Exemplos de nutrientes modificados pelo processo de fosforilação são: a vitamina B1, B6 e a glicose, acima citada, nos eritrócitos humanos. Dada a importância destas proteínas no que diz respeito à sobrevivência e, conseqüentemente, na proliferação do parasita, sugere-se que a interferência nessas proteínas seja prejudicial para este patógeno (CRABB et al., 1997).

Especificamente, requerimentos nutricionais, tais como hidratos de carbono, usados como fonte de carbono e energia, ou co-fatores como as vitaminas, têm sido assunto de estudo pelo nosso grupo (MULLER et al., 2009; WRENGER et al., 2008). *P. falciparum*, assim como plantas, bactérias e fungos, é capaz de sintetizar vitamina B6 *de novo*, ao contrário de mamíferos que adquirem os vitâmeros da vitamina B6 através da dieta (WRENGER et al., 2005).

A via de biossíntese de PLP (piridoxal-5'-fosfato), produto da fosforilação dos vitâmeros da vitamina B6 (piridoxal, piridoxina e piridoxamina e suas respectivas formas fosforiladas), quando catalisada pela enzima piridoxal kinase (PdxK) é considerada uma via alternativa, cuja finalidade não está bem definida. Isto porque o plasmódio biossintetiza a vitamina B6. Portanto, é desconhecido se esta via alternativa está presente para a fosforilação dos vitâmeros, eventualmente, importados ou para recaptação do piridoxal que provêm da desfosforilação do PLP (WRENGER et al., 2008). De qualquer forma, o produto PLP é um cofator importante que atua em mais de 140 reações enzimáticas de conversão de aminoácidos em reações de descarboxilação e transaminação e a enzima PdxK, atuando na fosforilação e desfosforilação da via de biossíntese de PLP, é crucial nos estágios sanguíneos do parasita (MULLER et al., 2009).

Pelo mencionado anteriormente, pode-se afirmar que proteínas do parasita exportadas à superfície eritrocítica atuam na citoadesão e captação de nutrientes, sendo estes processos essenciais para a sobrevivência deste no seu hospedeiro. Esta característica é considerada uma assinatura molecular que distingue eritrócitos infectados de eritrócitos saudáveis (ULRICH; WRENGER, 2009). Dessa forma, a

busca e identificação de ligantes altamente afins e específicos por essa nova assinatura molecular constituiria uma ferramenta útil para distinguir populações de eritrócitos infectados dos não infectados. Por outro lado, acredita-se, também que a interferência neste processo, finamente regulado e aparentemente essencial, pode ter efeitos letais neste parasita. Neste sentido, a técnica promissora conhecida como SELEX poderia nos ser útil para isso. Entenda-se por promissora no contexto das múltiplas aplicações onde esta pode ser usada mostrando resultados interessantes, como detalhados a seguir.

1.2 Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX)

Na década de 1990, a técnica SELEX foi descrita por Tuerk e Larry Gold (TUERK; GOLD, 1990) e por Andrew Ellington e Jack Szostak (ELLINGTON; SZOSTAK, 1990) com o intuito de gerar, através de seleção iterativa *in vitro*, moléculas de DNA ou RNA, denominados aptâmeros (do latim, *aptus* – “*fitting*” ou encaixar-se), que possuísem a capacidade de interação com um alvo específico por alta afinidade e especificidade.

O processo SELEX parte de uma biblioteca de nucleotídeos original aleatória, constituída por duas regiões constantes que flanqueiam uma região central randômica que pode variar entre 16 a 75 nucleotídeos. Essa biblioteca é sintetizada e posteriormente amplificada mediante a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). O produto gerado por esta amplificação (DNA de dupla fita, dsDNA) tem suas fitas separadas (DNA de simples fita, ssDNA) mediante um processo de desnaturação (Figura 4). O ssDNA é utilizado no processo de seleção contra o(s) alvo(s) de interesse. Em um processo de incubação, algumas moléculas ssDNA interagem com o(s) alvo(s), enquanto outras, que não possuem afinidade, não se ligam. Assim, apenas os ligantes de DNA são recuperados. Este seria um ciclo de seleção, denominado seleção positiva (Figura 4a). Contudo, a técnica SELEX é constitutída por n ciclos iterativos. Neste caso, os ligantes ssDNA recuperados, no último passo do ciclo, são utilizados como DNA molde durante um novo ciclo de amplificação, dando continuidade ao ciclo seguinte de seleção. Através de ciclos sucessivos, a seleção por ligantes cada vez com maior afinidade pelo(s) alvo(s) vai se restringindo progressivamente. Considerando também a interação com ligantes inespecíficos durante a seleção, torna-se imprescindível que ciclos de seleções

negativas (se^-) sejam realizados, a fim de remover moléculas ssDNA com afinidade por alvos indesejados. Neste caso, as moléculas ssDNA não ligadas são recuperadas para amplificação (Figura 4b) (ZIMBRES et al., 2013).

Figura 4 - Ilustração do mecanismo da técnica SELEX utilizando biblioteca de DNA para identificação celular.

Ciclos de seleção positiva são aplicados contra alvos de interesse (a). Moléculas que se ligam ao alvo (bolinhas verdes) são recuperadas, amplificadas e utilizadas no ciclo seguinte. Ciclos de seleção negativa (b) devem ser aplicados para recuperar apenas as moléculas que não se ligam a amostra negativa (bolinhas vermelhas). Fonte: Zimbres et.al., 2013.

Aptâmeros de RNA também podem ser utilizados. No entanto, prévio ao primeiro passo de amplificação é necessário que uma etapa adicional de transcriptase reversa seja adicionada.

O número de ciclos de seleção a ser realizado é indeterminado, o que depende do alvo e dos cuidados obtidos durante cada ciclo. É importante que após alguns ciclos de seleções a heterogeneidade do conjunto de DNAs que se ligam a cada ciclo seja conferida (MENCIN et al., 2014).

A partir do momento que o manipulador considera que o maior número de sequências afins foram obtidas, procede-se à análise das moléculas de DNA específicas presentes na região randômica. Este passo, considerado crítico, visa comparar as sequências obtidas e a sua frequência ao longo da seleção, bem como realizar buscas de motivos conservados e observar se estes motivos estão localizados dentro de estruturas de grampo (*stem-loop*), local onde deve ocorrer a

interação entre DNA-proteína (LEE et al., 2004). Antigamente as análises dos motivos conservados eram realizadas manualmente e inferências estruturais eram feitas apenas a partir de alguns parâmetros bioquímicos. Os avanços computacionais permitiram que programas como MEME Suite (BAILEY et al., 2009), MEMERIS (HILLER et al., 2006), GLAM2 (FRITH et al., 2008), RNAcontext (KAZAN et al., 2010), Aptamotif (HOINKA et al., 2012), entre outros, automatizassem este trabalho.

Outros programas também auxiliam a definição das estruturas secundárias dos aptâmeros que contribuem para a estabilidade e propriedades bioquímicas dos aptâmeros, bem como sua afinidade para com o alvo. As estruturas secundárias são geradas a partir das já conhecidas interações entre as quatro bases de nucleotídeos que constituem o DNA. Consequentemente, as bases que não pareiam entre si geram as estruturas conhecidas como grampo (ZUKER, 2003). Comparações entre os *stem-loop* de DNA e RNA sugerem que a estrutura de DNA pode ser menos estável, porém é mais flexível, o que lhe confere maior diversidade de conformações estruturais (ZIMBRES et al., 2013).

Figura 5 - Componentes da estrutura secundária de aptâmeros.

Cinco tipos distintos de emparelhamento nas bases de DNA podem formar as estruturas secundárias das moléculas de DNA típicas dos aptâmeros. Estas são formadas por pares de bases que se pareiam, formando uma dupla fita, e bases que não se complementam gerando assim uma estrutura simples fita, conhecida como grampo. Fonte: Hoinka et.al., 2012.

Quatro tipos de grampos são definidos: (I) *hairpin loop*; (II) *bulge loop*; (III) *interior loop*; e (IV) *multibranch loop*. O *multibranch loop* é o componente central da estrutura e está limitado aos outros três grampos, sendo os centrais (*bulge loop* e o *interior loop*) estruturas que se derivam um do outro e possuem flexibilidades distintas (Figura 5) (ELSWORTH et al., 2014).

A interação entre aptâmero e o alvo é específica a nível de sequência e é dependente do dobramento do ligante sobre o alvo. A especificidade é tamanha que um aptâmero de DNA selecionado contra um alvo não interage da mesma forma que um aptâmero de RNA selecionado contra o mesmo alvo e vice versa (ELLINGTON; SZOSTAK, 1990).

As interações dos aptâmeros com seus alvos ocorrem por complementaridade, interações polares, interações por pontes de hidrogênio e interações carga-carga. Davies e colaboradores (2012) relatam a forte interação entre aptâmeros selecionados contra PDGF- BB (*platelet-derived growth factor B*) através de ligações hidrofóbicas promovidas entre nucleotídeos e resíduos de aminoácidos da proteína. Este tipo de interação, junto com interações carga-carga, se assemelham muito às interação observadas entre as proteínas. A interação promovida com alta afinidade entre aptâmeros se assemelham a anticorpos monoclonais quando passam a reconhecer as moléculas alvo apresentando baixas constantes de dissociação, que variam desde a faixa nanomolar a picomolar (ULRICH; MARTINS; PESQUERO, 2004).

Apesar das semelhanças entre aptâmeros e anticorpos algumas diferenças relevantes devem ser levadas em consideração. Aptâmeros, por exemplo, (1) são sintetizados enzimaticamente e, portanto, é prescindível o uso de animais e são passíveis de modificações químicas quando necessário (SEFAH et al., 2010), (2) a amplificação do *pool* de DNA é realizada por síntese química, proporcionando assim uma fonte de material mais consistente (HOINKA et al., 2012), (3) os aptâmeros possuem baixa imunogenicidade e, portanto, não causam efeitos secundários indesejados decorrentes de respostas imunes nos seus hospedeiros (ULRICH; WRENGER, 2009), (4) aptâmeros possuem maior flexibilidade e menor tamanho, o que lhe permite acessar a partes mais difíceis dos alvos (ULRICH; WRENGER, 2009) e (5) a estrutura de um aptâmero é mais resistente a variações de temperatura e pH (HOINKA et al., 2012; NERY; WRENGER; ULRICH, 2009).

As modificações passíveis de serem realizadas nos aptâmeros após a seleção conferem uma meia vida maior dentro de fluídos humanos. No caso de aptâmeros de RNA, os grupos hidroxila dos carbono 2-3 da ribose (2',3'-OH) podem ser substituídos por pirimidinas modificadas com o grupo flúor ou amino, conferindo

resistência contra a ação de nucleases (GORINGER; HOMANN; LORGER, 2003; ULRICH et al., 2004).

Modificações nos nucleotídeos dos aptâmeros selecionados também contribuem para um aumento na afinidade de ligação. Isso tem sido utilizado positivamente com o intuito de promover o acesso e interação entre grupos funcionais dos aptâmeros modificados e locais de difícil acesso de proteínas, cuja ordem de interação é duas vezes mais forte do que aptâmeros não modificados (DAVIES et al., 2012).

Por outro lado, aptâmeros podem ser ainda marcados com biotina, cuja altíssima afinidade por estreptavidina pode ser aproveitada mediante o uso de colunas cromatográficas acopladas a esta proteína, facilitando a sua captura para identificação dos ligantes associados (JAVAHERIAN et al., 2009).

Pelo anteriormente exposto, os aptâmeros podem ser produzidos contra uma ampla gama de alvos moleculares, que vão desde pequenas moléculas orgânicas ao longo de macromoléculas, tais como proteínas ou complexos proteicos (HOMANN; GORINGER, 1999; MALLIKARATCHY et al., 2007; SHANGGUAN et al., 2008; VAN SIMAEYS et al., 2010). Este amplo espectro de moléculas alvo permitem a sua aplicação de alto rendimento em biomarcadores, diagnóstico e terapia.

1.2.1 Aptâmeros como biosensores

As concepções recentes de funções de ácidos nucleicos e, especificamente, o poder de DNA como ligantes específicos e com afinidade por um alvo, abriram novas oportunidades para o desenvolvimento de novos biossensores. Inclusive, mudanças nas características dos alvos podem servir como sinais quantitativos associados com o estado celular que se encontra podendo dessa forma serem utilizados na identificação de doença e tratamento (CHERNEY; OBRECHT; KRYLOV, 2013).

Em 1996, Morris e colaboradores conferiram a aplicabilidade da técnica a partir de um complexo proteico utilizando membranas de células vermelhas. Os autores confirmaram que a SELEX era capaz de selecionar aptâmeros contra alvos específicos e com a mesma afinidade de ligação quando alvos puros são utilizados desde o início do processo.

Trabalhar com a célula intacta nos permite buscar o alvo somente ao fim das seleções, terminar com uma alta gama de alvos reconhecidos por distintos

aptâmeros, resultando em possíveis biomarcadores que terão sido selecionados contra alvos em suas formas nativas (SEFAH et al., 2010). São processos de seleções que ocorrem simultaneamente e independentes (MORRIS et al., 1998).

Lorger e colaboradores (2003) selecionaram aptâmeros contra a glicoproteína de superfície variante (VSG) de *Trypanosoma brucei* com capacidade de *switch* iguais as proteínas de superfície provenientes do *P. falciparum*. Neste trabalho puderam observar que aptâmeros específicos reconheciam especificamente essa proteína, gerando um biomarcador específico (GORINGER et al., 2003).

A possibilidade de gerar um conjunto de aptâmeros contra uma superfície celular definida pela sua composição proteica remete, consequentemente, à capacidade de gerar biomarcadores típicos que apresentam minimamente os problemas comuns de um biomarcador. Isto é a geração de falsos positivos e falsos negativos, através dos ciclos de seleção e do enriquecimento das moléculas, respectivamente (BEREZOVSKI et al., 2008).

Aptâmeros sempre foram selecionados contra proteínas alvo purificadas. No entanto, grupos tem desafiado aptâmeros contra proteínas alvos a partir de lisados proteicos (JAVAHERIAN et al., 2009). O intuito é utilizar aptâmeros como biossensores quando passam a purificar uma proteína alvo a partir de um lisado de células. Essa técnica foi denominada de AptPIC (*Aptamer facilitated Protein Isolation from Cells*).

1.2.2 Aptâmeros para diagnóstico

Como mencionado anteriormente, aptâmeros poderiam ser vistos como alternativas ao uso de anticorpos para diagnósticos *in vitro* e *in vivo*. Liss e colaboradores (2002) demonstraram que aptâmeros e anticorpos possuem a mesma sensibilidade para reconhecer especificamente IgE humano, por exemplo. Contudo, a sensibilidade dos aptâmeros em relação ao anticorpo foi de 10 vezes maior (LISS et al., 2002).

Aptâmeros também foram selecionados contra as proteínas de membranas externas (OMPs) da bactéria *Salmonella enterica* serovar [cepa Typhimurium multidrug-resistant (MDR)] utilizando OMPs de *Escherichia coli* como controle negativo da seleção. Ao fim, os autores identificaram aptâmeros capazes de

interagirem seletiva e especificamente com proteínas da membrana externa (JOSHI et al., 2009).

Outra doença séria que atinge o ser humano é o vírus da hepatite C. Visando encontrar um modo de interferir com o vírus, Chen e colaboradores (2009), selecionaram aptâmeros contra a glicoproteína de superfície do envelope, E2. Ainda que o aptâmero ZE2, assim denominado, não interfira diretamente na proteína, uma inibição competitiva foi evidenciada entre ZE2 e E2 pelo importante receptor de HCV, o receptor CD81. Desse modo, o aptâmero ZE2 caracteriza-se pela sua potência para como novo marcador de diagnóstico e candidatos terapêuticos em infecções por HCV.

1.2.3 Aptâmeros para terapia

Um grande esforço desde a invenção da técnica SELEX tem sido gerar aptâmeros como alternativa terapêutica. Trabalhos como o de Ulrich e colaboradores (2002) demonstraram a possibilidade do uso de aptâmeros que deslocam as formas infecciosas de *Trypanosma cruzi* dos seus sítios de ligação nas macromoléculas de superfície da célula hospedeira (fibronectina, heparan sulfato, trombospondina e laminina), as quais são importantes mediadores no processo de adesão e invasão do *T. cruzi* à célula hospedeira. Os autores identificaram quatro classes de aptâmeros que apresentavam os motivos estruturais conservados dentro as regiões de *stem-loop*. A afinidade do complexo aptâmero-receptor foi calculada entre 40 a 400 nM (ULRICH et al., 2002).

Barford e Lindh (2009) demonstraram que o processo de *rosetting*, citado anteriormente, era passível de interrupção mediante o uso de aptâmeros. Os aptâmeros selecionados contra o domínio DBL1 α , conservado entre as proteínas de superfície de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*, mostraram inibição parcial do *rosetting* em doses baixas (33 nM) e total em doses aproximadamente 10 vezes maior (BARFOD; PERSSON; LINDH, 2009).

Em 2007, Chen e colaboradores isolaram aptâmeros, denominados NK2, com alta afinidade e especificidade contra proteínas específicas presentes na superfície da membrana bacteriana *M. tuberculosis* (cepa H37Rv). A interação entre NK2-alvo estimulou a produção de IFN- γ em linfócitos T CD4+, o que está diretamente associado a uma resposta protetora contra este patógeno. Estudos *in vivo* revelaram

que a infecção por *M. tuberculosis* em camundongos tratados com NK2 era menor ao grupo controle. Dessa forma, os aptâmeros selecionados foram considerados potenciais agentes anti-micobacteriais (CHEN et.al., 2007).

Outro estudo, aptâmeros foram selecionados com elevada afinidade e especificidade contra a transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os aptâmeros selecionados inibiram a atividade catalítica dessa enzima, o que afetou a replicação viral (HELD et al., 2006) (CHALOIN et al., 2002). Estes resultados enfatizam claramente que aptâmeros que interagem com transcriptase reversa de vírus são ferramentas promissoras a serem utilizadas com fins terapêuticos.

A seleção de aptâmeros com fins terapêuticos tem rendido produtos como o Macugen® (Eyeteck Pharmaceuticals/Pfizer, Puur, Bélgica). Este é um aptâmero que se liga ao fator de crescimento endotelial vascular humano (VEGF), utilizado para o tratamento de degeneração macular relacionada com a idade (NG; ADAMIS, 2006).

Selex também tem sido utilizado como alternativa quimioterápica, onde a produção de aptâmeros que se ligam a proteínas puras ou provenientes de um complexo pode oferecer vantagens práticas. Utilizando células inteiras, por exemplo, os aptâmeros selecionados prescindem de uma apresentação inicial do alvo e, pode-se obter moléculas altamente específicos e de alta afinidade (DAVYDOVA; VOROBJEVA; VENYAMINOVA, 2011).

Durante os ciclos de seleção, podem-se variar as proporções de alvo e ligantes, adicionar competidores inespecíficos ou aplicar números crescentes de passos de lavagens podem se considerar com o intuito de aumentar a seletividade pelo alvo. O número de ciclos de seleção é indeterminado, contudo deve ser finalizado a partir do momento em que ciclos consecutivos são realizados e a heterogeneidade do pool de DNA seja diminuta (NERY et al., 2009; TOMBELLI; MINUNNI; MASCINI, 2005).

A adição de competidores específicos se faz necessária para que sítios inespecíficos de ligação ou mesmo aptâmeros de baixa afinidade não sejam um problema durante a seleção, o que otimiza a seleção dos aptâmeros. Competidores inespecíficos como tRNA de levedura tem sido utilizados na técnica de SELEX.

Em 2013, Cherney e colaboradores, demonstraram o uso de um “mascarador de DNA” como competidores de sítios inespecíficos. Estas moléculas possuem o

mesmo tamanho da região aleatória da biblioteca original e as concentrações de AT e GC são iguais. Seu uso faz com que a triagem de moléculas afins por sítios específicos seja mais eficiente, além de contribuir para a integridade das sequências específicas ao serem alvos da ação de nucleases (CHERNEY et al., 2013).

O processo convencional de SELEX, constituído essencialmente por passos de amplificação, interação e eluição, tem sido abordado por distintos grupos de pesquisa com diversos alvos e aplicações. Novas técnicas e otimizações do processo tem facilitado a seleção destes, o que se reflete, por exemplo, no tempo em que os ciclos iterativos são realizados.

Neste sentido, grupos tem adicionado técnicas que contribuem para uma seleção mais rápida, como por exemplo, o uso de eletroforese capilar, técnica aplicada no nosso estudo.

1.2.4 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar é mais uma derivação da técnica de eletroforese que separa moléculas por diferença de carga e tamanho. O uso de colunas capilares dentro de um sistema eletroforético é vantajoso levando em consideração que a área de superfície interna do capilar e o volume de amostra necessário para uma leitura detalhada, bem como a distribuição eficiente de calor ao longo da corrida contribuem para uma alta eficiência na separação das moléculas em análise (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

No caso do SELEX, a adição do método de eletroforese capilar tem sido caracterizada por sua eficiência, que é pelo menos duas ordens de magnitude maior do que o método convencional, uma vez que poucos ciclos de seleção são necessários para a triagem de aptâmeros específicos e de alta afinidade por uma proteína recombinante (MUSHEEV; KRYLOV, 2006). Além disso, grupos que utilizam a técnica afirmam que a separação de ligantes e não ligantes é muito mais eficiente (O'CONNELL et al., 1996).

Através de um capilar sob condições de não equilíbrio [Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures (NECEEM)] (Figura 30) e uma voltagem alta é aplicada para separar as frações da amostra que migram do eletrodo

de carga positiva ao eletrodo de carga negativa pelo fluxo eletrosmótico, EOF (BEREZOVSKI; KRYLOV, 2002).

Quando uma amostra contendo um complexo DNA-proteína é inserida no capilar, através da aplicação de uma tensão elétrica, uma voltagem é aplicada, até um determinado momento o complexo migra junto. Contudo, devido às diferenças de cargas o complexo começa a se dispersar. Proteínas tendem a migrar mais rápido quando comparadas com o DNA (TAGLIARO et.al., 1998). Consequentemente, as interações fortes entre eles tendem a migrar em uma velocidade intermediária.

Moléculas de DNA podem ser marcadas com fluoresceína permitindo assim que a corrida seja demonstrada por detecção de fluorescência induzida por laser. Devido a estrutura fortemente negativa do DNA este migra mais lentamente e as moléculas de DNA não ligadas migraram consequentemente de forma mais devagar mais o complexo e as proteínas isoladas (KANOATOV; KRYLOV, 2011).

A detecção dos analitos é realizada exatamente no momento em que eles passam por uma “janela de detecção”, extremamente frágil, que nada mais é do que uma pequena parte do revestimento do capilar removido por calor (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

O método NECEEM permite que parâmetros cinéticos e de equilíbrio da reação sejam medidos visando compreender a dinâmica do complexo (BEREZOVSKI; KRYLOV, 2002). Além da possibilidade de recuperar amostras importantes durante o processo de seleção de moléculas de DNA contra proteínas para seguintes análises.

Perante ao que foi introduzido sobre SELEX e seu produto, um oligonucleotídeo denominado aptâmero, consideramos que a técnica pode ser uma alternativa promissora contra proteínas de superfície eritrocítica exclusivas do parasita causador da malária, bem como contra a proteína recombinante piridoxal quinase envolvida na biossíntese de vitamina B6, fundamental para o desenvolvimento de *P. falciparum* dentro de eritrócitos infectados.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A malária é causada pelo parasita unicelular do gênero *Plasmodium* que possui um complexo ciclo de vida que se alterna entre um hospedeiro invertebrado e vertebrados, dentre eles os humanos. Responsável por mais de meio milhão de mortes no mundo, o parasita possui um sistema de sobrevivência sofisticado. Após a infecção, a persistência do parasita no eritrócito é mediada por proteínas integradas à membrana do eritrócito que atuam (1) na citoaderência à vasos endoteliais, evitando assim a passagem destes eritrócitos ao baço, e (2) como transportadores de moléculas, entre esses nutrientes.

Um grande problema, responsável pela dificuldade na eficiência de drogas contra este parasita é a ocorrência de mutações/alterações que evadem a resposta anti-plasmódio. A aparição de proteínas distintas em cada infecção dificulta também o processo de reconhecimento por parte do sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, é de grande relevância a necessidade pelo desenvolvimento de novos compostos antimaláricos que de fato consigam interferir com os mecanismos de escape do parasita.

Neste sentido, utilizar um método artificial que substitua o método natural, como produção de anticorpos, capaz de detectar proteínas expostas com frequência e/ou canais de transporte de nutrientes poderia ser uma alternativa viável com fins quimioterápicos. O método proposto nos ajudaria a encontrar ligantes de alta afinidade e especificidade contra um determinado alvo e com possível capacidade de bloqueio do mesmo.

A técnica que poderia nos conceder isso é uma técnica bastante promissora, conhecida como SELEX, que vem sendo utilizada por muitos grupos de pesquisas com os mais distintos alvos de interesse. Ainda que a técnica seja trabalhosa, dispendiosa e demorada o produto resultante, chamado aptâmero, pode ser produzido através de reações enzimáticas em escala industrial.

Em vista disso, os objetivos deste trabalho são:

- (a) Selecionar aptâmeros de DNA contra epítomos de eritrócitos infectados por *P. falciparum*;
- (b) Realizar ensaios de ligação e de proliferação do parasita nos eritrócitos infectados durante o tratamento com aptâmeros;
- (c) Avaliar a localização subcelular dos aptâmeros selecionados;
- (d) Identificar os alvos de interação com aptâmeros selecionados;

(e) Selecionar aptâmeros de DNA contra a enzima recombinante piridoxal quinase (PdxK) de *P. falciparum*;

(f) Analisar o potencial de interferência dos aptâmeros selecionados contra a atividade enzimática da proteína recombinante *PfPdxK*;

(g) Realizar ensaios de proliferação em cultura celular utilizando aptâmeros selecionados contra a proteína recombinante *PfPdxK*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de aptâmeros contra eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* (Cell- SELEX)

3.1.1 Cultivo do parasita *Plasmodium falciparum*

As formas do ciclo intra-eritrocítico do parasita *P. falciparum*, cepa 3D7 (Figura 6), foram cultivadas de acordo ao descrito por Trager e Jensen (1976) em meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de tampão HEPES, 0,2% de bicarbonato de sódio (p/v), 0,02 M D-glicose e 100 µM de hipoxantina dissolvida em 0,1 M hidróxido de sódio, ajustado a um pH final de 7,4. O meio de cultura foi suplementado com 10% de plasma humano (v/v) (gentilmente cedido pelo Doutor Isolmar Schettert do Instituto do Coração, Incor - USP) previamente aquecido a 64 °C por 1 hora e, posteriormente, submetido a centrifugação (3.000 x g por 30min a 4 °C) para precipitar a fibrina, responsável pela coagulação sanguínea. Sangue humano do tipo O⁺ é adicionado à cultura de modo a manter um hematócrito de 3%. As culturas de parasitas são mantidas à 37 °C sob uma atmosfera gasosa de 90% de N₂, 5% de O₂ e 5% de CO₂. A parasitemia é monitorada mediante a preparação de esfregaços em lâminas, fixadas em etanol absoluto e coradas com Panótico Rápido® (Labordin, Pinhais, PR., Brasil).

Figura 6 - *Plasmodium falciparum* isolado 3D7.

As figuras mostram as forma de vida do parasita no ciclo eritrocítico mediante a coloração diferencial com Panótico Rápido®. (A) forma trofozoíta jovem (*ring*) (B) forma trofozoíta madura e (C) forma esquizonte do parasita. Aumento de 100X sob microscópio de luz.

3.1.2 Desenvolvimento de aptâmeros de DNA através da técnica SELEX

O desenvolvimento de aptâmeros de DNA foi iniciado mediante reação de PCR em larga escala (20 reações de 100 µl cada) para a amplificação da biblioteca randômica original de DNA: 5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCT-N34-CGCTTATTCTTGTCTCCC-3', caracterizada por possuir uma região randômica, onde N significa incorporação aleatória de A, C, G e T, flanqueada por regiões constantes que permitem a incorporação do conjunto de iniciadores sintetizados (DANIELS et al., 2003). Com o intuito de otimizar a amplificação linear do DNA algumas modificações foram introduzidas na PCR como a presença de 5 M de betaína e DMSO puro. Além dos aditivos, a mistura da reação de PCR contém: 10 X PCR Buffer com (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 100 pmol dos iniciadores *sense* e *anti-sense*, 5 U *Taq*-DNA polimerase (Fermentas®), 10 fmol da biblioteca randômica e H₂O q.s.p. 100 µl. Os oligonucleotídeos utilizados foram providos de modificações: primer *sense* (100 pmol/µl) acoplado a tripla cauda de biotina (5'-BBB-GCCTGTTGTGAGCCTCCT-3') e primer *anti-sense* (100 pmol/µl) marcado com FITC (5'-FITC-18C-GGGAGACAAGAATAAGCG-3', onde 18C denota um espaçador de 18-carbono etileno glicol. O programa de amplificação se iniciou com uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido por *n* ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 42 °C e 45 segundos a 72 °C e sendo finalizado com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C (ou 25 minutos para clonagem em vetor TOPO (vide item 3.1.6.1). Os produtos de PCR foram precipitados com 10% (v/v) de acetato de sódio (AcNa) 3 M (pH 5,2), 10% (v/v) de glicogênio 0,1% e 5% (v/v) de cloreto de magnésio 1 M, completando com etanol absoluto (EtOH) gelado na proporção de 4 partes de etanol para cada parte de amostra. Após 16 horas, o produto precipitado foi centrifugado (4.500 x *g* por 30min a 4 °C), lavado com etanol 70% gelado e, novamente, centrifugado nas mesmas condições durante 10 minutos. Após disso, o DNA precipitado foi ressuspendido em formamida 100%. A fim de obtermos uma simples fita de DNA (ssDNA) o produto foi submetido a um gel contendo 12% acrilamida (v/v) e 6 M uréia. As amostras foram previamente desnaturadas por 30 minutos à 95 °C juntamente com tampão de amostra para DNA (0.25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol FF e 30% glicerol em H₂O). Após aproximadamente 3 horas de corrida à 350 V a banda de nosso interesse foi cortada do gel. O fragmento obtido foi macerado até obter um granulado extremamente fino,

o qual foi ressuspenso em 1 ml de H₂O milli-Q, seguido da extração por fenol:clorofórmio.

3.1.2.1 Extração de ssDNA por fenol: clorofórmio

A ssDNA foi completamente extraída do gel mediante adição de 1 volume de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico [25:24:1 (v/v)] (pH: 8,0) e misturado por inversão. A separação do DNA foi realizada mediante centrifugação (15 minutos, 4.500 x g, 4 °C), onde a fase aquosa, contendo o DNA, foi coletada para uma nova extração com 1 volume de clorofórmio puro. O sobrenadante foi cuidadosamente recuperado e precipitado com AcNa e EtOH, como descrito anteriormente, durante 16 horas a -20 °C.

3.1.3 *Ciclos iterativos de SELEX*

O processo de seleção iterativo *in vitro* foi iniciado por uma seleção positiva (sel⁺), onde os eritrócitos infectados com o parasita em estudo foram utilizados. A sel⁺ foi iniciada com uma incubação entre o *pool* de ssDNA (fitas simples da biblioteca original de DNA amplificada) purificado e o alvo. Precedente à incubação com o alvo, a biblioteca junto ao tampão de seleção 5x (7 mM KCl, 725 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 9 mM CaCl₂-2H₂O e 125 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 e 50 mM D-glicose) foi desnaturada a 85 °C por 20 minutos seguida de uma renaturação a 24 °C por 10 minutos. Quanto ao alvo 5 x 10⁶ de cultura celular infectada foi centrifugada (10 minutos, a 150 x g a 4 °C) para remover o meio de cultura. A mistura de ssDNA e células foi incubada a temperatura ambiente, sob constante e baixa agitação por 40 minutos. A separação das ssDNA que se ligaram ao alvo daquelas moléculas não ligadas foi realizada mediante a técnica desenvolvida por Giordano e colaboradores (2001), conhecida como BRASIL.

3.1.3.1 BRASIL (Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands)

A técnica BRASIL (GIORDANO et al., 2001) parte de uma centrifugação diferencial em que a amostra da incubação é suspensa em uma fase orgânica, denominada óleo ciclohexano [ftalato de dibutilo: ciclohexano 9:1 (v/v)]. Para tal, ao “tubo BRASIL” adicionamos inicialmente 200 µl de óleo ciclohexano seguido dos 100 µl da nossa amostra e centrifugamos durante 15 minutos, a 10.000 x g a

temperatura ambiente. O sobrenadante contendo ssDNA não ligado deve ser guardado para experimentos posteriores (vide item 3.1.8.) enquanto o óleo pode ser descartado. O precipitado, contendo os eritrócitos com os ligantes de DNA, foi desprovido de qualquer resquício de óleo e ressuspendido em 300 µl de água milli-Q. Para a separação dos ligantes das células seguimos com a extração por fenol:clorofórmio, seguida de uma precipitação por EtOH e aditivos das sequências selecionadas (item 3.1.2). O *pool* de ssDNA recuperado foi amplificado por PCR dando início ao ciclo seguinte.

3.1.3.2 Ciclos substrativos de SELEX utilizando células vermelhas não infectadas

A dita seleção negativa (sel^-) foi realizada nas mesmas condições citadas no tópico 3.1.3, exceto em dois momentos. (I) O alvo utilizado eram eritrócitos não infectados, coletados diretamente do estoque de sangue do tipo O^+ , utilizados para a cultura celular. Após a incubação, a amostra foi submetida a centrifugação diferencial e, neste caso, (II) o sobrenadante que possuía as ssDNA que não se ligaram aos eritrócitos não infectados foram recuperados e o precipitado contendo eritrócitos naive com ssDNA ligadas foram guardados. O volume do sobrenadante recuperado foi completado com água milli-Q até 300 µl e submetido a extração por fenol:clorofórmio seguido de precipitação por EtOH e aditivos.

3.1.3.3 Dupla seleção de SELEX (ciclo de seleção contra os epítomos alvo seguido de ciclo de subtração)

A dupla seleção em SELEX é caracterizada, como o próprio nome sugere, pela presença da sel^- e da sel^+ , respectivamente, em um mesmo ciclo. Assim, o sobrenadante recuperado após a centrifugação diferencial da sel^- , contendo àquelas moléculas não ligadas aos eritrócitos sem infecção, foi apresentado diretamente aos eritrócitos infectados, iniciando assim a sel^+ e finalizando-a, conforme descrito acima (item 3.1.3.2).

3.1.4 *Sincronização de parasitas*

Dez mililitros da cultura de *P. falciparum*, cepa 3D7, em fase trofozoíta jovem (Figura 6A) foram transferidos para um tubo de 15 ml e centrifugados (150 x g por 10min à 4 °C). O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e ao precipitado foram adicionados 5 volumes de sorbitol 5% (p/v), previamente aquecido, seguido por uma

incubação de 5 minutos à 37 °C. Novamente, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 10 volumes de meio RPMI-1640 sem suplemento. Duas lavagens adicionais foram realizadas e as células foram ressuspensas em 10 ml de meio RPMI-1640 suplementado com plasma e transferidas para uma nova garrafa. A partir desse momento, os parasitas foram mantidos de acordo ao descrito por Trager e Jensen (1976).

3.1.5 Análise microscópica das moléculas de DNA ligados a epítomos de superfície celular

Para confirmarmos a interação entre o ssDNA e as proteínas exportadas à superfície eritrocítica foram misturados 1 µM de ssDNA, marcados com FITC, com 5×10^3 células vermelhas infectadas e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguido disto foram separados 30 µl e acrescentados 0.2 µg/ml do marcador Hoechst 33342 (Invitrogen®), seguido por um passo de lavagem com tampão de seleção 1 x. A visualização das lâminas foi realizada no microscópio de fluorescência *Imager.M4* (Zeiss®, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) sob aumento de magnificação 100 x, gentilmente disponibilizado pelo Prof. Dr. Claudio Marinho (Instituto de Ciências Biomédicas II - USP).

3.1.6 Análise das moléculas de DNA selecionadas no processo SELEX

3.1.6.1 Clonagem

A clonagem das moléculas de DNA selecionadas durante o processo SELEX foi realizada mediante o uso do vetor TOPO (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific), seguindo indicações do fabricante. O *pool* de ssDNA selecionado foi submetido a amplificação por PCR, sendo o produto analisado mediante gel de acrilamida não desnaturante 8% (acrilamida 40 %, TBE 10X, pH:8.0 e H₂O q.s.p. 10 ml). Quatro microlitros (4 µl) do produto de PCR foram diretamente utilizados para a clonagem em 1 µl de vetor junto a 1 µl de solução salina (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂). A ligação dos fragmentos de DNA foi realizada por 15 minutos a temperatura ambiente e 3 µl desse produto foram misturados com 100 µl de bactérias quimiocompetentes da cepa DH5α de *E. coli*. A mistura foi incubada, inicialmente, durante 30 minutos no gelo, seguido de uma incubação por 2 minutos à 42 °C para inserção do DNA de interesse. Em seguida, as células foram recuperadas em 900 µl de meio SOC (2%

triptona, 0.5% extrato de levedura (p/v), 0,05% NaCl, 2.5 mM KCl e 20 mM de D-glicose), incubadas à 37 °C sob agitação constante a 180 r.p.m. Após 1 hora de incubação, as células foram centrifugadas por 2 minutos a 3.000 x g e o precipitado ressuspensionado em 100 µl de meio LB fresco. As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina (50 µg/ml), X- gal (40 µg/µl) e IPTG (100 mM), indutor do operon *lac*. Após isso, as bactérias foram incubadas à 37 °C por 16 horas e as colônias positivas foram crescidas em meio LB líquido. A extração do DNA plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina, utilizando o kit *peqGOLD Plasmid Miniprep* (PeqLab®, Jena, Alemanha). A verificação dos fragmentos de interesse foi realizada mediante digestão com a enzima de restrição *EcoRI* e sequenciamento automático como descrito por Sanger e colaboradores (1977).

3.1.6.2 Sequenciamento

Cem nanogramas (100 ng) do DNA plasmidial foram misturados com 0,75 µl do reagente fluorescente *Big Dye 3.1* (Applied Biosystems® Carlsbad, CA., Estados Unidos), 3,25 µl do tampão Save Money (200 mM Tris-HCl, pH 9,0, 5 mM MgCl₂), 5 pmol de oligonucleotídeos universais (M13f/M13r) e H₂O Mili-Q q.s.p. 10 µl. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos. As amostras foram precipitadas adicionando 90 µl de 66% isopropanol (v/v), incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas (12.000 x g por 20 minutos). A cada amostra, após o sobrenadante ser descartado cuidadosamente, foram adicionados 150 µl de 75% isopropanol (v/v) e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o DNA precipitado foi secado por 5 minutos a 56 °C, protegido da luz. O DNA foi armazenado a -20 °C para posterior uso. As amostras foram enviadas ao Instituto de Química (USP) onde foram submetidas ao sequenciador automático ABI 377 presente na central de recursos analíticos.

3.1.7 Análise de Bioinformática

As sequências de DNA obtidas foram submetidas ao programa MEME Suite (BAILEY et al., 2009). Dados como, quantidade de sequências que um determinado motivo pode ser encontrado, quantidade de motivos que podem ser encontrados em uma única sequência e o tamanho dos motivos encontrados foram determinados. A

partir disso o programa gerou uma análise dos motivos conservados entre as sequências. Classes foram definidas de acordo com os motivos encontrados. Um exemplar de cada classe foi escolhido e sua estrutura secundária foi definida pelo programa online mFold Web Server (ZUKER, 2003). Apenas as estruturas com menor energia livre de Gibbs (ΔG) foram exibidas.

3.1.8 Ensaio de PCR em tempo real

A quantificação dos fragmentos de DNA ligados às moléculas alvo foi realizada mediante ensaios de PCR em tempo real (MENCIN et al., 2014). Para uma reação com volume final de 25 μL foram acrescentados: 12,5 μL de SybrGreenPCR Mastermix (Applied Biosystems®), 1 μL de *primer sense* 10 μM não modificado, 1 μL de *primer anti-sense* 10 μM não modificado e 1 μL de *template*. O DNA molde utilizado para análise correspondia àquelas moléculas que se ligaram ao alvo. Consequentemente, como normalizador utilizamos as moléculas de DNA não ligadas recuperadas no mesmo ciclo de seleção. O ensaio foi realizado em triplicata com o seguinte programa: 95 °C por 10 minutos precedido de 30 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A leitura da reação foi realizada através do equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystems®), localizado no laboratório do Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich (Instituto de Química- USP).

3.1.9 Ensaio de crescimento celular

A concentração inicialmente testada de cada aptâmero selecionado durante o processo SELEX contra eritrócitos infectado foi de 66 μM . Para este ensaio uma placa de 96 poços foi utilizada. Inicialmente, em cada poço foi distribuído meio de cultura RPMI suplementado com plasma humano, 2% de hematócrito e 2% de parasitemia. Em seguida, foram adicionados 66 μM de cada aptâmero (dissolvido em EtOH 50%) previamente submetido ao tratamento de desnaturação e renaturação. Neste ensaio contamos também com três controles: (1) parasitas em meio suplementado com plasma humano, (2) parasitas em meio suplementado com plasma humano + 33% álcool etílico (v/v) (veículo), (3) parasitas tratados com concentrações variáveis de cada aptâmero: 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.125 μM , 1.56 μM , 0.78 μM , 0.39 μM , 0.2 μM e 0.09 μM . Dos 12 aptâmeros inicialmente selecionados, quatro deles foram usados para a determinação da IC_{50} , calculada mediante o ajuste não linear segundo o programa *GraphPad Prism*

(Prism). Após 96 horas de tratamento à 37 °C a viabilidade celular foi determinada mediante dois métodos, i) a contagem manual mediante tingimento com panótico e ii) Análise de citometria de fluxo após a coloração com BrEt utilizando o equipamento Guava EasyCyte Mini (GE, Piscataway, Nova Jérsey, Estados Unidos).

3.1.10 Identificação da proteína alvo

3.1.10.1 Purificação da proteína alvo acoplada ao aptâmero

Os quatro aptâmeros selecionados (iRBCApt_1, iRBCApt_3, iRBCApt_5 e iRBCApt_11) foram inicialmente amplificados em larga escala utilizando *primer forward* sem modificação (5'GCCTGTTGTGAGCCTCCT-3') e *primer reverse* marcado com tripla biotina (5'BBB-GGGAGACAAGAATAAGCG-3') e posteriormente submetidos a uma corrida de eletroforese, onde as moléculas de ssDNA marcadas com biotina foram recuperadas. Um micromolar (1 µM) de cada aptâmero marcado com tripla biotina foi incubado com uma cultura contendo 5% de parasitemia, previamente lavada 3 x com meio RPMI sem suplemento. Após o período de incubação a amostra foi tratada com tripsina 1 mg/ml, por 5 minutos e a temperatura ambiente seguido por uma reação de parada utilizando inibidor de tripsina 1 mg/ml (Sigma-Aldrich®) por 5 minutos a temperatura ambiente (WILLIAMS; WEATHERALL; NEWBOLD, 2002). Novamente a amostra foi submetida a lavagens com meio RPMI sem suplemento, seguido pela incubação com 5 µl de *Streptavidin MicroBeads* dando início a purificação através do sistema de streptavidina, de acordo com as indicações do fabricante (Macs Molecular®, Bergisch Gladbach, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha). Em paralelo, as colunas de purificação (MACS Column) foram equilibradas 1 x 100 µl com o tampão de equilíbrio específico para aplicações de ácidos nucleicos, seguido por duas passagens de 200 µl de tampão de ligação, neste caso *Selection Buffer* 5 x. O produto (aptâmero: proteínas) da incubação foi então adicionado ao topo da matriz e a coluna foi lavada 4 vezes com 100 µl de tampão de lavagem. Para a eluição do complexo utilizamos 100 µl de Uréia 6M (JAVAHERIAN et al., 2009).

Figura 7 – Representação do ensaio de purificação dos alvos.

Proteínas provenientes da superfície de eritrócitos infectados (iRBC) foram incubadas com aptâmeros biotinilados e extraídas com tripsina. (A) O complexo aptâmero_BBB- alvo foi incubado com *beads* magnéticos e a amostra foi aplicada na coluna contendo resina de streptavidina. (B) Proteínas que não se ligaram aos aptâmeros são descartadas nas lavagens e (C) o complexo é eluído.

3.1.11 Identificação do alvo por Espectrometria de Massa

Inicialmente, a concentração de proteínas nas amostras de interesse foi determinada através do equipamento Qubit® 3.0 Fluorometer (ThermoFischer®). Em seguida, foi adicionado 2 µl de tampão Trimetil amônio bicarbonato (200 mM, pH 7.0) e 1 µl de Ditiotretol (DTT 10 mM) prosseguido por uma incubação de 30 minutos, sob ligeira agitação à 30 °C. Finalizada a incubação foram adicionados 4 µl de iodoacetamida (40 mM) a cada amostra e uma incubação adicional (30 min a temperatura ambiente e protegida da luz) foi realizada. Um volume adicional de 1,1 µl de DTT (10 mM) foi acrescentado em cada amostra e, novamente, as mesmas foram submetidas a incubação nas condições conhecidas. Ao fim da incubação, as amostras foram avolumadas com H₂O até 1 mL. A digestão das amostras ocorreu

pela adição de 1: 50 de tripsina (0,2 µg/µL) em tampão de lise (50 mM ácido acético) prosseguindo com uma incubação a 30 °C por 16 horas. A reação de digestão foi parada com ácido fórmico (FA 1%) e as amostras foram submetidas às colunas de purificação previamente ativadas com 100 µL de acetonitrila absoluta (ACN) e equilibrada por 3x com 100 µL de FA (0.1%). A purificação das amostras foi realizada por centrifugação. Inicialmente, as amostras foram centrifugadas por 4 minutos a 3550 r.p.m. Em seguida, 3 lavagens com 100 µL de FA (0,1%) foram realizadas. A eluição das amostras ocorreu em dois passos utilizando concentrações diferentes de ACN 50% e TFA 0,1% e ACN 70% e TFA 0,1%, respectivamente. As amostras foram secadas em *speed vac* e o produto final foi submetido a análise no Laboratório de Espectrometria de Massas da Central Analítica do Instituto de Química - USP.

3.2 Seleção de aptâmeros contra piridoxal quinase de *Plasmodium falciparum*

3.2.1 Obtenção da proteína recombinante piridoxal quinase (PdxK) de *Plasmodium falciparum* em *E. Coli*

3.2.1.1 Expressão da PfPdxK

A proteína piridoxal quinase de *Plasmodium falciparum* (PfPdxK MM: 58kDa) foi utilizada como descrito previamente (KRONENBERGER et al., 2014). A sequência codificante para a PfPdxK foi subclonada nos sítios de restrição para SacII e HindIII do vetor pASK-IBA3 (pASK-IBA3/PfPdxK) que adiciona uma cauda de seis histidinas no extremo amino terminal (PfPdxK-6xHis). Para os ensaios de produção da PfPdxK-6xHis de origem recombinante, bactérias de *E. coli* da cepa BLR(DE3) foram transformadas com a construção pASK-IBA3/PfPdxK e crescidas em meio LB-ampicilina (50 µg/ml). As bactérias foram inicialmente crescidas a 37 °C durante 16 horas e, posteriormente, o pré-inóculo foi diluído (1:100) em meio fresco e incubado sob agitação de 250 rpm até atingir uma densidade ótica (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,6. A indução da expressão da PfPdxK-6xHis foi iniciada pela adição de anhidrotetraciclina (AHT) na concentração de 200 ng/ml e mantida sob constante agitação a 37 °C por 4 horas. Após indução, as células foram centrifugadas (3.000 x g por 30 minutos e a 4 °C) e os precipitados foram ressuspensos em 15 ml de tampão de lise [50 mM Tris pH: 8,0, 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, 5% (v/v) glicerol, 0,1 mM de 2-mercaptoetanol (BME)]. A lise

bacteriana foi iniciada pelo tratamento com 100 µg/ml de lisozima e incubada durante 30 minutos no gelo. Após esse tempo, as bactérias foram submetidas a 15 pulsos de sonicação a 30% de potência (com duração de 30 segundos e intervalos de 1 minuto no gelo). O lisado foi clarificado por centrifugação a 50.000 x g por 1 hora à 4 °C e a fração solúvel foi utilizada para o processo de purificação por cromatografia de afinidade.

3.2.1.2 Purificação da PfPdxK recombinante

Na coluna de purificação foram adicionados 2 ml de resina de nitrilotriacético- Ni^{2+} (Ni-NTA Quiagen®, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha), seguido por 3 volumes de H_2O deionizada. A resina foi carregada com 5 volumes de *charge buffer* (50 mM NiSO_4), seguido de 3 volumes de *binding buffer* (20 mM de imidazole, 50 mM de fosfato de sódio dibásico e 300 mM de NaCl, pH: 8.0). Após o equilíbrio, o sobrenadante obtido na lise bacteriana foi passado três vezes consecutivas pela coluna, seguido por dois passos de lavagens com 6 volumes de *wash buffer* (60 mM de imidazole, 50 mM de fosfato de sódio dibásico e 300 mM de NaCl, pH: 8.0). A eluição da proteína recombinante foi realizada pela adição de 5 volumes de *elution buffer* (150 mM de imidazole, 50 mM de fosfato de sódio dibásico e 300 mM de NaCl, pH: 8.0). As frações foram coletadas em tubos de 1.5 ml e submetidas a eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE 10%. A concentração de proteína foi estimada pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de BSA 0.1 mg/ml (BRADFORD, 1976).

3.2.2 *Seleção de aptâmeros contra a PfPdxK*

A seleção de aptâmeros contra a PfPdxK foi iniciada com a amplificação em larga escala da biblioteca original aleatória (10 fmol/µl) junto ao *primer* sense marcado com tripla biotina e *primer* anti-sense sem marcação. Todo o processo do desenvolvimento de ssDNA para se iniciar as seleções contra esta proteína recombinante foi exatamente igual ao descrito no item 3.1.2. Uma concentração final de 1 µM de *pool* da biblioteca ssDNA previamente tratada foi incubada com 500 nM de proteína recombinante purificada, sob uma agitação constante de 250 rpm, por 40 minutos e a temperatura ambiente. Finalizado o tempo de incubação, 30 µl de resina de Ni-NTA® regenerada foi adicionada e procedendo-se novamente com uma incubação a temperatura ambiente, em baixa agitação e por 40 minutos. Um volume

de *wash buffer* foi adicionado e após uma centrifugação de 4 x g por 15 minutos o sobrenadante, contendo ssDNA não ligado foi separado. Mais um passo de lavagem foi realizado nas mesmas condições. O complexo *PfPdxK*-ligantes foi eluído da resina com 1 volume de *elution buffer*. A amostra foi centrifugada com 4000 x g, por 10 minutos e a 4 °C. O sobrenadante resultante foi purificado por fenol:clorofórmio e precipitado com etanol absoluto gelado.

3.2.3 Interação entre *PfPdxK* e aptâmeros por E.C.

A interação entre aptâmeros e *PfPdxK* durante o processo de seleção pode ser confirmada através de Eletroforese Capilar PA-800 (E.C.) (Beckman coulter®, Brea, CA, Estados Unidos). Para isso, 2.5 µM de aptâmeros, pós- *folding*, foram apresentados à 12.5 mM de proteína recombinante *PfPdxK*. Após o período de incubação, a amostra foi submetida à corrida eletroforética em um capilar de sílica fundida de diâmetro interno de 75 µm e diâmetro externo de 375 µm (eCAP™ Capillary Tubing, Beckman Coulter). O capilar utilizado tinha 60 cm de comprimento com uma distância até ao detector de 49 cm. A voltagem aplicada no capilar foi de 600 V/cm e a temperatura foi mantida à 25 °C. Prévio a cada corrida, o capilar foi regenerado com 0.1M HCl, seguido de 0.1M NaOH e para finalizar água. Cada corrida dessa foi de 2 minutos. Amostras foram injetadas dentro do capilar sob um pulso de 1 psi por 20 segundos. Picos representando aptâmeros não ligados e o complexo aptâmero-alvo foram observados (BEREZOVSKI et al., 2005).

3.2.3.1 Identificação dos aptâmeros selecionados

Treze coletas do complexo aptâmero-alvo e dos aptâmeros não ligados foram realizadas através do programa de coleta padronizado. Os produtos recuperados foram utilizados como *template* de uma reação de PCR com 15 ciclos de amplificação. Posteriormente, o produto de PCR foi submetido a clonagem em vetor TOPO (vide item 3.1.6.1). Cinquenta e dois clones positivos tiveram suas sequências analisadas e 4 motivos conservados foram identificados.

3.2.4 Atividade enzimática da *PfPdxK* e do pool de moléculas de DNA

A atividade enzimática da recombinante de *PfPdxK* foi determinada na presença dos ligantes de DNA. Previamente, 1 µM do último *pool* de DNA foi

apresentado a 250 mM de *PfPdxK* nas condições de seleção já citadas anteriormente. Para as medições de atividade foram adicionados em uma cubeta de quartzo *q.s.p.* 500 µL de um mix contendo 3 mM de ATP (fresco), 10 mM de MgCl₂, e 70 mM de tampão fosfato dibásico (pH 7.0). As leituras foram iniciadas pela adição de 1 mM de piridoxal (PL) (MULLER et al., 2009). Uma medição foi realizada na presença de 250 mM de *PfPdxK* e em outra medição adicionamos o complexo ssDNA_*PfPdxK*. A atividade foi determinada monitorando o incremento de absorbância (388 nm) durante 10 minutos à 37 °C.

3.2.5 Atividade enzimática da *PfPdxK* e dos aptâmeros selecionados

Uma vez confirmadas as alterações na atividade das proteínas recombinantes após a adição de moléculas simples de DNA, testes foram realizados posteriormente com aptâmeros específicos provenientes da seleção e definidos após o sequenciamento (PdxKApt_32, PdxKApt_39, PdxKApt_45 e PdxKApt_52). A atividade enzimática procedeu da mesma forma, contudo para que triplicatas pudessem ser feitas simultaneamente a atividade foi realizada em placas de 96 poços, onde o volume final da reação passou a ser 200 µl, o controle da reação continuou sendo a atividade da enzima recombinante pura e o branco da reação agora era todos os componentes exceto o substrato PL. Diferentes concentrações (10 µM, 8 µM, 6.4 µM, 5.12 µM, 4 µM, 3.3 µM, 2.5 µM, 1.25 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.2 µM e 0.05 µM) dos aptâmeros selecionados foram testadas para que o EC50 fosse determinado.

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento de aptâmeros de DNA

A biblioteca combinatória original, constituída de distintas moléculas de DNA (10^{16}), pode ser diretamente utilizada para o primeiro ciclo de SELEX, dependendo do rendimento e pureza do amplicon. Isto pode ser verificado através de uma corrida eletroforetica sob condições desnaturantes. Inicialmente, a amplificação mediante PCR da biblioteca combinatória original purificada [5'GCCTGTTGTGAGCCTCCT-N34-CGCTTATTCTTGTCTCCC-3' (27 pmol/ μ l)] foi padronizada. Tanto, o número de ciclos, como a quantidade de DNA molde '*template*', foram analisados a fim de garantir uma amplificação eficiente e específica. Para isso, variou-se a concentração de DNA *template* (1 fmol/ μ l, 10 fmol/ μ l, 100 fmol/ μ l, 500 fmol/ μ l e 1 pmol/ μ l) em oito ciclos diferentes de amplificação (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24) (Figura 8).

Figura 8 - Padronização do número de ciclos e massa de *template*.

A figura mostra, produtos de amplificação mediante reação por PCR resolvidos em eletroforese de DNA usando 8% (p/v) acrilamida não desnaturante. O número de ciclos de amplificação foi variado, como se mostra em cada painel 3, 6 (A), 9, 12 (B), 15, 18 (C), 21 e 24 ciclos (D). Para cada ciclo testado, usou-se distintas concentrações de *template*: (1) 1 fmol/ μ l; (2) 10 fmol/ μ l; (3) 100 fmol/ μ l; (4) 500 fmol/ μ l; (5) 1 pmol/ μ l. PM: marcador de massa molecular de DNA de baixo peso (Fermentas®). A biblioteca possui um tamanho de 75 pb e a banda de 20 pb representa o excesso de iniciadores adicionados na reação de PCR. As setas brancas indicam as melhores condições de amplificação obtidas.

Verificamos que utilizando uma massa inicial de DNA entre 1-10 fmol/ μ l a faixa de 12 ciclos foi ótima para obtermos um único produto de amplificação livre de bandas inespecíficas (Figura 8B- setas brancas).

Os testes de amplificação iniciais, acima descritos, foram realizados utilizando iniciadores não modificados. Contudo, é preciso amplificar moléculas de DNA dupla fita (dsDNA: do inglês *double-strand DNA*) cuja separação por tamanho seja distinguível na eletroforese de DNA. Para isto, a reação de amplificação foi feita usando um iniciador 5' (*fw* ou sentido) marcado com triple biotina, o que pode ser verificado pelo seu perfil de migração na eletroforese em gel nativo 8% (Figura 9).

Figura 9 – Avaliação do tamanho do DNA molde utilizando *primer* modificado.

A figura mostra, produtos de amplificação que foram resolvidos em gel 8% (p/v) acrilamida não desnaturante e corados com BrEt. (PM) Padrão de massa molecular *GeneRuler™ 1Kb Plus* (Fermentas®); (C-) mistura de reação contendo H₂O como controle negativo; (1) amplificação com iniciadores não modificados; (2) amplificação utilizando o iniciador 5' biotilado e o iniciador 3' não modificado; (3) amplificação utilizando o iniciador 5' biotilado e o iniciador 3' modificado pela adição de FITC.

As diferenças observadas no perfil de migração dos produtos de PCR utilizando iniciadores modificados permitiram distinguir as fitas de DNA, sendo que a fita de maior tamanho foi obtida com iniciador biotilado e, a fita contendo FITC apresentou menor tamanho (Figura 9). Seguido disto, procedeu-se com a seleção. Todo ciclo era iniciado amplificando em larga escala usando 10 fmol/ μ l do *template* junto à iniciador 5' marcado com tripla biotina (PF_BBB) e iniciador 3' sem marcação ou marcado com FITC (PR_FITC). O produto final da amplificação em larga escala (2 ml) foi submetido a eletroforese sob condições desnaturantes em gel de acrilamida de maior tamanho (21 cm) e os amplicons de DNA (ssDNA) foram analisados (Figura 10). Quando usados os iniciadores PR_FITC e o PF_BBB, as fitas de DNA eram confirmadas, primeiramente, através da técnica de “*shadowing*”,

que consiste da emissão de fluorescência na faixa da luz UV sobre uma placa de cromatografia fluorescente (HERRERA; SHAW, 1989) (Figura 10A). Em seguida, ainda a fim de confirmar a separação, incubamos o gel por 5 minutos em meio de corrida 1x com BrEt observando a banda superior (Figura 10B). Com o intuito de impedir o contato por longo tempo do derivado de fluoresceína na presença de BrEt, as bandas fluorescentes (ssDNA_FITC) foram retiradas cuidadosamente, e o gel foi incubado por 5' adicionais, o que nos dava uma imagem mais clara de que a ssDNA_BBB estava presente (Figura 10C). O pequeno arrastão de DNA observado entre as ssDNA, possivelmente, indica fitas de DNA que não foram totalmente separadas durante o processo.

Figura 10 - Separação da dupla- fita de DNA.

Em A mostramos, um gel desnaturante ao 8% acrilamida visualizado sob luz UV na ausência de BrEt; Em B, um gel desnaturante ao 8% acrilamida corado em solução BrEt (5 min); em (C) Gel desnaturante 8% analisado após a extração das bandas fluorescentes e após mais 5 minutos em solução com BrEt; (D) Processo de purificação e precipitação da ssDNA_FITC.

4.2 Selex contra eritrócitos infectados

4.2.1 Seleções interativas *in vitro*

O produto de ssDNA purificado do gel (Figura 10D) foi quantificado, e 10 μ M deste produto foram utilizados no primeiro ciclo de seleção contra 5×10^6 eritrócitos infectados com formas trofozoita do parasita *Plasmodium falciparum*. As moléculas de DNA recuperadas após este passo de seleção foram amplificadas, as fitas de DNA foram separadas, e, as moléculas de ssDNA obtidas foram utilizadas para o

segundo ciclo, onde 1 μM foi incubado com 10^6 células infectadas. O terceiro ciclo resultou de uma seleção negativa (sel^-). Para isto, 1 μM de moléculas de DNA, resultantes do segundo ciclo, foram apresentadas à 1×10^7 de eritrócitos saudáveis (não infectados com o parasita). Para o quarto ciclo foi realizada uma dupla seleção. Neste caso, 1 μM de ssDNA recuperada no terceiro ciclo foi selecionado, inicialmente, contra 2×10^7 de eritrócitos saudáveis (sel^-), seguido de uma seleção positiva (sel^+) cujo *pool* de DNA foi recuperado no sobrenadante, após a centrifugação diferencial, foi apresentado diretamente a 5×10^5 de eritrócitos infectados. Os próximos dois ciclos foram de sel^+ para os quais 1 μM foi apresentado, respectivamente, a 10^5 e 5×10^4 células infectadas. O 7º ciclo foi de contra seleção presumindo que no *pool* de DNA selecionado até o presente momento teríamos ainda sequências que se ligariam a epítomos comuns entre eritrócitos infectados e não infectados. A partir deste ciclo, acrescentamos etapas de lavagens, prévias à centrifugação diferencial com a técnica BRASIL (*Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands*), a fim de eliminar ligantes de DNA de baixa afinidade. Os seguintes 3 ciclos (8º, 9º e 10º) foram de sel^+ , sel^- e sel^+ , respectivamente. Para estes, 1 μM de ssDNA foi utilizado contra 5×10^3 , 1×10^4 e 5×10^7 células, respectivamente. Para aumentar a estrinência nos ciclos de seleção, que aprimore a especificidade dos ligantes pelo alvo, foram adicionadas quantidades crescentes de competidor inespecífico (100 ng/ml, 200 ng/ml e 300 ng/ml, respectivamente) junto aos passos de lavagens (2 x, 3 x e 4 x) (Tabela 1).

Tabela 1 – Ciclos de seleção para o *Cell*-SELEX realizados contra eritrócitos infectados por *P. falciparum*.

Ciclo	[ssDNA]	sel +	sel -	tRNA	Lavagens
1°	10 μ M	5×10^6	--	--	--
2°	1 μ M	10^6	--	--	--
3°	1 μ M	--	1×10^7	--	--
4°	1 μ M	5×10^5	2×10^7	--	--
5°	1 μ M	10^5	--	--	--
6°	1 μ M	5×10^4	--	--	--
7°	1 μ M	--	4×10^7	--	1x
8°	1 μ M	10^4	--	100 μ g/mL	2x
9°	1 μ M	--	5×10^7	200 μ g/mL	3x
10°	1 μ M	5×10^3	--	300 μ g/mL	4x

Dez ciclos foram realizados, sendo 6 ciclos de sel⁺, 3 ciclos de sel⁻ e 1 ciclo de dupla seleção. A partir do sétimo ciclo, as estringências foram acrescidas na reação.

4.2.2 Verificação da homogeneidade dos produtos obtidos com o SELEX

A diminuição da heterogeneidade entre os *pools* de DNA, decorrente da estratégia usada nos ciclos de seleção iniciais, foi analisada mediante ensaios de PCR em tempo real (RT-PCR). Para isso, repetiu-se, novamente, os ciclos 1, 3, 5 e 8 de SELEX, utilizando, em todos os casos, as mesmas concentrações de aptâmeros e células provenientes de uma cultura celular infectada. Resultantes destes processos simultâneos de *Cell*-SELEX, tanto as moléculas de DNA não ligadas (nl) quanto o complexo ligante- alvo (L + A) foram recuperados. A interação L + A foi avaliada pelo valor de fluorescência obtido na reação de RT-PCR. Observa-se, claramente, que durante os ciclos de amplificação, os *pools* de DNA aumentaram a taxa de ligação, resultando em um enriquecimento de aproximadamente 12 x dos aptâmeros ligados na superfície eritrocítica (Figura 11).

Figura 11- Ensaio de *Real-Time PCR*.

As barras em cinza mostram o número de moléculas de DNA ligadas ao alvo de interesse. Os valores obtidos foram relativizados ao obtido no ciclo 1 de *Cell*-SELEX (C1).

4.2.3 Clonagem e sequenciamento dos aptâmeros de maior afinidade

4.2.3.1 Moléculas de DNA do pool intermediário

A etapa final do processo de seleção consiste em identificar e caracterizar as sequências de DNA das moléculas que compõem o *pool* final selecionado. Em nosso trabalho, antes de finalizarmos a etapa de seleção dos ligantes, o *pool* de DNA obtido após o 7º ciclo de seleção foi clonado em vetor TOPO. Aproximadamente, trinta colônias positivas escolhidas aleatoriamente, foram confirmadas pela digestão do DNA plasmidial com endonucleases de restrição. As sequências positivas no perfil de restrição com *EcoRI* foram sequenciadas em ambas fitas, e os seus produtos estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2 - Determinação de sequências e análise de bioinformática.

Apt	Região Constante	Região Aleatória	Região Constante
7.1	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TACCCGCGCACGCATTGTGCCAAGCGGGATGCCTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.15	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TACCCGCGCACGCATTGTGCCAAGCGGGATGCCTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.2	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCTCCTACTCCGCGCTGGTTCCTATCTTCTGTGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.3	GCCTGTTGTGAGCCTCC	AGTGCAAGTTCCTACACGTGATACTAGTGATTA	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.4	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGCTAGATGAGTGACTGTTGGGTAGANNTGACTTGA	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.5	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGCTAGTATATACGTGTGAGTACGTGCTAGCATCG	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.6	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGCGACGGACAGTTGCAAATCGCTGTGTGAGAGT	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.28	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGCGACGGACAGTTGCAAATCGCTGTGTGAGAGT	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.7	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCCACCCCGACTCAAGGGAACCGGTGCGCTTGC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.8	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCTTCTACAGAATGAAGTTCGCTCGAATTGTT	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.9	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCTACTACATATTCGGGTTACTTGACATTGGGGTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.10	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGGGACCCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGCA	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.11	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.22	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCGCGCCGAACCCATCATTCCAGGCGGTCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.23	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.24	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCCT	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.25	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGCAGCCCAGGCCATCGCTCCAGGGCGGTGCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.26	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGCAGCCCAGGCCATCGCTCCAGGGCGGTGCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.27	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGCAGCCCAGGCCATCGCTCCAGGGCGGTGCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.12	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGTAGCCCAGGCCATCGCTCCAGGGCGGTGCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.13	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TAATACACTAGTATCACGTGTAGGGAACCTGCACT	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.14	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TACATGGTGGGCGATTACGTGTCGTATGGCTCA	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.16	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TTATGTTAGGAGCCGTCGGACGAATGACCCGTA	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.17	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGTGCAAGGCGTTTTACCATGTGCTATAGCCTTGAG	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.18	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TGTGCAAGGCGTTTTACCATGTGCTATAGCCTTGAG	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.20	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TTATTACGCGTATCCAGGTACGGGACAGGCATG	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.21	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCGTATCACGCGAGTCGTGAACCTCGAACGTCGC	CGCTTATTCTTGCTCCC
7.19	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TAGCTAGTTATGCGCAGTGATATTCAGTGTCGGT	CGCTTATTCTTGCTCCC

As sequências foram obtidas através do sequenciamento automático pelo método de Sanger (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977). As regiões constantes das sequências estão representadas nas extremidades, enquanto que a região central representa a composição de bases de cada aptâmero selecionado a partir da biblioteca original randômica. As sequências demarcadas em cores são aquelas que apareceram mais de uma vez entre as colônias de bactérias.

As sequências obtidas foram alinhadas separando as regiões constantes da região aleatória a fim de compararmos a incidência e conservação de motivos comuns entre as sequências, os quais foram detectados pelo programa MEME Suite (Figura 12).

Figura 12 – Motivos conservados identificados entre as sequências de DNA.

O tamanho das letras (bases A, T, C e G) estão relacionadas com a frequência com que esses nucleotídeos aparecem em tais posições. Por exemplo, nas duas sequências em que o motivo 4 está presente, a ordem das bases nestas sequências são exatamente iguais (TGTATTA), já o motivo 1 que aparece em 5 sequências distintas não possui todas as bases iguais como pode ser visto na primeira posição, onde três sequências contêm citosina (C) e duas delas contêm guaninas (G).

Dentre as 28 sequências de DNA foram encontrados 5 motivos conservados; sendo que três deles (motivos 1-3) estavam presentes em 5 sequências distintas. Dois motivos (motivos 4 e 5) estavam presentes em 2 sequências distintas. De acordo com Bailey & Elkan (1994) mais de um motivo pode ser encontrado em uma mesma sequência (tabela 3), vide pelas sequências de número 7.3, 7.5, 7.13 e 7.19.

Tabela 3 – Classificação de aptâmeros segundo os motivos conservados.

Classe	Apt	Região Aleatória
I	7.1 (+)	TACCC <u>CGCGCACGC</u> ATTGTGCCAAGCGG GATGCCTC
	7.7 (+)	TCCAC <u>CCCGACTCAAGGGAACCGGTCGG</u> CTTGCGC
	7.10 (-)	TGCAG <u>CCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCGG</u> TGCCCA
	7.11 (+)	TCGCG <u>CCGAACCCATCGTTCCAGGCGG</u> TCCCCC
	7.12 (+)	TGTAG <u>CCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCGG</u> TGCCCC
Consenso		CCCGAG/CCCCATG/CGC/TTCCAGGGGG
Posição		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
Consenso		C C C G A G/C C C C A T G/C G C/T T C C A G G G G
Frequência		5 4 4 4 4 2/2 4 3 3 4 3 2/2 4 2/2 2 5 4 3 4 3 3 3 4
II	7.3 (-)	TAATACAC <u>TAGTATCACGTGTA</u> GGGAACTTGC
	7.5 (-)	TGCTAGCACG <u>TACTCACACGTATA</u> TACTAGCA
	7.9 (-)	CCCCAATGTC <u>AAGTAACCCGAATA</u> AATGTAGTAGA
	7.13 (+)	TAATACAC <u>TAGTATCACGTGTA</u> GGGAACTTGCACT
	7.14 (-)	TGAGCCA <u>TAGCGACACGTAAA</u> TCGCCCCACCA
Consenso		TAGTAACACGTATA
Posição		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Consenso		T A G T A A C A C G T A T A
Frequência		4 5 4 4 3 3 5 4 5 5 4 3 4 5
III	7.3 (+)	AGT <u>GCAAGTT</u> CCCTACACGTGATACTAGTGTATTA
	7.4 (+)	<u>TGCTAGA</u> TGAGTGTACTGTTGGGTAGANNTGACTTGA
	7.5 (+)	<u>TGCTAGT</u> ATATACGTGTGAGTACGTGCTAGCATCG
	7.13 (-)	AGT <u>GCAAGTT</u> CCCTACACGTGATACTAGTGTATTA
	7.19 (+)	TAG <u>GCTAGTT</u> TATGCGCAGTGATATTCACTGTCCGGT
Consenso		GCC/AAGTT
Posição		1 2 3 4 5 6 7
Consenso		G C C/A A G T T
Frequência		3 5 2/2 3 3 3 4
IV	7.3 (+)	AGTGCAAGTTCCCTACACGTGATACTAG <u>TGTATTA</u>
	7.13 (-)	AGTGCAAGTTCCCTACACGTGATACTAG <u>TGTATTA</u>
Consenso		TGTATTA
Posição		1 2 3 4 5 6 7
Consenso		T G T A T T A
Frequência		2 2 2 2 2 2 2
V	7.2 (+)	TCTCCTACTCCGCGCTGGTTCCT <u>ATCTTCTGTGTG</u>
	7.19 (+)	TAGCTAGTTATGCGCAGTG <u>ATATTCAGTGT</u> CCGGT

Consenso	ATA/CTTCA/TGTGT										
Posição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Consenso	A	T	A/C	T	T	C	A/T	G	T	G	T
Frequência	2	2	1/1	2	2	2	1/1	2	2	2	2

Cinco classes de aptâmeros foram determinadas de acordo com os motivos conservados encontrados (nucleotídeos sublinhados) nas sequências primárias das moléculas de DNA selecionadas. Os símbolos negativos ao lado da identificação dos aptâmeros significam que o motivo foi encontrado na sequência complementar da descrita, ao contrário dos símbolos positivos, cujos motivos foram encontrados na sequência molde.

Cinco classes de aptâmeros foram divididas de acordo com a semelhança nas sequências. As regiões consenso segundo a classe de aptâmeros foram: classe I CCCGA(G/C)CCCAT(G/C)G(C/T)TCCAGGGGG, classe II TAGTAACACGTATA, classe III GG(C/A)AGTT, classe IV TGTATTA e da classe V AT(A/C)TTC(A/T)GTGT.

Uma vez que obtidas as sequência primárias dos produtos amplificados, partimos para a predição da sua estrutura secundária utilizando ferramentas bioinformáticas. A partir disso, poderíamos denominar essas moléculas de DNA de: aptâmeros. Um exemplar de cada motivo foi escolhido aleatoriamente, junto com as sequências que se repetiram mais de uma vez, e suas estruturas secundárias foram preditas pelo programa mFold Web Service (Figura 13). Observa-se que todos os motivos conservados (círculos escuros) constituem possíveis regiões conhecidas como *stem-loop*, exceto pelos motivos 3, 4 e 5 cujas regiões consenso estavam ausentes nessas regiões. A identificação dessas estruturas, nos aptâmeros obtidos, sugere a presença de possíveis sítios de interação com o alvo.

Figura 13 – Predição da estrutura secundária dos aptâmeros de DNA obtidos após o sequenciamento.

De cada motivo encontrado, uma sequência de DNA foi escolhida para que a estrutura secundária fosse desenhada. Adicionalmente, as sequências que apareceram mais de um vez no sequenciamento foram também consideradas na predição. Os círculos escuros representam os locais onde estão os motivos encontrados pelo programa MEME. Estruturas definidas pelo programa mFold.

Após a identificação e caracterização preliminar desses aptâmeros, optamos pela síntese química, modificando-os pela adição do FITC no extremo 3', para as aplicações posteriores (Tabela 4).

Tabela 4 - Aptâmeros marcados com isotiocianato de fluoresceína.

Classe I (Seq. 12)	5'-FITC-(cst) TGTAGCCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCGGTGCCCC (cst)-3'
Classe II (Seq. 13)	5'-FITC-(cst) TAATACACTAGTATCACGTGTAGGGAAGTTGCACT (cst)-3'
Classe III (Seq. 5)	5'-FITC-(cst) TGCTAGTATATACGTGTGAGTACGTGCTAGCATCG (cst)-3'
Classe IV (Seq. 3)	5'-FITC-(cst) AGTGCAAGTTCCTACACGTGATACTAGTGTATTA (cst)-3'
Classe V (Seq. 19)	5'-FITC-(cst) TAGCTAGTTATGCGCAGTGATATTCAGTGTCCGGT (cst)-3'
Seq. rosa	5'-FITC-(cst) TACCCGCGCACGCATTGTGCCAAGCGGGATGCCTC (cst)-3'
Seq. verde	5'-FITC-(cst) TGCGACGGACAGTTGCAAATCGCTGTGTGCGAGAGT (cst)-3'
Seq. azul	5'-FITC-(cst) TCGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCCC (cst)-3'
Seq. roxa	5'-FITC-(cst) TGTGCAAGGCGTTTTACCCATGTGCTATAGCCTTGA (cst)-3'

As sequências citadas foram encomendadas com FITC e com as respectivas regiões constantes (cst) (5' GCCTGTTGTGAGCCTCC...)(...CGCTTATTCTTGTCTCCC-3'), que não estão representadas na tabela.

4.2.3.2 Moléculas de DNA do pool final

A seleção de *Cell*-SELEX contra os eritrócitos infectados foi finalizada no décimo ciclo de seleção. Após o último ciclo de SELEX, 26 colônias adicionais foram sequenciadas (Tabela 5), seus motivos apurados (Tabela 6) e suas estruturas definidas (Figura 13).

Tabela 5 - Determinação das sequências prévias de DNA do último ciclo de seleção e análise bioinformática.

Apt	Região Constante	Região Aleatória	Região Constante
10.1	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GCAGCGATACGGCTCGTGTCACTCCAGCGCTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.2	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GGCAGGGGGGTTGTGTGGGTGCATTGTTGTGCG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.3	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ATCACGATATGTACGTGGACTGTGGCTGCACTTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.4	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGCCCCAC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.6	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCCT	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.5	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGCAGGACCAGTGTGGGACTACCGGCTGTCGCG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.12	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGCAGGACCAGTGTGGGACTACCGGCTGTCGCG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.19	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGCAGGACCAGTGTGGGACTACCGGCTGTCGCG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.7	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GCAGCGCACCCATTGTGCCAAGCTGCGTCCCGC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.8	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ACCCGGCGATCTCCGAGCCAATCCCCCCCCTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.9	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ACCACTGGTACGGCGTCGTAGTTGATTCGGTCGG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.10	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGGGTATGGCCCAACGTTGGACTGTCACGTGCTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.11	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CAGGGGTGGTGAAGTGGTCTACTGTGTTGCGATC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.13	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GCAGCCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCGGTGCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.14	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GCAGCCCGAGCCCATCGCTAACTGGGCGGTGCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.15	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TATCGCTTGGATGTTACGACAGGGTCTCGGTGCG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.16	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGTGTGTCAATCCTAAGTTTGTGGTGCCTGCTGTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.17	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GTAGCCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCAGTGCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.18	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GGGTACGGTAGGGTGCCTCGCTCGCTGCTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.20	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACCCCGACTCAAGGGAACCGGTGCGCTGCGC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.23	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACCCCGACTCAAGGGAACCGGTGCGCTGTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.21	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GTCCCGACTCAAGCGATTAACGGTCGGCTGCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.22	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ACAAGGTGCCCTTGTTACGGTGCAATCAGTCGG	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.24	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ACCCGCGCACGCATTGAAAGCGAAGCGGGTGCTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.25	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCCCAGGCTCAAGCGTATGCGGCCCGCCCCCGT	CGCTTATTCTTGCTCCC
10.26	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GTGCAGGGCACTGTCTATGCCATCTGCTTCTCG	CGCTTATTCTTGCTCCC

As regiões constantes das sequências estão representadas nas extremidades, enquanto que a região central representa a composição de bases de cada aptâmero selecionado a partir da biblioteca original randômica. As sequências coloridas indicam a presença de mais de uma sequência idêntica

Tabela 6 – Classes dos aptâmeros parciais obtidos no último ciclo.

Classe	Apt	Região Aleatória
I	10.5 (+)	<u>C</u> GCAGGACCAGTGTGGGACTACCGGCTGT <u>CGCG</u>
	10.12 (+)	<u>C</u> GCAGGACCAGTGTGGGACTACCGGCTGT <u>CGCG</u>
	10.13 (+)	GCAGCCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCGGTGCCCC
	10.14 (+)	GCAGCCCGAGCCCATCGCTAACTGGGCGGTGCCCC
	10.17 (+)	GTAGCCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCAGTGCCCC
	10.19 (+)	<u>C</u> GCAGGACCAGTGTGGGACTACCGGCTGT <u>CGCG</u>
Consenso GCAGC/GC/ACc/GAGc/TG/CT/CT/AG/T G/CGc/AT/CTAc/ACGGCTGT Posição 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 Consenso G C A G C/G C/A C C/G A G C/T G/C T/C T/A G/T G/C G C/A T/C T A C/A C G G C T G T Frequência 6 5 6 6 3/3 3/3 6 3/3 6 6 3/3 3/3 3/3 3/3 3/3 6 3/3 3/3 3 4 3/3 4 5 6 5 3 6 5		
II	10.4 (+)	CGCGC <u>CGA</u> ACCCATCGTTCCAGGCGGCCCCAC
	10.6 (+)	CGCGC <u>CGA</u> ACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCCCT
	10.20 (+)	TCCTCCACCC <u>CGACTCAAGGGAACCGGT</u> CGGCCTGCGCCGC
	10.23 (+)	TCCTCCACCC <u>CGACTCAAGGGAACCGGT</u> CGGCCTGTGCGCCGC
	10.7 (+)	GCAGCG <u>CACCCATTGTGCCAAGCTGCGT</u> CCCCGC
Consenso CGAACCATC/GGTT/ACCAGGCGG Posição 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 Consenso C G A A C C C A T C/G G T T/A C C A G G C G G Frequência 5 5 4 3 3 5 3 5 3 2/2 5 3 2/2 5 5 3 4 3 5 4 5		
III	10.10 (+)	CGGGTATGGCCC <u>AACGTTGGACTGTCA</u> CGTGCTG
	10.16 (-)	ACGCACCACA <u>AACTTAGGATTGACA</u> CACGAGGAGG
Consenso AACT/GTA/TGGAT/CTGA/TCA Posição 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 Consenso A A C T/G T A/T G G A T/C T G A/T C A Frequência 2 2 2 1/1 2 1/1 2 2 2 1/1 2 2 1/1 2 2		
IV	10.1 (+)	GC <u>AGCGATA</u> CGGCTCGTGTCACTCCAGCGCTG
	10.15 (-)	GTAACATCCA <u>AGCGATA</u> AAGGAGGCTCA
Consenso AGCGATA Posição 1 2 3 4 5 6 7 Consenso A G C G A T A Frequência 2 2 2 2 2 2 2		
V	10.3 (+)	A <u>TCACGATA</u> TGTACGTGGACTGTGGCTGCACTTG
	10.18 (+)	GGG <u>TCACGGTA</u> AGGGTGCGCCTCGCCTCGCTGCTG
Consenso TCACGATA		

Posição	1	2	3	4	5	6	7	8
Consenso	T	C	A	C	G	A	T	A
Frequência	2	2	2	2	2	2	2	2

Cinco classes de aptâmeros foram determinadas de acordo com os motivos conservados encontrados (nucleotídeos sublinhados) nas sequências primárias das moléculas de DNA selecionadas até este momento.

Cinco classes de aptâmeros foram agrupadas de acordo com a semelhança nas sequências. A região consenso da classe I GCAG(C/G)(C/A)C(C/G)AG(C/T)(G/C)(T/C)(T/A)(G/T)(G/C)G(C/A)(T/C)TA(C/A)CGGCTGT, da classe II CGAACCCAT(C/G)GT(T/A)CCAGGCGG, da classe III AAC(T/G)T(A/T)GGA(T/C)TG(A/T)CA, da classe IV AGCGATA e da classe V TCACGATA.

Baseada nas estruturas secundárias definidas, observamos que, exceto pela classe de aptâmeros que possuem o motivo 4 e o motivo 5, todas as regiões consenso definidas formam uma estrutura típica de *stem-loop* (Figura 14).

Figura 14 - Estrutura secundária dos aptâmeros de DNA resultantes da etapa final da seleção.

De cada motivo encontrado, uma sequência de DNA foi escolhida para que a estrutura secundária fosse predita. Ademais, solicitamos o desenho também das sequências que apareceram mais de um vez no sequenciamento. Os círculos escuros representam os locais onde estão os motivos encontrados pelo programa MEME. Estruturas definidas pelo programa mFold Web Service.

4.2.4 Alinhamento das sequências obtidas no ciclo intermediário e no último ciclo

Uma vez que definidas as sequências primárias e as estruturas secundárias das moléculas de DNA, obtidas após o 7º e 10º ciclos de seleções, como mencionado acima, partimos para identificar motivos comuns abundantes em ambos os ciclos. Tais aptâmeros foram denominados como potenciais candidatos, ótimos para posteriores análises. Dois motivos comuns foram encontrados entre as sequências de *pool* diferentes (Figura 15).

Figura 15 - Motivos conservados entre as sequências de DNA do 7º ciclo e do último ciclo.

Dois motivos foram encontrados entre as sequências variáveis de DNA obtidas após o ciclo 7 e o ciclo 10 de seleção.

Particularmente, observamos que os aptâmeros do ciclo 7 e 10 apresentam motivos conservados entre eles (tabela 7). O motivo I possui uma região consenso constituída pelas seguintes bases: CCGAGCCCATCGTTCCAGG(/GC)CGG(G/T)TCCC, a qual pode ser encontrada em 9 moléculas de DNA do ciclo 10 e 7 moléculas de DNA selecionadas no ciclo 7. Já o motivo II possui AAGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTG na sua composição, o que se encontra em duas sequências do ciclo 10 e uma do ciclo 7, respectivamente.

Tabela 7 – Classificação dos aptâmeros em comparação.

Motivo	Apt	Região Aleatória
I	7.1 (+)	TACCC <u>CGCGCACGCATTGTGCCAAGCGG</u> GATGCCTC
	7.10 (-)	TGCAG <u>CCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCG</u> GTGCCCA
	7.11 (+)	TCGCG <u>CCGAACCCATCGTTCCAGGCGG</u> TCCCCC
	7.12 (+)	TGTAG <u>CCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCG</u> GTGCCCC
	10.12 (-)	CG <u>CGACAGCCGGTAGTCCCAACACTGGTCCT</u> GCG
	10.7 (+)	GC <u>AGCGCACCCATTGTGCCAAGCTGCGTCCC</u> GC
	10.5 (-)	CG <u>CGACAGCCGGTAGTCCCAACACTGGTCCT</u> GC
	10.17 (+)	GTAG <u>CCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCAGTGCCCC</u>
	10.19 (-)	CG <u>CGACAGCCGGTAGTCCCAACACTGGTCCT</u> GC
	10.13 (+)	GCAG <u>CCCGAGCCCATCGCTCCAGGGCGGTGCCCC</u>
	10.14 (+)	GCAG <u>CCCGAGCCCATCGCTAACTGGGCGGTGCCCC</u>
	10.6 (+)	CGC <u>GCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCCT</u>
	10.4 (+)	CGC <u>GCCGAACCCATCGTTCCAGGCGCCCCAC</u>
Consenso		<u>CCCGAGCCCATCGTTCCAGGG/CCGGG/TTCCC</u>
Posição		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
Consenso		C C C G A G C C C A T C G T T C C A G G G / C C G G G / T T C C C
Frequência		9 8 10 10 11 8 13 12 10 10 13 8 13 8 8 12 12 12 7 10 5/5 7 8 9 5/5 6 11 12 9
II	7.7 (-)	GCGC <u>AAGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG</u>
	10.20 (-)	GCGC <u>AGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG</u>
	10.23 (-)	AGG <u>AGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG</u>
Consenso		<u>AAGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTG</u>
Posição		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
Consenso		A G G C C G A C C G G T T C C C T T G A G T C G G G T G G
Frequência		3 2 3

Duas classes de aptâmeros foram determinadas de acordo com os motivos conservados encontrados (nucleotídeos sublinhados) nas sequências primárias das moléculas de DNA selecionadas no processo *Cell*-SELEX.

4.2.5 Microscopia de fluorescência

4.2.5.1 Imagens preliminares

A análise microscópica dos nove aptâmeros de DNA obtidos (sequências: 3, 5, 12, 13, 19, azul, verde, rosa e roxa) foi possível mediante a sua amplificação com o iniciador modificado pela adição de FITC. De acordo com o perfil de localização subcelular mostrado pelas sequências testadas, observamos que algumas apresentavam maior especificidade pela superfície eritrocítica (Figura 16A, B, D, I, G, F, H), enquanto que outras tiveram uma localização inespecífica (Figura 16C, E).

Figura 16 – Microscopia de fluorescência.

As culturas do parasita foram incubadas com os aptâmeros modificados com FITC (ssDNA_FITC), seguido pela marcação do DNA (Hoechst) e visualização de células vivas. A interação aptâmero-alvo foi evidenciada mediante a sobreposição dos sinais de fluorescência (Merge). As figuras correspondem a (A) sequência 12, do motivo 1 (mesma da sequência laranja), (B) sequência 13, do motivo 2, (C) sequência 05, do motivo 3, (D) sequência 03, do motivo 4, (E) sequência azul, (F) sequência rosa, (G) sequência verde, (H) sequência roxa e (I) sequência 19, do motivo 05. Neste último campo, evidenciou-se o aptâmero da família 5 ligado a um eritrócito infectado (iRBC), próximo de eritrócitos não infectados (RBC) sem marcação no sinal verde. As imagens foram obtidas sob objetivo de magnificação 100x

4.2.6 Avaliação do efeito dos aptâmeros obtidos na proliferação de *P. falciparum*

Ao fato de termos utilizado a técnica SELEX contra células inteiras, onde o alvo ainda é desconhecido e possivelmente é mais de um, a necessidade de obter um número alto de sequências é maior quando comparamos as seleções realizadas contra um alvo determinado. Portanto, as 26 sequências citadas anteriormente não eram representativas para as futuras análises. Dessa forma, mais 250 clones obtidos através da empresa *GATC Biotech* (Alemanha) foram triados e analisados mediante duas abordagens de forma independente. A primeira análise resultou em

234 aptâmeros distribuídos em 12 grupos de acordo com as suas sequências (Tabela 8). Já a segunda análise resultou em uma triagem de poucas sequências. Contudo, nesta última análise foi possível comparar o número de sequências presentes com relação a biblioteca original e culminar em uma taxa de enriquecimento (Tabela 9).

Tabela 8 – Aptâmeros selecionados contra eritrócitos infectados com o *Plasmodium falciparum*.

Classe	Nº	Sequência
0	2	GCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTAC
	59	GGGCACTGCCCTGGAGCGATGGGCT
	61	GGGCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTC
	99	GGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCT
	100	GGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTC
	107	GCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	114	GGGCACCACCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	156	GGGCACTGCCCTGGAGCGATGAGCTCGGGCTGC
	62	TGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTG
	67	GGCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCG
	70	CTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCT
	101	GGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCG
	102	GCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGG
	103	CACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGG
	104	CGCCCTGGAGCGATGGGCTCG
	105	ACCGCCCTGGAGCGATGGGC
	106	CCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCT
	127	GGGGTACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	142	GGGGCGCCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	146	GAGGGACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	155	GTGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	161	GCGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	169	TGGGCACCTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	173	AGGGGACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	174	GGGCACTGCCCTGGAGCGATGTGCTCGGGCTGC
	183	GGGGCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGT
	184	GAGGCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	194	AGGGCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	224	GGGGGACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	149	GGGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTG
	163	GGGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGG
	188	GGGGCACTGCCCTGGAGCAATGGGCTCGGGCTGC
	204	TGGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	207	GGGGCACCGCCCTGGAGCGATGAGCTCGGGCTGC
	208	GGGGCACCGCCCTGGAGCGATGTGCTCGGGCTGC

	209	GGGGCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTAC
	211	GGGGCA CCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGT
	217	GGGACA CCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	220	GGGGCA CCGCCCTGGAGCAATGGGCTCGGGCTGC
	223	GAGGCAC CCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	225	GGGGCA CCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTAC
	226	GGGCAC CCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	232	GGGGCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
	234	GGGGCA CCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC
I	0	GGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTC
	76	CGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGT
	79	CGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTC
	82	CGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	84	GCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGT
	85	CCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTG
	87	GGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGG
	89	AGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGG
	91	GCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCG
	92	CAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGG
	115	TCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	126	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGTGTGG
	129	GCGCGGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	131	GCGCAGGCCGACCGGTACCCTTGAGTCGGGGTGG
	132	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGGG
	133	AGGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	138	GGGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	140	GCACAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	141	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGAGTGG
	145	GAGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	150	CCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	151	GCGCAGGTCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	157	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGCGG
	158	GCGCAGACCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	171	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGT
	180	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGC
	189	GCGCAGGCCGACCGGTCCCCTTGAGTCGGGGTGG
	210	ACGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	212	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	228	GGGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
	233	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGG
II	12	GGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTG
	22	TCCGCTTGGCACATGCGTGCGCGGG
	54	CCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGAT
	60	CCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGA
	95	GGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGC
	96	GCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCG
	97	CATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGC
	116	GGGGCATTCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGAT

	117	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGGGTGCGCGGGT
	118	AGGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGTGT
	125	GGGGCATTCGCTTGGCACAATGTGTGCGCGGGT
	128	GGGGCATCCCGCTTGGCACAATGTGTGCGCGGAT
	135	GGGGCATGCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGT
	136	GGGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGTGT
	139	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGACGCGGT
	144	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGTC
	159	GGGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGAC
	162	AGGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGAT
	164	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGAGTGCGCGGAT
	168	GAGGCATTCCGATTGGCACAATGCGTGCGCGGGT
	170	GGGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGCGT
	176	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGAGTGCGCGGGT
	181	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGC
	185	GCGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGAT
	186	GGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGCGGGT
	196	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGTGTGCGCGGAT
III	200	GTGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGAT
	206	GGGGCACTCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGT
	213	GGGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGAT
	216	GGGCATTCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGT
	231	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGAT
	26	GCGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGG
	46	CGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGG
	77	CCATCGGAGCGTGGCATCTGGG
	78	TCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGG
	80	ATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTG
	81	CATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGT
	83	CCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGG
	88	GCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGG
	90	GGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTG
	93	CGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGT
	119	GCGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGC
	120	GCGGCCATTGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGG
	122	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGAGTGGGTGGG
	123	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGCGGGTGGG
	130	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTAGGTGGG
	134	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGCGGGTGGT
	143	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGATGGG
	147	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTAGGTGGGTGGG
	152	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGATGGGTGGG
	153	ACGGCCATTGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGA
	154	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGA
	167	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTAGG
	175	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATTTGGGTGGGTGGG
	177	CGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGGTGGGTGGG

	193	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGCG
	199	GCGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGT
	201	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGC
	219	GCGGCCATCGGAGCGTGGCATCTTGGGTGGGTGGG
	227	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGT
	230	ACGGCCACGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGG
IV	8	GGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGG
	13	GGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGG
	14	GGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGG
	18	GGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGG
	19	GGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAG
	121	GCCGGGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGT
	166	ACCGGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGGG
	172	GCCGGGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGGG
	205	GCAGGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGGG
	221	GCCGGGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGGG
V	33	ACGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGG
	34	GCAGGGACGGGCCGCATGCGCTTGAG
	35	CAGGGACGGGCCGCATGCGCTTGAGC
	36	GACGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGG
	37	AGGGACGGGCCGCATGCGCTTGAGCC
	39	GGACGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCG
	40	GGGACGGGCCGCATGCGCTTGAGCCC
	43	CGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGGGG
	45	GCAGGGGCGGGCCGCATACGCTTGAG
	47	CAGGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGC
	48	AGGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCC
	49	GCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGGG
	50	GGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGG
	51	GGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCG
	52	GGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCC
	55	GCAGGGGCGGGCCGCATGCGCTTGAG
	56	CAGGGGCGGGCCGCATGCGCTTGAGC
	57	AGGGGCGGGCCGCATGCGCTTGAGCC
	63	GGCGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGG
	64	GCGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGG
	65	GGGGCGGGCCGCATGCGCTTGAGCCC
	66	GGGCGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCG
	73	CGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGGG
	124	GCAGGGGCGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGGGCG
	148	GCAGGGACGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGGG
	178	GCAGGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGGGGG
	179	GCAGGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGGGGCG
	187	GCAGGGGCGGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGGGG
VI	137	GGCAGCGCGGCTTGGGACATTGTGTCCGCCGTCT
	160	AGCAGCGCGGCTTGGGACATTGTGTCCGCCGTCC
	191	TGCAGCGCGGCTTGGGACATTGTGTCCGCCGTCC
	222	GGCAGCGCGGCTTGGGACATTGTGTCCGCCGTCC

VII	1	GGGGA <u>CCGCCTGGAACGATGTGTTTCG</u>
	7	GGGAC <u>CCGCCTGGAACGATGTGTTTCG</u> G
	10	GGAC <u>CCGCCTGGAACGATGTGTTTCG</u> GC
	15	AGGGAC <u>CCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u>
	16	GA <u>CCGCCTGGAACGATGTGTTTCG</u> GCG
	17	<u>CCGCCTGGAACGATGTGTTTCG</u> GCGCG
	20	<u>ACCGCCTGGAACGATGTGTTTCG</u> GCGC
	23	GGGAC <u>CCGCCTGGAACAATGGGTTCG</u> G
	24	GGAC <u>CCGCCTGGAACAATGGGTTCG</u> GC
	25	<u>ACCGCCTGGAACAATGGGTTCG</u> GCGC
	27	<u>CCGCCTGGAACAATGGGTTCG</u> GCGCG
	28	GA <u>CCGCCTGGAACAATGGGTTCG</u> GCG
	41	<u>CCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u> GCGTG
	42	<u>ACCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u> GCGT
	109	<u>CCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u> GCGCG
	110	GGGAC <u>CCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u> G
	111	<u>ACCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u> GCGC
	113	GA <u>CCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u> GCG
	165	CACGGGC <u>CCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u> GCGTGG
VIII	21	<u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGGGT
	44	<u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGGGG
	58	<u>CCGCTTGGCACAATG</u> GCGTGCGCGGGT
	74	GAGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGT</u>
	75	AGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u>
	94	<u>TCCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGG
	98	AT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGG
	182	GAGGCAC <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGGGT
	190	GTGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGGGT
	192	GAGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGGTT
	195	GAGGCAC <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGGAT
	197	GCGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGGGT
	202	GAGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGAGT
	203	GAGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGTGTG</u> GCGCGGGT
	214	GAGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGTGT
	215	GAGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGGAC
	218	GAGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGGCT
	229	GAGGCAT <u>CCCGCTTGGCACAATGCGTG</u> GCGCGGGT
IX	3	GGGG <u>GGGATTGGCTCCGGAGATCGC</u>
	29	GGG <u>GGGATTGGCTCCGGAGATCGCC</u>
	30	<u>GGGGATTGGCTCCGGAGATCGCC</u> CGGGT
	31	GGGGGATTGGCTCCGGAGATCGCCG
	32	GGGGGATTGGCTCCGGAGATCGCCGG
	38	<u>GGGGATTGGCTCCGGAGATCGCC</u> CGGG
X	4	GGGCA <u>CCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u>
	5	GGCA <u>CCGCCTGGAACGATGGGTTCG</u> G
	6	<u>GCACCGCCTGGAACGATGGGTTC</u> GGC
	9	<u>CACCGCCTGGAACGATGGGTTC</u> GCGG
	11	GGGGAC <u>CCGCCTGGAACAATGGGTTCG</u>

	53	TGG GGACCGCCTGGAACGATGGGTTC
	72	AGG GGACCGCCTGGAACGATGGGTTC
	86	GGG GGACCGCCTGGAACGATGGGTTC
	108	GGG GGACCGCCTGGAACGATGGGTTC G
	112	GGACCGCCTGGAACGATGGGTTC GGC
XI	68	GC ACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGG
	69	CACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGG
	71	ACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGG C

Onze grupos de aptâmeros foram selecionados. Em branco se indicam os aptâmeros selecionados para representar o correspondente motivo.

Baseados no motivos comuns presentes nas sequências obtidas (Tabela 8, motivos demarcados em negrito e sublinhadas), estas foram agrupadas em onze grupos. A segunda análise das sequências identificadas mostrou o enriquecimento das sequências selecionadas ao final do processo, tendo como base a biblioteca original utilizada no primeiro ciclo (Tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação do enriquecimento dos aptâmeros selecionados contra eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum*.

N°	Sequência	Último ciclo	Biblioteca original	Enriquecimento bruto
9	TCGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTC	227912	1370	49380
10	TGCAGCCCGAGCCCATCGCTCCAGGGC	191354	1366	24396
20	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGG	82585	495	4661
5	GGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGGGA	49380	1	3753
24	GACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGG	49347	403	3513
477	TATCCGCGCACGCATTGTGCCAAGCGGGATGCC	32018	210	2311
49	TCCACCCACCCAGATGCCACGCTCCGATGGC	29785	49	988,25
53	TCCCCGGGCTCAAGCGTATGCGGCCCGCCCC	26478	177	927,3333333
47	GGGACCGCCTGGAACGATGGGTTCGGCGTGA	25870	160	884
26	TCCACCCCGACTCAAGGGAACCGGTCGGCC	24801	169	810
10	GCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGCA	24396	1	607,8571429
41	TCGCGCCGAACCCATTGTTCCAGGCGGTCCC	17687	99	593
22	TCGCGCCGAACACATCGTTCCAGGCGGTC	16951	95	581,5
143	GGGGCACCGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCT	15647	64	576
31	TCCCCCTGTGATGGCGCGCTCCGACGCCCC	15367	108	537,5
32	GGGGCACCGCCTGGAACGATGGGTTCGGCG	13971	85	532
28	GTGCCGCTGGAACAATGAGTTCGCGGGGGA	11128	12	526
3822	GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGTA	10462	48	519

Dezoito sequências foram triadas. A quantidade de cada sequência ao final do ciclo (Último ciclo) pôde ser comparada ao início do mesmo (Biblioteca original) resultando em uma taxa de enriquecimento específica para cada sequência (enriquecimento bruto).

Comparando as análises feitas em paralelo constatamos que motivos conversados encontrados na primeira análise (0, 3, 5, 7, 10, 11 e 12 - tabela 8) estavam presentes em sequências apresentadas na segunda análise (seq. 10, 143, 20, 3822, 24, 5, 47 e 32 - tabela 9), sequências estas classificadas com maior enriquecimento bruto ao final da seleção (tabela 10).

Tabela 10 - Comparação das análises realizadas independentemente.

Nº	Sequência	Último ciclo	Biblioteca original	Enriquecimento bruto
Motivo 0 Motivo 11 10 143	GGGGCACC GCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGCGG GCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGG GCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGCA GGGGCACC GCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCT	24396 15647	1 64	607,857 576
Motivo 1 20	GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTTCGGG GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGG	82585	495	4661
Motivo 2 Motivo 8 3822	GGGGCACTCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGTGG GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGCTGG GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGTA	10462	48	519
Motivo 3 24	ACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGG GACGGCCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGG	49347	403	3513
Motivo 5 5	GCAGGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGGGGGG GGGCCGCATGCGCTTGAGCCCGGGGA	49380	1	3753
Motivo 7 Motivo 10 47 32	CACGGGCCCCGCTTGAACGATGGGTTCGGCGTGGGG GGGGACCGCCTTGAACGATGGGTTC GGGACCGCCTTGAACGATGGGTTCGGCGTGA GGGGCACC GCCTTGAACGATGGGTTCGGCG	25870 13971	160 85	884 532

Tabela 11 - Aptâmeros da seleção contra eritrócitos infectados.

Aptâmero 0	5'-(cst)GGGGCACC GCCCTGGAGCGATGGGCTCGGGCTGC(cst)-3'
Aptâmero 1	5'-(cst)GCGCAGGCCGACCGGTTCCCTTGAGTCGGGGTGC(cst)-3'
Aptâmero 2	5'-(cst)GGGGCACTCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGGGT(cst)-3'
Aptâmero 3	5'-(cst)ACGGCATCGGAGCGTGGCATCTGGGTGGGTGGG(cst)-3'
Aptâmero 4	5'-(cst)GCCGGGGGGCGTCGGAGCGCGCCATCACAGGGGG(cst)-3'
Aptâmero 5	5'-(cst)GCAGGGGCGGGCCGCATACGCTTGAGCCCGGGGG(cst)-3'
Aptâmero 6	5'-(cst)GGCAGCGCGGCTTGGGACATTGTGTCCGCCGTCC(cst)-3'
Aptâmero 7	5'-(cst)CACGGGCCCCGCTGGAACGATGGGTTTCGGCGTGG(cst)-3'
Aptâmero 8	5'-(cst)GAGGCATCCCGCTTGGCACAATGCGTGCGCGCT(cst)-3'
Aptâmero 9	5'-(cst)GGGGGGGGATTGCTCCGGAGATCGC(cst)-3'
Aptâmero 10	5'-(cst)GGGGGACCGCCTGGAACGATGGGTTTC(cst)-3'
Aptâmero 11	5'-(cst)GCACTGCCCTGGAGCGATGGGCTCGGG(cst)-3'

As sequências acima citadas foram obtidas mediante síntese comercial a partir das correspondentes regiões constantes (cst) (5' GCCTGTTGTGAGCCTCC...)(...CGCTTATTCTTGTCTCCC-3'), ausentes na tabela.

Um aptâmero de cada grupo foi escolhido (Tabela 8, sequência rosa e Tabela 11) e utilizado em ensaios de proliferação do parasita *in vitro* (Figura 17).

Figura 17 - Proliferação celular na presença de aptâmeros.

Aptâmeros foram incubados com cultura celular de 3D7 em placa de 96 poços. Após 96 horas de tratamento, a viabilidade dos parasitas foi analisada e os valores representados pela porcentagem de parasitemia. A porcentagem de parasitemia obtida na ausência de aptâmero foi considerada como 100% (3D7).

Um ensaio inicial em eritrócitos infectados com *P. falciparum* mostrou que os aptâmeros selecionados (concentração fixa de 66 μM) afetam a proliferação do parasita em aproximadamente o 80%, em relação ao grupo não tratado (3D7) (Figura 16). A partir disto, optamos por continuar trabalhando com quatro aptâmeros, dois que demonstraram o melhor efeito (Apt 1 e Apt 3) e dois que demonstraram o menor efeito (Apt 5 e Apt 11), os quais foram utilizados para o cálculo da dose inibitória do 50% na proliferação (IC_{50}), bem como na identificação do possível alvo molecular atingido. A análise das estruturas secundárias destes aptâmeros revelou motivos conservados presentes nas regiões de *stem-loop*, sugerindo que essa região participe durante a interação com o alvo (Figura 17).

Figura 18 - Estrutura secundária dos aptâmeros de DNA selecionados.

Aptâmero 0, 1, 3, 5 e 11 foram escolhidos para terem suas estruturas secundárias definidas. Os círculos amarelos representam os locais onde estão os motivos encontrados pelo programa MEME. Estruturas definidas pelo programa mFold Web Service.

4.2.7 Ensaio de dose-resposta dos aptâmeros afins

Após observado o efeito dos aptâmeros selecionados na proliferação do *P. falciparum*, partimos para a avaliar o seu efeito dose-resposta. Este cálculo trará informações sobre a eficácia desses aptâmeros, o que pode estar correlacionado com diferenças estruturais de cada molécula (Figura 19).

Observamos que os quatro aptâmeros afetavam a proliferação do parasita de forma dose-dependente. Os valores de IC_{50} calculados mostraram que o aptâmeros

1 e 3, cuja estrutura secundária predita possui regiões consenso, foram o mais efetivos.

Figura 19 - Efeito dose-resposta dos aptâmeros obtidos por *Cell*-SELEX em culturas de eritrócitos infectados com *P. falciparum*.

Ensaio em placa de 96 poços foi realizado com cultura de *P. falciparum* na presença de aptâmeros em concentrações variáveis entre [0.1- 100 μM]. Após 96 horas de tratamento, a viabilidade do parasita foi medida pela fluorescência do BrEt analisada por citometria de fluxo. Os valores no gráfico representam a parasitemia obtida na presença do aptâmero relativos ao grupo controle (não tratado). O experimento foi realizado em triplicata e os pontos representam a média $\pm$ desvio padrão. O cálculo da IC_{50} foi obtido a partir do ajuste a função sigmoide utilizando o programa GraphPad Prism v5.0.

4.2.8 Identificação do alvo proteico envolvido na interação com os aptâmeros

Uma vez selecionados os aptâmeros de DNA mediante a estratégia *Cell*-SELEX aplicando 10 ciclos iterativos de seleção, e após que as suas sequências primárias e estruturas secundárias foram preditas, observamos que estes afetavam a multiplicação do parasita causador da malária humana. Constatamos, também,

mediante ensaios de microscopia que alguns desses aptâmeros interagem com componentes da membrana eritrocítica de células infectadas com *P. falciparum*. Assim, aproveitando as vantagens intrínsecas da técnica SELEX, que permitem amplificar os aptâmeros com modificações específicas para o uso em distintas aplicações (microscopia, fluorimetria ou cromatografia), partimos para a identificação dos epítomos presentes na superfície eritrocítica que interagem com esses aptâmeros, e que se mostraram essenciais para a sobrevivência do parasita. Para isto, os aptâmeros que mostraram efeito anti-plasmódio (Aptâmeros 1, 3, 5 e 11) foram amplificados mediante o uso de iniciadores biotinilados. A forte interação não-covalente entre a biotina e a proteína estreptavidina, permite a sua aplicação no estudo de interações entre ligantes-proteína. Dessa forma, os complexos aptâmeros biotinilados – epítomo(s) eritrocítico foram purificados mediante cromatografia de afinidade em colunas carregadas com estreptavidina imobilizada em pérolas magnéticas. Os eluatos dessa purificação foram submetidos a análise por espectrometria de massa e as proteínas parceiras foram identificadas (Tabela 12).

Tabela 12 - Proteínas de superfície identificadas pelos aptâmeros específicos.

Aptâmero	acesso ORF	Gene ID	Proteína
1	A0A024WGK7	PF3D7_0901500	rifin (RIF)
1	A0A0L7LW28	PF3D7_1200400	PfEMP1
1	A0A0L1I7P3	PF3D7_0608700	T-complex protein 1 subunit zeta (CCT6)
1	A0A0L7KII2	PF3D7_1002000	Plasmodium exported protein (hyp2)
1	D7NSV7	PF3D7_1410400	rho-try-associated protein 1 (RAP1)
1	A0A024VMI3	PF3D7_1313100	conserved Plasmodium protein, unknown function
1	W7K575	PF3D7_0421100	PfEMP1
1	A0A024W3U5	PF3D7_1208500	conserved Plasmodium protein, unknown function
1	W7F178	PF3D7_0632500	PfEMP1
1	A0A024X5G5	PF3D7_1209600	protoporphyrinogen deaminase (PBGD)
1	A0A0L7M5E6	PF3D7_1440900 e PF3D7_1441000	conserved Plasmodium protein, unknown function
Aptâmero	acesso ORF	Gene ID	Proteína
3	A0A024WGK7	PF3D7_0901500	rifin (RIF)
3	A0A0L7LW28	PF3D7_0712400	PfEMP1
3	A0A0L1I7P3	PF3D7_0608700	T-complex protein 1 subunit zeta (CCT6)
3	A0A0L7M5E6	PF3D7_1440900 e PF3D7_1441000	conserved Plasmodium protein, unknown function
3	Q8I0W6	PF3D7_0519300	oxidase assembly protein (heme A: farnesyltransferase), putative
3	A0A024VMH7	PF3D7_1028100	protoporphyrinogen oxidase (PPO)
3	A0A0L0CV02	PF3D7_1475400	cysteine repeat modular protein 4 (CRMP4)
Aptâmero	acesso ORF	Gene ID	Proteína
5	A0A0L7LW28	PF3D7_1200400	PfEMP1
5	A0A024VQT6	PF3D7_1019700	conserved Plasmodium protein, unknown function
5	O77188	PF3D7_0412400	PfEMP1
Aptâmero	acesso ORF	Gene ID	Proteína
11	A0A024WGK7	PF3D7_0901500	rifin (RIF)
11	Q8I0W6	PF3D7_0519300	cytochrome c oxidase assembly protein (heme A: farnesyltransferase), putative
11	W7JSB3	PF3D7_0603800	centrosomal protein CEP76, putative (CEP76)
11	A0A024VMI3	PF3D7_1313100	conserved Plasmodium protein, unknown function
11	A0A024W3U5	PF3D7_1208500	conserved Plasmodium protein, unknown function

Quatro aptâmeros tiveram afinidade com epítomos presentes na superfície de eritrócitos infectados.

Os quatro aptâmeros selecionados ao término da técnica SELEX aplicada contra células vermelhas infectadas pelo parasita *Plasmodium falciparum* se mostraram afins por proteínas, algumas de superfície.

Pelos dados obtidos vemos que proteínas relacionadas a citoaderência dos eritrócitos infectados à vasos endoteliais (RIFIN e *PfEMP1*) e proteínas de transporte ativo (PF3D7_1208500) foram identificadas. A proteína identificada como HYP2 também é uma proteína exportada, porém sua função todavia é desconhecida. A proteína CRMP4 é uma proteína de membrana rica em cisteína e contém uma série de motivos implicados na interação parasita-hospedeiro. Proteína do complexo apical, que promove interação e invasão aos eritrócitos, também foi identificada (RAP1).

Proteínas como HemeA, CCT6, PPO, PBGD são enzimas envolvidas em biossínteses.

Nos quatro aptâmeros é possível observar que algumas proteínas conservadas foram identificadas, porém suas funções todavia são desconhecidas. Também observamos que as proteínas *PfEMP 1* e RIFIN prevaleceram nas seleções, vide que todos os aptâmeros possuem 1 ou 2 delas. As proteínas CCT6 e Heme A também foram reconhecidas por mais de um aptâmero (Aptâmero 1, 3 e 11).

4.3 SELEX contra proteína recombinante

Uma alternativa para selecionar aptâmeros de DNA contra um alvo de interesse é a sua apresentação direta durante o processo de SELEX. Para isto é preciso ter o alvo purificado para ser utilizado nos ciclos iterativos de SELEX. No nosso caso, selecionamos aptâmeros específicos contra a proteína *PfPdxK*. Esta enzima atua no metabolismo da vitamina B6 do parasita, tópico de estudo no nosso laboratório.

4.3.1 Expressão e purificação da *PfPdxK*

O gene codificante de interesse (*PfPdxK*) foi amplificado mediante PCR e subclonado em vetor de expressão pASK-IBA3 que permite a adição de uma etiqueta de seis histidinas tanto no extremo amino e/ou carboxil-terminal. A proteína *PfPdxK*-6xHis foi purificada na sua forma ativa utilizando 150 mM de imidazole com rendimentos aproximados de 2 gr/l de cultura induzida (Figura 20).

Figura 20 - Expressão e purificação da proteína recombinante *PfPdxK* em *E. coli*.

Expressão de *PfPdxK* em *E. coli* BLR(DE3), ao longo de 4 horas a 37 °C, utilizado 200 ng/ml de AHT. Os números nas canaletas representam: (1) Fração da cultura induzida; (2) Fração da cultura pré-induzida; (3) Eluato 1; (4) Eluato 2; (5) Eluato 3; (6) Eluato 4; (7) Eluato 5; (8) Eluato 6. A seta vermelha indicam a proteína de interesse expressa com massa aproximada de 58kDa.

Ainda que as primeiras frações tivessem uma concentração maior da *PfPdxK*-6xHis optamos por utilizar, no nosso primeiro ciclo de SELEX, a amostra proveniente da eluição 4 (Figura 20, canaleta 6), pela ausência de proteínas co-eluídas com a proteína de interesse. Este último é crítico para a especificidade dos aptâmeros obtidos.

4.3.2 Eletroforese Capilar (EC)

Após o oitavo ciclo de seleção o complexo *PfPdxK*-ssDNA_FITC foi confirmado através da E.C. (PA-800, Beckman coulter). Inicialmente, variamos as quantidades de ssDNA, assim como, as concentrações da proteína recombinante de *PfPdxK* (5 e 2.5 μ M). No que diz respeito à proteína (Figura 21), a concentração inicialmente testada foi de 5 μ M. Dois picos próximos (A e B) apareceram entre 7 e 8 minutos de corrida a uma absorbância de 0,032 au e 0,022 au, respectivamente (Figura 21 - cromatograma vermelho). Com o intuito de verificar qual dos picos correspondia a proteína de interesse, uma nova corrida foi feita utilizando 2,5 μ M da proteína *PfPdxK*. Observa-se uma diminuição correlativa na intensidade do pico A, dependendo da concentração de enzima usada *PfPdxK* (Figura 21 - cromatograma verde, pico A). Para descartar um falso positivo na corrida, realizamos uma última corrida usando apenas o tampão de dialise da proteína. Esta corrida controle corroborou que o pico B não continha a proteína de interesse (Figura 21 - pico rosa).

Figura 21 - Piridoxal quinase de *Plasmodium falciparum* analisada por eletroforese capilar.

A proteína recombinante foi dialisada contra tampão (100 mM Tris- HCl e 150 mM NaCl, pH: 8,0), e cuja corrida representa o branco da reação (cromatograma rosa). O primeiro pico observado no gráfico vermelho representa a *PfPdxK* em uma concentração de 5 µM (vermelho). Ainda para confirmar que este pico era a proteína de interesse outra medição foi realizada utilizando 2,5 µM de *PfPdxK* (gráfico verde). Uma ampliação dos picos citados se encontra na caixa de aumento. Vinte minutos foram suficientes para a corrida da proteína *PfPdxK*.

Uma vez estabelecida a concentração ideal de *PfPdxK* para ser utilizada no ensaio de EC com os aptâmeros, padronizamos a concentração de DNA marcado com FITC para avaliar seu perfil de corrida na EC (Figura 22 – cromatograma preto). Utilizando uma concentração de 25 nM de ssDNA_FITC a curva resultante não apresentou uma boa definição na corrida, possivelmente, devido a uma saturação do sistema (Figura 22_quadro 1) e, portanto, não foi possível visualizar claramente a curva representante do complexo ssDNA-*PfPdxK* (Figura 22_quadro1_curva azulA). Quando reduzida à metade da concentração de ssDNA_FITC, observa-se melhor um pico a 30 minutos que corresponde ao complexo *PfPdxK*-ssDNA (Figura 22_quadro 2_curva azul_A).

Figura 22 - Padronização da corrida de eletroforese capilar para moléculas de ssDNA e complexo ssDNA-*PfPdxK*.

A integridade do *pool* de DNA foi analisada por emissão de fluorescência através da eletroforese capilar (curva preta 1 e 2). Os cromatogramas azuis visualizadas nos quadros 1 e 2 indicam a corrida do complexo proteína-ssDNA, pelo pico obtido em 30 minutos. Os picos B representam as moléculas de ssDNA que não se ligaram à proteína de interesse.

Utilizando tanto a concentração de 25 nM quanto de 12,5 nM é possível observar que o DNA proveniente do último *pool* de seleção está íntegro, vide pelo cromatograma revelado bem definido. Contudo, quando analisado o pico correspondente ao complexo ssDNA-*PfPdxK* não apresentava essa mesma qualidade. Por este motivo, optamos por utilizar a menor concentração de ssDNA (12,5 nM) na presença de 2,5 μ M de *PfPdxK*-6xHis (Figura 23).

Figura 23 - Análise do complexo *PfPdxK*-ssDNA mediante eletroforese capilar.

Concentrações de ssDNA e proteína foram determinadas para a corrida eletroforetica onde se observam diferentes tempos de eluição para a proteína *PfPdxK*, para a molécula de ssDNA, para o ssDNA não ligado e para o complexo *PfPdxK*-ssDNA.

4.3.3 Identificação dos aptâmeros selecionados

A aplicação da abordagem de eletroforese capilar permite a separação e coleta das interações de interesse. Assim, coletamos amostras correspondentes ao complexo *PfPdxK*-ssDNA (1) e o ssDNA não ligadas (2). Treze ciclos de coletas foram realizadas e as amostras provenientes foram utilizadas como DNA molde em uma nova reação de PCR (Figura 24).

Figura 24 - Programa de coleta por Eletroforese Capilar

A amostra contendo o complexo *PfPdxK*-ssDNA foi submetida a eletroforese capilar, e dois pontos da corrida foram estabelecidos para a coleta (1 e 2). O quadro A representa a corrida da amostra de interesse e A' a corrente durante a mesma corrida, sem passos de coleta. O quadro B representa a corrida da amostra com a primeira coleta programada e B' a corrente dessa corrida com passos de coleta. Por último, o quadro C demonstra o estado da mesma corrida após o 13º ciclo de coleta e C' mostra como a corrente se comporta durante a corrida com passos de coleta.

O perfil de corrida do complexo *PfPdxK*-ssDNA demonstrado no quadro A da figura 23 se assemelha ao perfil que visualizamos na figura 22_2, onde temos os picos A, do complexo, e o pico B, das moléculas não ligadas, representados. O processo envolve passagens de correntes cujo perfil também está demonstrado no quadro A' da mesma figura. Quando acionamos o programa de recuperação

estabelecemos a janela de coleta e passamos a observar picos negativos durante a corrida e principalmente durante a passagem de corrente. O quadro B' nos mostra melhor isso; duas coletas foram realizadas, uma após 00:08:00 e outra aos 00:50:00. Em ambos é possível ver uma queda na corrente, indicando que neste momento nenhuma amostra está passando pelo capilar de corrida.

Como dito anteriormente, 13 coletas foram programadas, mas na figura 23 estão representadas apenas a primeira coleta (B) e a última coleta (C) unicamente para evidenciar o perfil da corrida ao longo da recuperação de parcelas da amostra, vide pelo perfil de corrida demonstrado no quadro A e B que não é reprodutivo no quadro C.

A amostra recuperada neste processo foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos não modificados (Figura 25) e o produto de amplificação foi clonado em vetor TOPO. Cinquenta e duas colônias positivas foram sequenciadas e os seus produtos foram analisados, como descrito no item 4.4.1 e demonstrado na tabela 12.

Figura 25 - Produto de amplificação após a coleta mediante eletroforese capilar.

A amostra coletada durante a corrida na E.C foi amplificada por PCR convencional e resolvida em eletroforese de 8% de acrilamida não desnaturante. A primeira canaleta representa a amplificação das moléculas de DNA não ligadas, enquanto que a segunda canaleta indica a amplificação do produto de interesse recuperado. PM corresponde ao *GeneRuler™ Low Range DNA Ladder* (Fermentas®).

4.3.4 Análise das sequências de DNA selecionadas contra PfPdxK

O sequenciamento das 52 moléculas de DNA revelaram 4 sequências com alta frequência (mais de 5 x) nos distintos clones obtidos (sequências demarcadas nas cores verde, rosa, azul e cinza na tabela 13). Outras 3 sequências puderam ser vista mais de uma vez (grupo cor salmão, roxo e laranja – tabela 13).

Tabela 13 - Análise bioinformática das sequências de DNA obtidas após o SELEX-PfPdxK.

Apt	Região constante	Região aleatória	Região constante
PdxK_1	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACGCCGAACGCAATGTTCCAGGCGGGTCCGCT	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_2	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCACACATAGGGTTACACGGAACGACTCGCCCTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_3	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCACTCGATCCCCGTCTCACACTTCGTGGTTATG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_4	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCCCCGCGAACTCATTGTTCCAGCGGCCCGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_25	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCCCCGCGAACTCATTGTTCCAGAGGCACTGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_33	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACCGCGAACTCATTGTTCCAGCGGCACTGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_40	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCCCCGCGAACTCATTGTTCCAGCGGCCCGTCG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_42	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCCCCGCGAACTCATTGTTCCAGCGGCACTGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_43	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCCCCGCGAACTCATCGTTCCAGCGGCACTGTA	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_52	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCCCCGCGAACTCATTGTTCCAGCGGCACTGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_5	GCCTGTTGTGAGCCTCC	AGACGGCGGACACATCGTCCCAAGCCGCGCTGCT	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_13	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GGACGGCGGACCCATTATCCCAAGCCGCGCTGCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_28	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GGACGGCGGACGCAATGTCCCAAGCCGCGCTGCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_31	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGACGGCGGACACTTTATCCCAAGCCGCGCTGCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_37	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GTACGGCGGTACATTATCCCAAGCCGCGCTGTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_51	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGACGGCGGACACAATGTCCCAAGCCGCGCTGCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_13	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GGACGGCGGACCCATTATCCCAAGCCGCGCTGCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_6	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TACGCCGAACACATCGTTCAGGCGGTCCCTCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_7	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGCGCCGAACACATCGTTCAGGCGGTCTCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_8	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACGCCGAACGCATTGTTCCAGGCGAGCCCGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_11	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACGCCGAACGCATTGTTCCAGGCGGTCCCCTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_12	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACGCCGAACGCATTGTTCCAGGCGGTCCCCTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_17	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACGCCGAACGCATTGTTCCAGGGGGGSCCGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_18	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCACGCCGAACGCATTGTTCCAGGCGGGCCCGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_26	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCAGGCCGAACGCATTGTTCCAGGCCCTCCGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_34	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCTGGCCGAACGCATTGTTCCAGGCCCCCGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_49	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCACGCCGAACGCATTGTTCCAGGCGGGCCTGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_50	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCAGGCCGAACGCATTGTTCCAGGCCCCCGTG	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_9	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ACACGCGCACACATTGTGCCAAGCGGGATGCCTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_16	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ATCCGCGCACGCATTGTGCCAAGCGGGGTGCCTC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_20	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ACCCGCGCACGCATTGTGCCAAGCGGAATGCCCC	CGCTTATTCTTGCTCCC
PdxK_21	GCCTGTTGTGAGCCTCC	AGCCGCGCACTCATTGTGCCAAGCGGGATGCCTC	CGCTTATTCTTGCTCCC

PdxK_23	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ATCCGCGCACTCATTGTGCCAAGCGGGATGCCAC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_35	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ACACGCGCACACATTGTGCCAAGCGGGATGCCTC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_36	GCCTGTTGTGAGCCTCC	ATACGCGCACGCATTGTGCCAAGCGGGATGCCAC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_10	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GCAGCCCGAGCCCATTGCTCCAGGGCGGTGCCCC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_14	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CACCACACAAGGATGCATTGCTTGCCTGGCGTG	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_15	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GCACCCACGCGACGCTCCGATCGCCCCCGTG	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_19	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGCGGCGACTTACGCCCAGTCCCCCGGTGCTCA	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_22	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TACGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_46	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CACGCCGAACCCATCGTTCCAGGCGGTCCCC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_47	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CGCGCCGAACCCATCGTTCCAGGAGGTCCCC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_24	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CACGCCGAACCTCATCGTTCCAAGGGGGCCCCTG	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_27	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CAACCCACCCAGATGCCACGCTCCGATGGCCGT	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_45	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CAACCCACCCAGATGCCACGCTCCGATGGCCGT	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_29	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GCACGGTCGCAGCATTGCGCTTAGCATCGACTGA	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_30	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CACGCCGAACCCATCATTCCAGGCGGTTCCT	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_32	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GCAGCGCACCCATTGTGCCAAGCTGCGTCCCGC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_38	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCATCACGTACGCACGCTACGATGCGCCCCTGT	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_44	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCATCACGTACGCACGCTCCGATGCGCCCCTGT	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_39	GCCTGTTGTGAGCCTCC	TCCAGCCTTGACCTGATTCTCAGGTCTCGTGC	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_41	GCCTGTTGTGAGCCTCC	CCCCGGGACTCAAGCGATTAGCGGTCCCCCGTG	CGCTTATTCTTGTCTCCC
PdxK_48	GCCTGTTGTGAGCCTCC	GGCAGCGTATCCAGGTTGATGTGCGTGTTCGTG	CGCTTATTCTTGTCTCCC

As sequências foram obtidas através do sequenciamento automático pelo método de Sanger et.al., 1977. As regiões constantes das sequências estão representadas nas extremidades, enquanto que a região central representa a composição de bases de cada aptâmero selecionado a partir da biblioteca original randômica.

Seguido da identificação das sequências que compunham o *pool* de DNA selecionado contra a proteína recombinante, as sequências foram classificadas em 2 grandes grupos de acordo com a região consenso presente nelas (Tabela 14).

Tabela 14 - Classes de aptâmeros selecionados contra *PfPdxK*.

Classe	Apt	Região aleatória
I	PdxK_50 (+)	CCTCCAGGCCGAACG <u>CATTGTTCCAG</u> GCCCCCCCGTG
	PdxK_49 (+)	CCTTCACGCCGAACG <u>CATTGTTCCAG</u> GCGGGCCTGTG
	PdxK_40 (+)	TCCCCCGCGAACT <u>CATTGTTCCAG</u> GCGGCCGTC
	PdxK_18 (+)	TCCACGCCGAACG <u>CATTGTTCCAG</u> GCGGGCCCGTG
	PdxK_17 (+)	TCCACGCCGAACG <u>CATTGTTCCAG</u> GGGGGCCCGTG
	PdxK_12 (+)	CCACGCCGAACG <u>CATTGTTCCAG</u> GCGGTCCCTG
	PdxK_11 (+)	CCACGCCGAACG <u>CATTGTTCCAG</u> GCGGTCCCTG
	PdxK_8 (+)	CCACGCCGAACG <u>CATTGTTCCAG</u> GCGAGCCCGTG
	PdxK_36 (+)	TATACGCGCACG <u>CATTGTGCCA</u> AGCGGGATGCCAC
	PdxK_35 (+)	TACACGCGCACAC <u>CATTGTGCCA</u> AGCGGGATGCCTC
	PdxK_23 (+)	TATCCGCGCACT <u>CATTGTGCCA</u> AGCGGGATGCCAC
	PdxK_21 (+)	TAGCCGCGCACT <u>CATTGTGCCA</u> AGCGGGATGCCTC
	PdxK_20 (+)	TACCCGCGCACG <u>CATTGTGCCA</u> AGCGGAATGCCCC
	PdxK_16 (+)	TATCCGCGCACG <u>CATTGTGCCA</u> AGCGGGGTGCCTC
	PdxK_9 (+)	ACACGCGCACAC <u>CATTGTGCCA</u> AGCGGGATGCCTC
	PdxK_22 (+)	TACGCCGAACC <u>CATCGTTCCAG</u> GCGGCGTCCCC
	PdxK_24 (+)	TCACGCCGAACCT <u>CATCGTTCCA</u> AGGGGGCCCTG
	PdxK_6 (+)	TACGCCGAACA <u>CATCGTTCCAG</u> GCGGTCCCTCC
	PdxK_1 (+)	CCACGCCGAACG <u>CAATGTTCCAG</u> GCGGGTCCGCT
	PdxK_37 (+)	GTACGGCGGTCA <u>CATTATCCCA</u> AGCCGCGCTGTC
	PdxK_13 (+)	GGACGGCGGACC <u>CATTATCCCA</u> AGCCGCGCTGCC
	PdxK_51 (+)	CCTCGACGGCGGACA <u>CAATGTCCCA</u> AGCCGCGCTGCC
	PdxK_28 (+)	TGGACGGCGGACG <u>CAATGTCCCA</u> AGCCGCGCTGCC
	PdxK_5 (+)	AGACGGCGGACA <u>CATCGTCCCA</u> AGCCGCGCTGCT
	PdxK_10 (+)	GCAGCCCGAGCC <u>CATTGCTCCAG</u> GGCGGTGCCCC
	PdxK_31 (+)	TCGACGGCGGACA <u>CTTTATCCCA</u> AGCCGCGCTGCC
Consenso		<u>CATTGTT/G/CCCAA/G</u>
Posição		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Consenso		C A T T G T T/G/C C C A A/G
Frequência		26 25 23 20 23 25 13/7/6 26 26 26 14/13
II	PdxK_52 (+)	CCCCCGCGAACT <u>TCATTGTTCCAG</u> GCGGCACTGTG
	PdxK_42 (+)	TCCCCCGCGAACT <u>TCATTGTTCCAG</u> GCGGCACTGTG
	PdxK_33 (+)	TCCACCGCGAACT <u>TCATTGTTCCAG</u> GCGGCACTGTG
	PdxK_25 (+)	TCCCCCGCGAACT <u>TCATTGTTCCAG</u> GAGGCACTGTG
	PdxK_34 (+)	TCCTGGCCGAAC <u>GCATTGTTCCAG</u> GCCCCCCCGTG
	PdxK_26 (+)	TCCAGGCCGAAC <u>GCATTGTTCCAG</u> GCCCCTCCGTG
	PdxK_43 (+)	TCCCCCGCGAACT <u>TCATCGTTCCAG</u> GCGGCACTGTA
Consenso		<u>TCATTGTTCCA</u>
Posição		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Consenso		T C A T T G T T C C A
Frequência		5 6 6 6 5 6 6 6 6 6 6

Duas classes de aptâmeros foram determinadas de acordo com os motivos conservados encontrados (nucleotídeos sublinhados) nas sequências primárias das moléculas de DNA selecionadas contra a proteína recombinante *PfPdxK*.

Observamos que a região consenso do grupo I é CATTGT(T/G/C)CCA(A/G) e do grupo II é TCATTGTTCCA. Cabe ressaltar que as classes são constituídas pelas sequências repetidas; aquelas separadas por cores.

A partir disso, escolhemos 4 sequências: 1 sequência da classe I (PdxK_35 - TACACGCGCACACATTGTGCCAAGCGGGATGCCTC), 1 sequência da classe II (PdxK_52 - CCCCCGCGAACTCATTGTTCCAGCGGCACTGTG), 1 sequência do grupo roxo (PdxK_45 - CAACCCACCCAGATGCCACGCTCCGATGGCCGT) e por fim, 1 sequência que apareceu uma única vez (PdxK_39 - TCCAGCCTTGCACCTGATTCCTCAGGTCTCGTG).

As estruturas secundárias previstas para as 4 sequências escolhidas mostraram a presença de grampos, como detalha-se na figura 26. Uma região consenso presente nos aptâmeros 35 e 52 foi identificada, bem como, uma região aleatória presente nos aptâmeros 39 e 45 (Figura 26, amarelo).

Figura 26 - Estrutura secundária dos aptâmeros de DNA selecionados contra *PfPdxK*.

Aptâmero 52, 45, 35 e 39 foram escolhidos para terem suas estruturas secundárias previstas. Os círculos escuros representam os locais onde estão os motivos encontrados pelo programa MEME no caso das sequências 35 e 52, enquanto que nas sequências 45 e 39 indicam toda a região aleatória. Estruturas definidas pelo programa mFold Web Servece.

4.3.5 Atividades enzimáticas

Oito ciclos foram realizados contra a proteína recombinante *PfPdxK*. Ensaio enzimáticos preliminares utilizando o último *pool* de DNA (8º ciclo) revelaram efeito inibitório na atividade enzimática da *PfPdxK* (Figura 27).

Figura 27 - Ensaio enzimático da PdxK de *Plasmodium falciparum* na presença de aptâmeros.

A atividade da proteína recombinante (*PfPdxK*) foi utilizada como controle para avaliar o efeito do pool do primeiro (*PfPdxK*+C0) e do último ciclo (*PfPdxK*+C8) de seleção na atividade enzimática.

A atividade acima citada nos mostra a influência de um conjunto de moléculas de DNA sobre a atividade enzimática da proteína PdxK de *Plasmodium falciparum*. A próxima pergunta era como se comportaria a atividade na presença de moléculas específicas de DNA, ou seja, daqueles aptâmeros triados (PdxK_35, PdxK_52, PdxK_45 e PdxK_39), após análise das sequências. A triagem na atividade enzimática foi feita na presença de diferentes concentrações de aptâmeros (0,05-2,5 µM). O teste enzimático revelou um efeito dose-resposta na inibição da atividade *PfPdxk* (Figura 28). Ainda que todos tenham mostrado um perfil semelhantes entre eles, consideramos que o efeito dos Apt 45 e Apt 52 apresentaram um perfil mais consistente.

Figura 28 - Ensaio enzimático da PdxK de *Plasmodium falciparum* na presença de aptâmeros específicos.

A partir do último *pool* de DNA, 4 aptâmeros específicos pelo alvo foram escolhidos (Apt35, Apt39, Apt45 e Apt52) e testados em diferentes concentrações (2.5 μM, 1.25 μM, 1 μM, 0.5 μM, 0.2 μM e 0.05 μM).

Nossos resultados mostraram que as duas estratégias de SELEX utilizadas neste trabalho permitiram selecionar aptâmeros que interferem em funções vitais para o parasita causador da malária. Isto é, por um lado, o *Cell*-SELEX rendeu aptâmeros que afetam de alguma forma a viabilidade dos parasitas nos eritrócitos infectados e por outro lado aptâmeros reduzem a atividade enzimática da PdxK, enzima essencial na biossíntese de vitamina B6.

5 DISCUSSÃO

5.1 SELEX contra eritrócitos infectados (Cell-SELEX)

Plasmodium falciparum é um dos protozoários que causam a malária humana; doença associada a uma alta taxa de mortalidade mundial. Este parasita junto com outros protozoários que causam doenças humanas despertam, bastante, a curiosidade de pesquisadores científicos que almejam entender o funcionamento, a nível biológico, destes organismos com o intuito de impedir que eles se desenvolvam. No entanto, essa não é uma tarefa fácil, pois como o natural da vida adaptações são essenciais visando a evolução da sua própria espécie. Neste sentido, o *Plasmodium falciparum* desenvolveu mecanismos de adaptação que lhe permitem permanecer dentro do hospedeiro humano evadindo de forma eficiente o sistema imunológico deste último.

Sabe-se que dentre os mecanismos celulares presentes durante a infecção do parasita está a sua capacidade em promover a interação de eritrócitos infectados à receptores presentes em vasos endoteliais e a receptores naturais de células vermelhas (CHEN; SCHLICHTHRLE; WAHLGREN, 2000). Essa capacidade de citoaderência surge pouco tempo após a invasão, no momento em que proteínas sintetizadas pelo parasita são exportadas à superfície eritrocítica (SCHERF et al., 2008). Por este motivo os nossos experimentos foram realizados com parasitas na fase trofozoíta jovem. Ainda, nesse estágio de desenvolvimento do parasita, existem transportadores de nutrientes que facilitam a absorção de nutrientes do meio extracelular garantindo a sobrevivência do mesmo (ALKHALIL et al., 2004).

A composição da membrana eritrocítica, alterada pelo parasita, resulta em uma assinatura molecular própria de uma célula vermelha parasitada por *Plasmodium falciparum* (ULRICH; WRENGER, 2009). Baseado na existência de epítomos, alguns desconhecidos, presentes na superfície de eritrócitos infectados, resulta intrigante a identificação dessas proteínas, cuja interferência poderia afetar a sobrevivência do parasita.

A utilização da estratégia SELEX para a identificação de novos epítomos mostrou-se uma potente ferramenta no estudo de interações parasita-hospedeiro com potencial terapêutico. Sua ampla aplicabilidade sobre diversos alvos é a resultante das possíveis combinações presentes na região central aleatória. (JELLINEK et al., 1993). No nosso caso, o sucesso da técnica de Cell-SELEX radica no fato de que a biblioteca aleatória possua 34 posições onde os 4 nucleotídeos de

DNA poderiam se combinar. Isto equivale a aproximadamente 10^{15} possíveis sequências dentro da biblioteca apresentada ao alvo com uma assinatura molecular exclusiva (DANIELS et al., 2003).

O sucesso da seleção depende dos cuidados obtidos durante a realização dos ciclos. O primeiro passo da técnica é a amplificação das moléculas de DNA por PCR convencional. Este é um passo muito importante, pois nele deve-se definir o número de ciclos e a quantidade de DNA ideais para garantir uma amplificação específica e livre de contaminantes, os quais seriam prejudiciais durante as seleções (MUSHEEV; KRYLOV, 2006; SEFAH et al., 2010). O próximo passo da técnica é a separação das fitas de DNA; produto da amplificação utilizando oligonucleotídeo marcado com biotina. Dois métodos de separação são possíveis: (I) através de um sistema utilizando pérolas magnéticas envoltas por streptavidina (SEFAH et al., 2010) ou (II) separando as fitas de DNA através de um sistema de eletroforese desnaturante. Neste trabalho fizemos uso da segunda forma de separação de fitas, uma vez que, estudos prévios relataram a interferência de contaminantes com fitas simples biotiniladas quando utilizado o sistema magnético (PAUL et al., 2009).

No processo SELEX as seleções negativas são imprescindíveis. Em nosso caso, que utilizamos células vermelhas inteiras, temos possivelmente um alto número de alvos provenientes do parasita, bem como alvos naturais que constituem a membrana eritrocítica (MORRIS et al., 1998). Portanto, em nosso trabalho utilizamos eritrócitos naive para a exclusão das moléculas de DNA que possuem afinidade por algum epítipo que seja natural de uma célula vermelha. Além disso, aplicamos um ciclo de dupla seleção, cuja vantagem é o uso dos ligantes a partir da seleção negativa com o material de partida para um ciclo de seleção positiva. Este passo dispensa de um novo ciclo de amplificação e garante que não haverá perda ou alterações por mutações do material recuperado durante a seleção negativa (DAVYDOVA et al., 2011). Outros aspectos que favoreceram a seletividade dos aptâmeros obtidos foram a adição de competidores inespecíficos, bem como, a diminuição do número de alvos e passos de lavagens, o que constatamos aumentou a adstringência na seleção obtendo ligantes com alta afinidade e especificidade. O competidor utilizado em nosso trabalho foi o tRNA de levedura, que atuaria como um agente bloqueante em sítios de interação inespecíficos (KONIG et al., 2007). Já os passos de lavagens contribuíram para (i) excluir ligantes de baixa afinidade e (ii) excluir não ligantes que eventualmente tenham sido recuperados mediante a

separação BRASIL. A redução do número de alvos também exerce uma pressão de seleção por aqueles que possuem maior afinidade.

O número de ciclos de seleção é indefinido e depende do alvo de estudo. Quando se trabalha com um único alvo, como por exemplo, uma proteína recombinante, todos os ligantes selecionados contra ele competem pelo seu sítio de ligação. Diferente do que se espera quando aptâmeros são selecionados contra um complexo multi-proteico, como uma superfície celular, por exemplo, onde um conjunto de aptâmeros são selecionados contra um conjunto de proteínas e, portanto, a especificidade e afinidade aumentam. Isto pode resultar em um efeito sinérgico entre os aptâmeros (CHEN et.al., 2009). Ainda com a questão relevante de antagonismo e sinergismo é possível esperar que o número de seleções contra um alvo definido tende a ser menor quando o alvo é desconhecido (MORRIS et al., 1998). Em ambos os casos, os ciclos de seleções devem ser feitos até se observar uma redução na heterogeneidade das sequências.

O número de sequências triadas também depende do alvo de estudo. Isso quer dizer que quando se trabalha com um único alvo o número de aptâmeros analisados pode ser bem inferior a quando se trabalha com alvos desconhecidos (ULRICH et al., 2004). Em nosso trabalho, aproximadas 50 sequências de DNA foram suficientes para uma análise da seleção contra a enzima Pdxk de *P. falciparum*, enquanto que 250 sequências foram obtidas para analisar as famílias de aptâmeros selecionados contra a superfície de eritrócitos infectados por *P. falciparum*.

Nosso SELEX contra eritrócitos infectados foi realizado com 10 ciclos de SELEX. Observamos que após o sétimo ciclo de seleção, houve um enriquecimento de sequências específicas em relação ao primeiro ciclo de 12 vezes, como verificado mediante o ensaio de PCR em tempo real. A diminuição da heterogeneidade destas sequências também foi conferida mediante o sequenciamento das moléculas selecionadas (MENCIN et al., 2014). A partir disso, pudemos observar que em um *n* baixo já haviam sequências que apareciam majoritariamente (Seq. rosa, Seq. verde, Seq. azul, Seq. roxa e Seq. Laranja, tabela 2), indicando que os ciclos de seleção do Cell-SELEX estavam funcionando satisfatoriamente (GOLD, 1995).

As sequências obtidas foram alinhadas entre si e classificadas em famílias (I, II, III, IV e V – Tabela 3) de acordo com a similaridade dos nucleotídeos presentes nas regiões randômicas. Esta similaridade foi consistente com as posições dos

motivos conservados encontrados entre as suas estruturas secundárias (BAILEY et al., 2009). A importância de motivos conservados entre sequências já é conhecida. Sabe-se que os locais onde estão os motivos conservados desde o DNA parental, indicam o local onde ocorre interação da molécula com o alvo (DAVIES et al., 2012; FEIGON; DIECKMANN; SMITH, 1996). A partir das sequências primárias das moléculas de DNA é possível gerar as estruturas secundárias das mesmas. Isso é feito também por um auxílio computacional (ZUKER, 2003). As hastes das estruturas são consideradas os locais que estabilizam toda a estrutura ao passo que as regiões de *stem-loop* muito provavelmente promovem a interação entre o aptâmero e o alvo. A força dessa interação depende da forma como os primeiros se encaixam nas cavidades dos segundos.

A predição das estruturas secundárias das moléculas de DNA provenientes do 7 ciclo de seleção contra célula mostram justamente que os motivos conservados encontrados entre as sequências constituem as regiões de alças (Figura 9). Observamos que as famílias 1, 3 e a sequência azul possuem 3 alças contendo total (família 1 e azul), ou parcialmente (família 3), os motivos conservados. Quatro dessas famílias (família 2, 4, 5 e seq. rosa) possuem 2 alças que também são constituídas pelas regiões consenso. Por fim, a família da sequência roxa possui um único *stem-loop* no qual toda a região randômica está presente.

Para avaliarmos o local da interação dos aptâmeros, cujas estruturas secundárias haviam sido apuradas, usamos aptâmeros conjugados a FITC para ensaios de microscopia de fluorescência. Observamos que os aptâmeros da família 3 e seq. azul mostravam uma marcação intracelular, enquanto os outros aptâmeros se localizavam na superfície dos eritrócitos infectados (Figura 14); confirmando assim que as moléculas alvo estavam sendo atingidas pelos aptâmeros selecionados.

A capacidade de internalização de um aptâmero traz possíveis aplicações como direcionamento celular e transporte (GOPINATH et al., 2016), sendo possível marcar um aptâmero, previamente selecionado contra um alvo, e observar seu transporte de conjugados proteicos para dentro da célula (CHEN et al., 2008). No entanto, o foco do nosso projeto era identificar proteínas do parasita exportadas na superfície eritrocítica.

A partir dos resultados obtidos que indicavam o sucesso na aplicabilidade da técnica, e tendo em consideração que nossos alvos seriam identificados apenas ao

término dos ciclos, consideramos relevante avançar com as seleções. Dez ciclos foram realizados e o produto final foi submetido ao processo de identificação das sequências de DNA selecionados e as suas correspondentes estruturas secundárias foram avaliadas.

Duzentos e trinta e quatro (234) clones, dos 1.000 clones sequenciados, foram agrupados em 11 famílias de acordo com os motivos comuns nas sequências primárias. O enriquecimento das sequências também foi avaliado a partir da biblioteca original sequenciada. Os dados indicam que nossas seleções foram iniciadas contra uma biblioteca não absolutamente randômica. Ainda que o ideal seja utilizar uma biblioteca altamente aleatória, a existência de sequências com um índice de presença alto desde o início é um fato esperado pela biblioteca ser sintetizada enzimaticamente. No entanto, um exemplar de cada família de aptâmeros foi selecionado para avaliar a sua funcionalidade.

5.2 Aptâmeros como moléculas com potencial anti-plasmódio

A existência de 11 famílias com motivos distintos sugere que ao longo do nosso processo de seleção, aptâmeros interagiram com receptores das células apresentadas. Também sabemos que receptores de células são considerados alvos atrativos para inibição, uma vez que, sua presença está sempre relacionada a alguma interação com o meio extracelular, mesmo que desconhecida (DAVYDOVA et al., 2011). Usando um exemplar de cada família de aptâmeros avaliamos o seu efeito no crescimento celular do parasita durante o seu ciclo eritrocítico (Figura 18). Dois aptâmeros (Apt 1 e Apt 3) mostraram-se mais eficazes na redução do crescimento celular e 2 aptâmeros (Apt 5 e Apt 11) mostraram efeito semelhante em doses maiores. Os aptâmeros selecionados mostraram um potente efeito inibitório na proliferação de *P. falciparum*. Em todos eles foram preditas estruturas secundárias do tipo *stem-loop*, que são essenciais para a interação com o alvo. O dobramento dos aptâmeros sobre elas também pode afetar a funcionalidade das proteínas atingidas (LORGER et al., 2003). A alta afinidade por seus alvos específicos foi evidenciada pelas doses inibitórias usadas ($EC_{50} \approx 10 \mu M$). Fato este que poderia ser útil também para a identificação dos alvos a partir de um sistema de purificação (MALLIKARATCHY et al., 2007).

Uma vez que obtivemos quatro sequência de aptâmeros cujo efeito anti-plasmódio foi evidenciado, avaliamos se estes compartilhavam alvos semelhantes de interação. Através do sistema de purificação por estreptavidina-biotina utilizando os quatro aptâmeros selecionados contra células (Apt 1, Apt 3, Apt5 e Apt 11) identificaram-se distintas proteínas (Tabela 13). Isso compacta com o que Morris e colaboradores (1998) dizem sobre a capacidade que aptâmeros têm de, em meio a um complexo proteico, reconhecerem proteínas específicas em processos simultâneos e ainda ao final serem capazes de pescar as proteínas específicas tripsinizadas a partir de um lisado para identificação por espectrometria de massa (JAVAHERIAN et al., 2009).

Todos os aptâmeros reconheceram uma ou mais proteínas de superfície (*PfEMP1* e rifin). Proteínas não caracterizadas também foram reconhecidas, onde acreditamos que duas delas sejam transportadores de nutrientes por ter atividade ATPase/GTPase (PF3D7_1208500). Vimos também que proteínas que atuam diretamente na interação parasita-hospedeiro foram atingidas, como RAP1.

A identificação de *PfEMP1* em meio a todas as proteínas identificadas nos leva a confirmar que a seleção de aptâmero contra proteínas de superfície de eritrócitos infectados foi realizada positivamente. Sabendo que o polipeptídeo *PfEMP1* (CHEN; SCHLICHOTHERLE; WAHLGREN, 2000), marcador molecular do processo que medeia a adesão identificada (HOWARD; BARNWELL; KAO, 1983; LEECH et al., 1984), podemos confirmar que os aptâmeros selecionados reconheceram proteínas de adesão também, fato confirmado por utilizarmos cultura com plasma humano ao invés de albumax. Essa evidência também foi confirmada com a presença de proteínas exportadas Rifin envolvidas também no processo de adesão (JOANNIN et al., 2008).

A redução na viabilidade celular observada nos experimentos *in vitro* foi ocasionada pela interação dos aptâmeros selecionados contra proteínas de superfície celular provenientes dos parasitas. Essa interação poderia sobressair sobre a interação do eritócito para com receptores de vasos e receptores naturais de células vermelhas, no caso dos aptâmeros 1, 3 e 11 que tiveram afinidade com proteínas *PfEMP1* e rifin, inibindo dessa forma a função da proteína de adesão. Contudo, considerando as condições de cultivo, não existe a atuação dessa proteína de adesão nos fazendo desconsiderar que a interação com estes tipos de proteínas, nestas condições, é a responsável pela redução na viabilidade do parasita.

A proteína *PfEMP1* possui a capacidade de promover o processo de *rosetting* no qual o domínio DBL1 α , altamente conservado entre a família das *PfEMPs*, está envolvido. Neste sentido, Barfod e colaboradores (2009) selecionaram aptâmeros contra o domínio DBL1 α com capacidade de interferência total na formação deste processo. A partir disso, não podemos desconsiderar que nossos aptâmeros possam desempenhar a mesma capacidade, uma vez que tal domínio foi identificado em nossa seleção. Por outro lado, os aptâmeros 1 e 11 tiveram afinidade por proteínas de transporte, o que sim poderia ser motivo de inibição já que os parasitas necessitam de nutrientes extracelulares para sua sobrevivência. Portanto, podemos dizer que nossos aptâmeros possuem estruturas dimensionais estáveis que se ligam a um epítipo dominante em uma proteína, bloqueando as suas funções (MORRIS et al., 1998).

Proteínas hipotéticas foram encontradas, cuja análise minuciosa dos seus domínios conservados revelou similaridade com uma das possíveis 20 proteínas contidas na organela roptria (RICHARD et al., 2009). Além disso, a proteína RAP1 também foi identificada, sendo ambas proteínas identificadas pelo mesmo aptâmero (1). As proteínas das roptrias exercem uma importante função durante o processo de invasão dos eritrócitos e na formação do vacúolo parasitóforo (PV), na fase *ring* do parasita. Porém, a RAP1 em particular não é importada ao PV (BALDI et al., 2000). Contudo, aptâmeros foram selecionados contra trofozoítas levando a hipotetizar a presença dessa proteína também no estágio intraeritrócítico, sendo a sua função neste momento ainda desconhecida.

Outra proteína de superfície reconhecida foi a CRMP (*Cysteine Repeat Modular Proteins* 1-4). Sendo que o aptâmero 3 reconheceu a forma isométrica 4 da proteína, cuja função no ciclo eritrocítico não está descrita (DOURADINHA et al., 2011). Para esta fase apenas a CRMP 1 e 2 têm sido relatadas como proteínas de membrana que medeiam a resposta do parasita perante a estímulos externos (THOMPSON et al., 2007).

De modo geral, os quatro aptâmeros apresentaram afinidades por proteínas em comum, em especial os aptâmeros 1 e 3 reconheceram 4 proteínas consenso. Quando olhamos as estruturas secundárias desses dois aptâmeros, observamos que ambos apresentam uma única haste com 2 *loops*, sendo o primeiro um *interior loop*, no aptâmero 1, e um *bulge loop*, no aptâmero 3. Relatos prévios mostraram que ditas estruturas lhe conferem flexibilidade e ΔG distintas (HOINKA et al., 2012),

o que também pode estar relacionado ao fato de interagirem com proteínas únicas de forma específica e proteínas em comum.

É de se esperar que cada aptâmero tenha uma afinidade definida para cada alvo. Contudo, diferentes conformações podem ser encontradas nos aptâmeros (JELLINEK et al., 1993), como de fato corroboramos nas nossas análises. Utilizamos a estrutura que tinha a menor energia livre de Gibbs para representar nossas famílias de aptâmeros.

O aptâmero 11 possui uma estrutura com 2 *hairpin loops*, regiões bem estáveis, e ΔG de $-10 \text{ K}_{\text{cal}}/\text{mol}$. Reconhecendo proteínas RIFIN e proteínas conservadas de função desconhecida sua atuação no crescimento do parasita não foi a melhor. O Apt 5 possui uma estrutura com dois *loops*, *hairpin loop* e *interior loop*. Na interação com proteínas é o único que identifica apenas duas, uma *PfEMP* e uma proteína hipotética. Quando olhamos para a tabela de enriquecimento vemos que este aptâmero é o que mais enriqueceu, mas seu papel no crescimento do parasita não foi bom quando comparado com os aptâmeros 1 e 3, por exemplo.

Aptâmeros 1 e 3 interagem com uma diversidade maior de alvos, sendo alguns deles comuns nos dois casos (Rifin, *PfEMP*, CCT6 e uma proteína hipotética). Quando aptâmeros interagem com um único alvo eles passam a ter um efeito de competitividade ao invés do efeito sinérgico observado quando os aptâmeros reconhecem alvos diferentes (CHEN et. al., 2008). No nosso caso obtivemos dois aptâmeros (apt.1 e 3) com a propriedade de ser *multi-target*. Fato este que pode ser atribuído à relevante redução que vemos no crescimento dos parasitas. Esta propriedade deve ser considerada quando utilizada como composto anti-plasmódio, porque favorece à ausência de cepas resistentes ao tratamento.

Para que uma região consenso seja classificada como tal basta que uma ordem de no mínimo 6 nucleotídeos esteja presente em mais de uma sequência. Sendo assim, podemos esperar que nossos aptâmeros, os quais apareceram com uma região conservada de maior tamanho (34 nts), apresentem afinidade por mais de uma proteína distinta, indicando que dentro dos motivos comuns encontrados existam submotivos conservados.

Nossos aptâmeros selecionados são produtos de uma triagem promovida por ciclos iterativos a partir de um conjunto de moléculas. Da mesma forma que uma droga é escolhida, em meio a muitas, a partir de um processo de triagem (GOLD, 1995). Além dos mais nosso estudo demonstra que esta estratégia em duas etapas,

o desenvolvimento de aptâmeros e, em seguida, a identificação das suas proteínas alvo, podem ser utilizados para descobrir novos marcadores de doença e, assim, melhorar o diagnóstico e terapia.

Figura 29 – Esquema do processo SELEX realizado neste trabalho contra proteínas de superfície de eritrócito infectado.

Processo SELEX é iniciado a partir da amplificação (I) da biblioteca aleatória. Fitas simples de DNA com mais de uma cópia são apresentadas aos eritrócitos infectados (iRBC) (II). Moléculas de DNA que não se ligam ao iRBC são excluídas do processo (III), enquanto as moléculas ligadas são recuperadas (IV) e utilizadas como DNA molde para o próximo ciclo que é iniciado com uma nova amplificação (I). Eventualmente, moléculas de DNA amplificadas (I) são utilizadas contra eritrócitos naive (RBC) (II'). Moléculas de DNA que se ligam ao RBC são descartadas (III'), enquanto que não ligantes são recuperados (IV') e amplificados iniciando o ciclo seguinte. Moléculas de DNA que compõe o último *pool* de seleção são (V) analisadas e classificadas em famílias.

5.3 SELEX contra proteína recombinante

Outra abordagem para desenvolver a técnica SELEX é a apresentação direta do alvo purificado. Partindo do princípio que proteínas alvo podem ser expressas e purificadas, ou mesmo que podem estar em maior abundância dentro de uma determinada amostra, o reconhecimento por aptâmeros específicos é facilitado (SHAMAH, et.al., 2007).

Neste sentido, realizamos também o SELEX contra a *PfPdxK* na forma apoenzima. Diferente de quando se trabalha com um complexo proteico, o trabalho

com uma proteína-alvo determinada simplifica o processo. Isto porque se reduz o número de ciclos necessários para gerar um aptâmero com afinidade e específico, bem como, a quantidade de sequências necessárias para as análises dos motivos conservados.

Na segunda parte de nosso trabalho selecionamos aptâmeros contra a proteína recombinante piridoxal quinase expressa em sistema heterólogo bacteriano. Esta enzima é, responsável pela fosforilação dos vitâmeros da vitamina B6 à sua forma ativa. Esta via no *P. falciparum* é dita como alternativa já que ele é capaz de sintetizar a vitamina B6, pondo em questão se esta via está presente no parasita para aproveitar a vitamina B6 ingerida pelo hospedeiro vertebrado ou se ela está presente para recaptação do substrato resultante da desfosforilação do produto PLP (WRENGER et al., 2008). Mais do que isso, nosso interesse ao selecionar aptâmeros contra essa proteína era observar se o primeiro reconhecia a proteína afetando a sua atividade catalítica.

Para isso, realizamos a seleção de nossos ligantes contra *PfPdxK* através de ciclos iterativos de seleção pelo método convencional de SELEX, desenvolvido por Larry Gold (1990) e Jack Szostak (1992). Sucintamente, apresentamos a biblioteca original de DNA à proteína alvo purificada. O DNA ligado ao alvo foi separado do DNA não ligado e amplificado por PCR para produzir uma biblioteca de DNA enriquecida. O procedimento foi repetido durante 8 ciclos. Cada ciclo era iniciado com a biblioteca enriquecida obtida na ronda anterior. No último ciclo de seleção fomos conferir a funcionalidade dos aptâmeros em conjunto através de uma reação enzimática (MULLER et al., 2009), onde a proteína *PfPdxK* isolada, a proteína com o primeiro *pool* de seleção e a proteína com o último *pool* de seleção foram analisadas (Figura 26). As atividades da proteína com o 1° e 8° *pool* de aptâmeros foram reduzidas ao 10% e 30%, respectivamente, em relação a proteína isolada. Já dizia Javaherian (2009) que aptâmeros específicos em meio a um conjunto de aptâmeros eram capazes de selecionar alvos específicos em meio a um lisado proteico. Com a única diferença de que nosso alvo estava purificado, confirmando também que a triagem de aptâmeros afins estava ocorrendo de forma bem sucedida.

Em 2002, Krylov e seu grupo introduziram um novo método para selecionar os aptâmeros de forma mais rápida que o convencional. Método este conhecido como NECEEM (*non- equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures*). A técnica tem substituído o método convencional de SELEX por se tratar de uma

técnica eficiente no que diz respeito a separação das moléculas ligadas das moléculas não ligadas. Tamanha é a eficiência na separação que prescinde da realização de ciclos contínuos de seleção (BEREZOVSKI; KRYLOV, 2002).

Simplificando-o, a mistura de incubação contendo: (1) *PfPdxK* livres, (2) complexo DNA-*PfPdxK* e (3) moléculas de DNA livres não ligadas, é submetida a um capilar de eletroforese não equilibrado. Quando aplicada uma alta voltagem no capilar, os componentes da incubação migram de forma diferente. Neste sentido, as proteínas livres (1) se mobilizam mais rápido que o DNA. O DNA livre (3) e o complexo DNA-*PfPdxK* (2) se dissociam após um tempo de corrida e o complexo (2) migra antes. Conforme a dissociação entre os componentes ocorre vemos perfis de migração diferentes entre eles, o que representa as dissociações resultantes de alvos (1') ou moléculas (2') ligados com baixa afinidade ao complexo (Figura 30) (BEREZOVSKI et al., 2005).

Figura 30 - Representação esquemática do ensaio do Eletroforese Capilar.

O perfil de corrida da amostra introduzida em um capilar de eletroforese mostra que (1) proteínas alvos migram primeiro, seguido (2) do complexo DNA-proteína e, por fim, (3) os DNA não ligados que migram de forma mais lenta. Adaptado de Berezovski et.al., 2005.

A partir do perfil dado ao fim da corrida é possível programar coletas das amostras de interesse. A seleção positiva do processo corresponde a janela do complexo DNA-*PfPdxK* (2) e DNAs livres (2'), enquanto que as moléculas de DNA não ligadas (3) podemos representar a seleção negativa (Figura 30). Ao final do processo a janela correspondente a seleção positiva deve ser recuperada para que o DNA enriquecido seja utilizado no próximo ciclo (KANOATOV; KRYLOV, 2011). A representação acima esquematiza exatamente o que vimos em nossa corrida de EC (Figura 22).

Conforme dito anteriormente a técnica de eletrofore capilar tem sido utilizada como (I) modo de separação mais eficaz de ligantes e não ligantes e (II) como modo

de selecionar moléculas de DNA mais prontamente. Após realizarmos 8 ciclos de seleção através do método convencional e 1 ciclo de seleção através do método de eletroforese capilar, a última amostra correspondente ao DNA ligado foi recuperada.

No entanto, a eficiência da técnica não se resume ao passo de recuperação dos ligantes, o qual implica em um nível muito baixo de moléculas recuperadas (MUSHEEV; KRYLOV, 2006), motivo pelo qual tivemos que realizar 10 ciclos de coleta para conseguirmos amplificar os ligantes de alta afinidade pela *PfPdxk* e proceder com as análises. Como dito anteriormente, uma das vantagens de se trabalhar com a proteína recombinante se aplica ao fato do número de sequências finais, necessário nas análises das famílias de motivos conservados e de estrutura, ser menor. Finalizada nossa seleção, o produto recuperado pela técnica de eletroforese capilar foi amplificado e aproximadamente 50 sequências foram analisadas. As sequências altamente enriquecidas foram sequenciadas e agrupadas em 2 famílias de acordo com a homologia das sequências primárias e similaridade das estruturas secundárias. Escolhemos 4 aptâmeros. Dois (Apt 35 e Apt 52) eram exemplares de cada família determinada e os outros 2 (Apt 39 e Apt 45) não apresentaram famílias definidas. Clones que aparecem em meio as sequências selecionadas e que não estão incluídas dentro das famílias previstas, possivelmente, são sequências que não foram descartadas durante os ciclos ou são sequências que fazem partes de famílias pouco prevalentes a ponto de não serem concedidas na análise final (MORRIS et al., 1998).

Dois aptâmeros (Apt 35 e Apt 39) apresentaram *hairpin loops* em suas estruturas secundárias apesar de um aptâmero possuir 2 alças (Apt 39) e o outro 3 alças (Apt 35). O Apt 45 também apresentou 2 alças, onde 1 possuía um *hairpin loop* e a outra um *interior loop*. O Apt 52 foi o único aptâmero de apenas 1 alça contendo um *bulge loop* seguido pelo *hairpin loop*. Todos possuíam o motivo conservado encontrado em domínios simples fita. Isso sugere que os aptâmeros possuem dobragem diferente entre eles, exceto entre os aptâmeros 35 e 39 que possuem uma mesma estrutura apesar do número de grampos diferentes, e que o contato específico com o alvo pode ser mediado pelos motivos da sequência de cadeia simples. Embora as estruturas *hairpin loop* tenham sido identificadas com a sequência simples que, possivelmente, interage com a proteína recombinante, os aptâmeros 35 e 39 não apresentaram o melhor perfil na interferência das atividades

enzimáticas. Por outro lado, os aptâmeros 52 e 45 apresentaram uma capacidade de inibitória maior.

Nosso trabalho contribui para a observação de que SELEX é uma técnica altamente promissora que pode gerar ligantes específicos com capacidade de interferência em processos vitais para o parasita em estudo. Gerar ligantes contra proteínas de superfície e contra proteína do metabolismo de *P. falciparum* demonstra a aplicabilidade da técnica para com alvos complexos e alvos puros. Gerar ligantes com capacidade de interferência em ambos os alvos nos demonstra que aptâmeros podem ser utilizados para fins terapêuticos. Aqui, nossos aptâmeros poderiam ser considerados grandes promissores antimaláricos.

6 CONCLUSÃO

Utilizando um modelo de estudo que envolve a interação de dois tipos celulares com notáveis diferenças biológicas, constatamos que a técnica de SELEX pode ser utilizada atenuando a infecção do parasita causador da malária humana. Aplicando duas estratégias diferentes para a seleção de aptâmeros contra o(s) alvo(s) molecular(es) propostos, obtivemos moléculas que atuavam de forma antagônica na funcionalidade destes alvos. Observamos que o papel das proteínas do parasita exportadas à superfície eritrocitária é essencial para a sobrevivência do *P. falciparum* dentro das hemácias infectadas; o que com alguns experimentos adicionais pode constituir uma alternativa promissora no combate a este parasita. Quando o alvo apresentado corresponde à PfPdxK purificada, na forma apoenzima, os aptâmeros resultantes reduzem a atividade catalítica desta. As diferenças estruturais previstas para os distintos aptâmeros obtidos se correlacionam com a eficácia exibida nos diferentes ensaios. A essencialidade do metabolismo da vitamina B6 na viabilidade do parasita será ainda motivo de estudo.

REFERÊNCIAS*

- ALBRECHT, L. et al. Extense variant gene family repertoire overlap in Western Amazon *Plasmodium falciparum* isolates. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, n. 2, p. 157-165, Dec 2006.
- ALKHALIL, A. et al. *Plasmodium falciparum* likely encodes the principal anion channel on infected human erythrocytes. **Blood.**, v. 104, n. 13, p. 4279-4286, Dec 15 2004.
- ALONSO, P.L., TANNER, M. Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. **Nat. Med.**, v. 2, p. 150-155, 2013.
- BAILEY, T. L. et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. Web Server issue, p. W202-208, Jul 2009.
- BAILEY, T.I., ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discovery motifs in biopolymers. UCSD Technical Report CS94-351. Department of Computer Science, University of California, San Diego, Aug 1994.
- BALDI, D. L. et al. RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **EMBO J.**, v. 19, n. 11, p. 2435-2443, Jun 1 2000.
- BARFOD, A.; PERSSON, T.; LINDH, J. In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. **Parasitol. Res.**, v. 105, n. 6, p. 1557-1566, Nov 2009.
- BAUMEISTER, S. et al. Evidence for the involvement of *Plasmodium falciparum* proteins in the formation of new permeability pathways in the erythrocyte membrane. **Mol. Microbiol.**, v. 60, n. 2, p. 493-504, Apr 2006.
- BEREZOVSKI, M. et al. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, n. 9, p. 3165-3171, Mar 9 2005.
- BEREZOVSKI, M.; KRYLOV, S. N. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures--a single experiment reveals equilibrium and kinetic parameters of protein-DNA interactions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, n. 46, p. 13674-13675, Nov 20 2002.
- BEREZOVSKI, M.V. et.al. Aptamer-Facilitated Biomarker Discovery (AptaBiD). **J. Am. Chem. Soc.** v.130, p. 9137–9143. Jun 2008.
- BIRCH, C. M. et al. Identification of malaria parasite-infected red blood cell surface aptamers by inertial microfluidic SELEX (I-SELEX). **Sci. Rep.**, v. 5, p. 11347, 2015.
- BODDEY, J. A. et al. Role of the *Plasmodium* export element in trafficking parasite proteins to the infected erythrocyte. **Traffic.**, v. 10, n. 3, p. 285-299, Mar 2009.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOWMAN, S. et al. The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. **Nature.**, v. 400, n. 6744, p. 532-538, Aug 5 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, May 7 1976.

CHALOIN, L. et al. Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 30, n. 18, p. 4001-4008, Sep 15 2002.

CHEN, F. et al. CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8142, 2009.

CHEN, H. W. et al. Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers. **Chem.Med.Chem.**, v. 3, n. 6, p. 991-1001, Jun 2008.

CHENG, Q. et al. *stevor* and *rif* are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 97, n. 1-2, p. 161-176, Nov 30 1998.

CHEN, Q., SCHLICHTERLE, M., WAHLGREN, M. Molecular Aspects of Severe Malaria. **Clin. Microb. Rev.**, p. 439-450. 2000.

CHERNEY, L. T.; OBRECHT, N. M.; KRYLOV, S. N. Theoretical modeling of masking DNA application in aptamer-facilitated biomarker discovery. **Anal. Chem.**, v. 85, n. 8, p. 4157-4164, Apr 16 2013.

CRABB, B. S. et al. Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. **Cell.**, v. 89, n. 2, p. 287-296, Apr 18 1997.

DANIELS, D. A. et al. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 100, n. 26, p. 15416-15421, Dec 23 2003.

DAVIES, D. R. et al. Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 109, n. 49, p. 19971-19976, Dec 4 2012.

DAVYDOVA, A. S.; VOROBJEVA, M. A.; VENYAMINOVA, A. G. Escort aptamers: new tools for the targeted delivery of therapeutics into cells. **Acta. Naturae.**, v. 3, n. 4, p. 12-29, Oct 2011.

DESAI, S. A.; BEZRUKOV, S. M.; ZIMMERBERG, J. A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. **Nature.**, v. 406, n. 6799, p. 1001-1005, Aug 31 2000.

- DOURADINHA, B. et al. Plasmodium Cysteine Repeat Modular Proteins 3 and 4 are essential for malaria parasite transmission from the mosquito to the host. **Malar. J.**, v. 10, p. 71, 2011.
- ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature.**, v. 346, n. 6287, p. 818-822, Aug 30 1990.
- ELSWORTH, B. et al. PTEX is an essential nexus for protein export in malaria parasites. **Nature.**, v. 511, n. 7511, p. 587-591, Jul 31 2014.
- FEIGON, J.; DIECKMANN, T.; SMITH, F. W. Aptamer structures from A to zeta. **Chem. Biol.**, v. 3, n. 8, p. 611-617, Aug 1996.
- FRITH, M. C. et al. Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. **PLoS. Comput. Biol.**, v. 4, n. 4, p. e1000071, Apr 2008.
- GAMAIN, B. et al. Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 3-4, p. 273-283, Mar 2007.
- GINSBURG, H. et al. New permeability pathways induced in membranes of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 8, n. 2, p. 177-190, Jun 1983.
- GIORDANO, R. J. et al. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nat. Med.**, v. 7, n. 11, p. 1249-1253, Nov 2001.
- GOLD, L. The SELEX process: a surprising source of therapeutic and diagnostic compounds. **Harvey. Lect.**, v. 91, p. 47-57, 1995.
- GOPINATH, S. C. et al. Cell-targeting aptamers act as intracellular delivery vehicles. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 100, n. 16, p. 6955-6969, Aug 2016.
- GORINGER, H. U.; HOMANN, M.; LORGER, M. In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 12, p. 1309-1317, Oct 2003.
- GREENWOOD, B. M. et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 4, p. 1266-1276, Apr 2008.
- HELD, D. M. et al. Differential susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase to inhibition by RNA aptamers in enzymatic reactions monitoring specific steps during genome replication. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 35, p. 25712-25722, Sep 1 2006.
- HERRERA, R. E.; SHAW, P. E. UV shadowing provides a simple means to quantify nucleic acid transferred to hybridization membranes. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 17, n. 21, p. 8892, Nov 11 1989.
- HILLER, M. et al. Using RNA secondary structures to guide sequence motif finding towards single-stranded regions. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 34, n. 17, p. e117, 2006.

HOINKA, J. et al. Identification of sequence-structure RNA binding motifs for SELEX-derived aptamers. **Bioinformatics.**, v. 28, n. 12, p. i215-223, Jun 15 2012.

HOMANN, M.; GORINGER, H. U. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 27, n. 9, p. 2006-2014, May 1 1999.

HOWARD, R. J.; BARNWELL, J. W.; KAO, V. Antigenic variation of Plasmodium knowlesi malaria: identification of the variant antigen on infected erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 80, n. 13, p. 4129-4133, Jul 1983.

JAVAHERIAN, S. et al. Selection of aptamers for a protein target in cell lysate and their application to protein purification. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 8, p. e62, May 2009.

JELLINEK, D. et al. High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 90, n. 23, p. 11227-11231, Dec 1 1993.

JOANNIN, N. et al. Sub-grouping and sub-functionalization of the RIFIN multi-copy protein family. **BMC. Genomics.**, v. 9, p. 19, 2008.

JOSHI, R. et al. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars. **Mol. Cell Probes.**, v. 23, n. 1, p. 20-28, Feb 2009.

KANOATOV, M.; KRYLOV, S. N. DNA adsorption to the reservoir walls causing irreproducibility in studies of protein-DNA interactions by methods of kinetic capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, v. 83, n. 20, p. 8041-8045, Oct 15 2011.

KAZAN, H. et al. RNAcontext: a new method for learning the sequence and structure binding preferences of RNA-binding proteins. **PLoS Comput. Biol.**, v. 6, p. e1000832, 2010.

KIRK, K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 2, p. 495-537, Apr 2001.

KIRK, K.; HORNER, H. A.; KIRK, J. Glucose uptake in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is an equilibrative not an active process. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 82, n. 2, p. 195-205, Nov 25 1996.

KLEIN, E. Y. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 41, n. 4, p. 311-317, Apr 2013.

KONIG, J. et al. Combining SELEX and the yeast three-hybrid system for in vivo selection and classification of RNA aptamers. **RNA.**, v. 13, n. 4, p. 614-622, Apr 2007.

KRONENBERGER, T. et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of pyridoxal kinase from Plasmodium falciparum (PfPdxK). **Acta. Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.**, v. 70, n. Pt 11, p. 1550-1555, Nov 2014.

LAUER, S. A. et al. A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. **Science.**, v. 276, n. 5315, p. 1122-1125, May 16 1997.

LEE, J. F. et al. Aptamer database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. Database issue, p. D95-100, Jan 1 2004.

LEECH, J. H. et al. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J. Exp. Med.**, v. 159, n. 6, p. 1567-1575, Jun 1 1984.

LISS, M. et al. An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. **Anal. Chem.**, v. 74, n. 17, p. 4488-4495, Sep 1 2002.

LORGER, M. et al. Targeting the variable surface of African trypanosomes with variant surface glycoprotein-specific, serum-stable RNA aptamers. **Eukaryot Cell.**, v. 2, n. 1, p. 84-94, Feb 2003.

MALLIKARATCHY, P. et al. Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells. **Mol. Cell Proteomics.**, v. 6, n. 12, p. 2230-2238, Dec 2007.

MCROBERT, L. et al. Distinct trafficking and localization of STEVOR proteins in three stages of the Plasmodium falciparum life cycle. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 11, p. 6597-6602, Nov 2004.

MENCIN, N. et al. Optimization of SELEX: comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 91, p. 151-159, Mar 2014.

MILLER, L. H.; GOOD, M. F.; MILON, G. Malaria pathogenesis. **Science.**, v. 264, n. 5167, p. 1878-1883, Jun 24 1994.

MORRIS, K. N. et al. High affinity ligands from in vitro selection: complex targets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 95, n. 6, p. 2902-2907, Mar 17 1998.

MULLER, I. B. et al. Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite Plasmodium falciparum. **PLoS One.**, v. 4, n. 2, p. e4406, 2009.

MUSHEEV, M. U.; KRYLOV, S. N. Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: addressing the polymerase chain reaction issue. **Anal. Chim. Acta.**, v. 564, n. 1, p. 91-96, Mar 30 2006.

NERY, A. A.; WRENGER, C.; ULRICH, H. Recognition of biomarkers and cell-specific molecular signatures: aptamers as capture agents. **J. Sep. Sci.**, v. 32, n. 10, p. 1523-1530, May 2009.

NG, E. W.; ADAMIS, A. P. Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1082, p. 151-171, Oct 2006.

O'BRIEN, C. et al. Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in Plasmodium falciparum. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 6, p. 570-577, Dec 2011.

O'CONNELL, D. et al. Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 93, n. 12, p. 5883-5887, Jun 11 1996.

PAUL, A. et al. Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. **Oligonucleotides.**, v. 19, n. 3, p. 243-254, Sep 2009.

PRICE, R. N. et al. World Antimalarial Resistance Network I: clinical efficacy of antimalarial drugs. **Malar. J.**, v. 6, p. 119, 2007.

RICHARD, D. et al. Identification of rhoptry trafficking determinants and evidence for a novel sorting mechanism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 3, p. e1000328, Mar 2009.

ROWE, J. A. et al. *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. **Nature.**, v. 388, n. 6639, p. 292-295, Jul 17 1997.

SANGER, F.S. et.al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, n. 12, p. 5463- 5467. 1977.

SARGEANT, T. J. et al. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. **Genome Biol.**, v. 7, n. 2, p. R12, 2006.

SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; RIVIERE, L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 445-470, 2008.

SEFAH, K. et al. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. **Nat. Protoc.**, v. 5, n. 6, p. 1169-1185, Jun 2010.

SHANGGUAN, D. et al. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells. **Anal. Chem.**, v. 80, n. 3, p. 721-728, Feb 1 2008.

SHORTT, H. E.; GARNHAM, P. C. Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites. **Nature.**, v. 161, n. 4082, p. 126, Jan 24 1948.

SINNIS, P. et al. Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 1, p. 297-306, Jul 1 1994.

SMITH, J. D. et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. **Cell.**, v. 82, n. 1, p. 101-110, Jul 14 1995.

SPUDEIT, D.A. DOLZAN, M.D., MICKE, G.A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Sci. Chrom.** v.4, n. 4, p.287-297. 2012.

SU, X. Z. et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Cell.**, v. 82, n. 1, p. 89-100, Jul 14 1995.

- THOMPSON, J. et al. Plasmodium cysteine repeat modular proteins 1-4: complex proteins with roles throughout the malaria parasite life cycle. **Cell Microbiol.**, v. 9, n. 6, p. 1466-1480, Jun 2007.
- TOLIA, N. H. et al. Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite Plasmodium falciparum. **Cell.**, v. 122, n. 2, p. 183-193, Jul 29 2005.
- TOMBELLI, S.; MINUNNI, M.; MASCINI, M. Analytical applications of aptamers. **Biosens. Bioelectron.**, v. 20, n. 12, p. 2424-2434, Jun 15 2005.
- TRAGER, W., JENSEN, J.B. Human malaria parasite in continuous culture. **Sci.**, v. 20, n. 193, p. 673-675, 1976.
- TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science.**, v. 249, n. 4968, p. 505-510, Aug 3 1990.
- ULRICH, H. et al. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of Trypanosoma cruzi and inhibit cell invasion. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 23, p. 20756-20762, Jun 7 2002.
- ULRICH, H.; MARTINS, A. H.; PESQUERO, J. B. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. **Cytometry A.**, v. 59, n. 2, p. 220-231, Jun 2004.
- ULRICH, H.; WRENGER, C. Disease-specific biomarker discovery by aptamers. **Cytometry A.**, v. 75, n. 9, p. 727-733, Sep 2009.
- VAN SIMAEYS, D. et al. Study of the molecular recognition of aptamers selected through ovarian cancer cell-SELEX. **PLoS One.**, v. 5, n. 11, p. e13770, 2010.
- VOGEL, G. The forgotten malaria. **Science.**, v. 342, n. 6159, p. 684-687, Nov 8 2013.
- WHITE, N. J. Drug resistance in malaria. **Br. Med. Bull.**, v. 54, n. 3, p. 703-715, 1998.
- WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J.; NEWBOLD, C. I. The membrane characteristics of Plasmodium falciparum-infected and -uninfected heterozygous alpha(0)thalassaemic erythrocytes. **Br. J. Haematol.**, v. 118, n. 2, p. 663-670, Aug 2002.
- WINTER, G. et al. SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 11, p. 1853-1863, Jun 6 2005.
- WRENGER, C. et al. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 7, p. 5242-5248, Feb 18 2005.
- WRENGER, C. et al. Vitamin B1 and B6 in the malaria parasite: requisite or dispensable? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 41, n. 2, p. 82-88, Feb 2008.
- ZIMBRES, F. M. et al. Aptamers: novel molecules as diagnostic markers in bacterial and viral infections? **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 731516, 2013.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 13, p. 3406-3415, Jul 1 2003.