

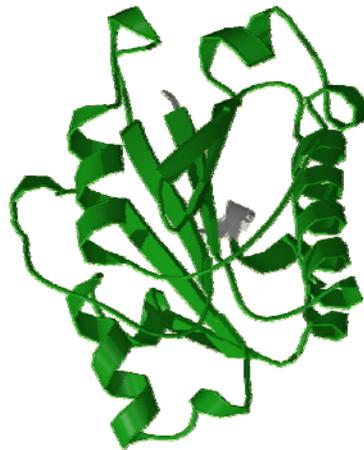
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

A expressão de WARP, um alvo potencial  
para Vacinas de Bloqueio de Transmissão,  
durante o desenvolvimento sexual de  
*Plasmodium gallinaceum*



por

*Armando de Menezes Neto*

Belo Horizonte

Fevereiro/2008

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

A expressão de WARP, um alvo potencial para Vacinas de  
Bloqueio de Transmissão, durante o desenvolvimento sexual  
de *Plasmodium gallinaceum*

por

Armando de Menezes Neto

Dissertação apresentada com vistas à obtenção  
do Título de Mestre em Ciências na área de  
concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Co-orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira

Belo Horizonte

Fevereiro/2008

**“FICHA CATALOGRÁFICA NO VERSO DA FOLHA DE ROSTO”**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M541e Menezes Neto, Armando.  
2008

A expressão de WARP, um alvo potencial para Vacinas de Bloqueio de Transmissão, durante o desenvolvimento sexual de *Plasmodium gallinaceum* / Armando de Menezes Neto. – Belo Horizonte, 2008.

xv, 103 f.; il.: 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 94 - 99

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

1. Malária aviária/transmissão 2. *Plasmodium gallinaceum*/crescimento e desenvolvimento 3. Regulação de expressão gênica/genética I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves (Orientação). III. Moreira, Luciano Andrade (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

## AGRADECIMENTOS

O meu mais sincero obrigado,

À minha orientadora, Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, pela confiança depositada em mim ao me aceitar como seu aluno, por me incentivar a exercer o pensamento crítico, pelo convívio amigável e respeitoso, por seu irrestrito apoio e sua incansável disposição em ajudar, pelas portas abertas a qualquer hora para conversas, perguntas e problemas.

Ao Dr. Luciano Andrade Moreira, meu co-orientador, por seu profundo envolvimento neste projeto, e pelos conselhos e idéias que em muito enriqueceram este trabalho. Obrigado também, pelos ensinamentos da convivência diária e pelo exemplo de pesquisador.

À Dra. Luzia Helena Carvalho, chefe do laboratório de Malária, por demonstrar uma vontade inigualável em ajudar quando solicitada, por verdadeiramente torcer pelo nosso sucesso e por sempre compartilhar com os estudantes a sua experiência e nos infundir com sua paixão pela malária.

Ao Dr. Paulo Pimenta, por aceitar ser um colaborador deste trabalho e contribuir para sua melhoria com sua experiência

Aos amigos do LAMAL, pesquisadores, funcionários, técnicos e estudantes. Por criarem o ambiente de união, confiança, companheirismo e prosperidade científica no qual este trabalho foi desenvolvido.

Ao Geraldo Felício, técnico do LAMAL, por sua infinita paciência em me aturar e ainda entrar na brincadeira e por sua disponibilidade em ajudar a mim e a todos e fazê-lo com a maior competência.

À Fernanda Rezende, técnica do LAMAL, por sua contribuição essencial nos cultivos de oocinetos e por agüentar com bom humor minhas “invenções de moda”.

Aos técnicos do insetário Thiago Xavier, Walison Eustáquio e Bruno Rocha, que literalmente suaram, para garantir que tudo corresse bem com os experimentos envolvendo *Aedes fluviatilis*.

À Tatiana, técnica do Laboratório de Entomologia Médica, por sua preciosa ajuda com os experimentos de microscopia confocal e por sua simpatia, que transformava o trabalho em descontração.

À equipe da biblioteca do Centro de Pesquisas René Rachou, pelo suporte para o acesso a diversos artigos científicos que enriqueceram, em muito, este trabalho.

À banca examinadora, por aceitar o convite e pelas contribuições.

Aos amigos e amigas, pelo suporte em todas as horas.

À Sílvia, pelo apoio incondicional, pela paciência, pelo carinho, pelos sábados de “trabalho voluntário” no insetário, por sempre acreditar em mim e pela convivência de pura harmonia, uma fonte inesgotável de felicidade.

À minha família. Às minhas queridas irmãs por todo o carinho e bajulação que um caçula pode querer. Aos meus sobrinhos e sobrinhas, pelas alegrias que trazem. À Alice e Marina, pelo companheirismo fraterno. Ao tio Luiz e à tia Mônica pela atenção especial. Ao meu pai pelo exemplo. E um obrigado especial à minha mãe, por sua dedicação supra-humana e todo o esforço que fez e faz para me ver feliz.

À FAPEMIG e ao Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR/FIOCRUZ, pelos recursos financeiros que viabilizaram o desenvolvimento deste Projeto.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE GRÁFICOS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 MALÁRIA.....	16
1.2 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA ATUAL.....	16
1.2.1 No Mundo.....	16
1.2.2 No Brasil.....	17
1.3 CICLO DE VIDA DOS PLASMÓDIOS .....	18
1.3.1 Hospedeiro Vertebrado.....	18
1.3.2 Hospedeiro Invertebrado.....	20
1.4 ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO NO VETOR .....	23
1.4.1 Vacinas de Bloqueio de Transmissão.....	23
1.5 PROTEÍNAS DE <i>PLASMODIUM</i> RELACIONADAS À INVASÃO EPITELIAL .....	24
1.5.1 WARP (von Willebrand Factor A Domain Related Protein) .....	26
1.6 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM GAMETÓCITOS .....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 PARASITOS .....	34
4.1.1 <i>Plasmodium falciparum</i> .....	34
4.1.2 <i>Plasmodium gallinaceum</i> .....	34
4.2 COLÔNIA DE <i>Aedes fluviatilis</i> .....	34
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> .....	35
4.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE PF <sub>WARP</sub> E DE SEU DOMÍNIO, FATOR DO TIPO A DE VON WILLEBRAND (PF <sub>VWA</sub> ).....	35

4.4.1	Purificação dos produtos amplificados.....	37
4.5	CLONAGENS.....	37
4.5.1	Clonagem em vetor pCR2.1 TOPO .....	37
4.5.2	Clonagem em vetor pGEM-T easy.....	38
4.5.3	Subclonagem em vetor de expressão pET32 .....	38
4.5.3.1	Digestão com enzimas de restrição.....	38
4.5.3.2	Purificação dos produtos amplificados.....	38
4.5.3.3	Ligação com a enzima T4 DNA ligase .....	39
4.5.4	Preparo de bactérias <i>E. coli</i> competentes .....	39
4.5.5	Transformação de <i>E. coli</i> competentes.....	40
4.5.6	Extração de DNA plasmidial (MINIPREPs) de <i>E. coli</i> transformadas .....	40
4.5.7	PCR de colônias de <i>E. coli</i> .....	41
4.5.8	Gel de agarose.....	41
4.5.9	Predição das estruturas primárias das proteínas recombinantes .....	42
4.6	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	42
4.6.1	Indução da expressão das proteínas recombinantes .....	42
4.6.2	Análise da solubilidade das proteínas recombinantes .....	43
4.6.3	Gel de poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol (SDS-PAGE).....	43
4.7	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	44
4.7.1	Tratamento com solução desnaturante Uréia 8M .....	44
4.7.2	Cromatografia de afinidade em coluna (Ni-NTA) .....	44
4.7.3	Dosagem das frações cromatográficas.....	45
4.8	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS .....	45
4.9	ELISA.....	45
4.10	CULTIVO DE OOCINETOS E DEMAIS FORMAS SEXUAIS DE <i>P. GALLINACEUM</i> .....	46
4.11	WESTERN BLOT DE OOCINETOS CULTIVADOS .....	47
4.12	MICROSCOPIA DE OOCINETOS CULTIVADOS .....	48
4.12.1	Imunofluorescência .....	48
4.12.2	Microscopia Confocal.....	49
4.13	RT-PCR .....	50
4.13.1	Genes estudados .....	50
4.13.2	Busca por ortólogos em <i>Plasmodium gallinaceum</i> .....	50
4.13.3	Desenho de iniciadores.....	51
4.13.4	Amostras .....	51
4.13.4.1	Sangue de aves infectadas.....	51
4.13.4.2	Mosquitos <i>Aedes fluviatilis</i> infectados .....	51
4.13.5	Extração do RNA total das amostras .....	52
4.13.5.1	Dosagem do RNA.....	53
4.13.5.2	Tratamento com DNase .....	53

4.13.5.3	Síntese do cDNA .....	53
4.13.6	Extração do DNA genômico de <i>P. gallinaceum</i> .....	54
4.13.7	Amplificação por PCR e RT-PCR .....	54
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
5.1	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA PFWARP E DE SEU DOMÍNIO VWA .....	56
5.1.1	Clonagem em vetores TA dos fragmentos amplificados .....	56
5.1.2	Sub-clonagem dos insertos em pET32 .....	57
5.1.2.1	Digestão dos fragmentos .....	57
5.1.2.2	Transformações .....	58
5.2	PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	59
5.2.1	Estruturas primárias e pesos moleculares .....	59
5.2.2	Expressão .....	60
5.2.3	Solubilidade .....	61
5.2.4	Purificação .....	62
5.2.5	Dosagem .....	63
5.2.6	Produção de anticorpos policlonais .....	64
5.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE WARP EM FORMAS SEXUAIS DE <i>P. GALLINACEUM</i> .....	65
5.3.1	Cultivo de oocinetos de <i>P. gallinaceum</i> .....	65
5.3.2	Imunofluorescência de oocinetos maduros .....	67
5.3.3	Western Blot de extratos de oocinetos maduros .....	68
5.3.4	Microscopia confocal de formas sexuais .....	69
5.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MRNAs DE GENES DE <i>P. GALLINACEUM</i> .....	72
5.4.1	Identificação de genes no genoma de <i>P. gallinaceum</i> .....	72
5.4.2	Desenho de pares de iniciadores para genes de <i>P. gallinaceum</i> .....	73
5.4.3	Amplificação a partir do DNA genômico de <i>P. gallinaceum</i> .....	74
5.4.4	Amplificação a partir dos cDNAs de mosquitos infectados .....	75
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>78</b>
6.1	A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA WARP EM OOCINETOS MADUROS .....	78
6.2	A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA WARP EM ZIGOTOS E EM OOCINETOS IMATUROS ....	80
6.3	A FUNÇÃO DA PROTEÍNA WARP .....	81
6.4	REGULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL – INFERÊNCIAS SOBRE <i>P. GALLINACEUM</i> .....	83
6.5	IDENTIFICAÇÃO DE GENES EM <i>P. GALLINACEUM</i> .....	85
6.6	CINÉTICA DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DE <i>P. GALLINACEUM</i> .....	87

6.7	WARP E VACINAS BLOQUEADORAS DE TRANSMISSÃO .....	90
7.	CONCLUSÕES .....	91
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	93
9.	REFERÊNCIAS .....	95
	ANEXOS .....	101

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição global do risco de transmissão da malária. ....	17
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> . ....	18
<b>Figura 3:</b> Desenvolvimento sexual de <i>Plasmodium</i> . ....	22
<b>Figura 4:</b> Alinhamento da proteína WARP de 6 espécies do gênero <i>Plasmodium</i> sp. ....	28
<b>Figura 5:</b> Desenho esquemático dos domínios formadores das proteínas WARP (von Willebrand adhesive domain-related protein), CTRP ( <i>Circumsporozoite and TRAP-related protein</i> ) e TRAP (Trombospondin-related adhesive protein) de <i>Plasmodium berguei</i> . ....	29
<b>Figura 6:</b> Pares de iniciadores para a amplificação de PfWARP e de seu domínio vWA. ...	36
<b>Figura 7:</b> Amplificação da região codificadora de Pfwarp e de seu domínio A de von Willebrand em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo. ....	56
<b>Figura 8:</b> PCR de colônias em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo de Células TOP 10 contendo o vetor pGEM-T easy recombinante. ....	57
<b>Figura 9:</b> PCR de colônias em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo de Células TOP 10 contendo o vetor pCR 2.1 TOPO recombinante. ....	57
<b>Figura 10:</b> Visualização em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo da digestão dos vetores pET32, pGEM-T easy recombinante e pCR2.1 TOPO recombinante por <i>KpnI</i> e <i>BamHI</i> . ....	58
<b>Figura 11:</b> Visualização em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo do PCR de colônias de TOP10 contendo o vetor recombinante pET32. ....	59
<b>Figura 12:</b> Visualização em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo de PCR de colônias de Origami <sup>TM</sup> (DE3)pLysS ou BL21(DE3)pLysS contendo o vetor recombinante pET32. ....	59
<b>Figura 13:</b> Estruturas primárias preditas para as proteínas recombinantes produzidas, após indução por IPTG em cepas de <i>E. coli</i> , a partir das construções pET32/PfWARP e pET32/vWA. ....	60
<b>Figura 14:</b> Visualização em gel de poliacrilamida 10% corado por coomassie blue do perfil de proteínas na cultura de bactérias Origami <sup>TM</sup> (DE3)pLysS transformadas com pET32/PfWARP após indução da expressão de <i>PfWARP</i> pela adição de IPTG [1mM]. ....	61

<b>Figura 15:</b> Visualização em gel de poliacrilamida 12% corado por coomassie blue do perfil de proteínas na cultura de bactérias BL21(DE3)pLysS transformadas com pET32/vWA após indução da expressão de vWAr pela adição de IPTG [1mM].	61
<b>Figura 16:</b> Visualização em géis de poliacrilamida 10 e 12% dos perfis proteicos das frações solúveis e insolúveis de culturas de OrigamiTM(DE3)pLysS transformada por pET32/PfWARP ou BI21(DE3)pLysS transformada por pET32/vWA.	62
<b>Figura 17:</b> Visualização em gel de poliacrilamida 10% corado com coomassie blue das frações resultantes da purificação da proteína recombinante PfWARP através de cromatografia de afinidade (resina de níquel).	63
<b>Figura 18:</b> Visualização em gel de poliacrilamida 12% corado com coomassie blue das frações resultantes da purificação da proteína recombinante vWAr através de cromatografia de afinidade (resina de níquel).	63
<b>Figura 19:</b> Exflagelação de microgametócito.	65
<b>Figura 20:</b> Zigotos. Células resultantes da fecundação.	66
<b>Figura 21:</b> Cultura de oocinetos de <i>Plasmodium gallinaceum</i> . Formas encontradas após 22 horas de incubação.	67
<b>Figura 22:</b> Imunofluorescência de oocinetos maduros de <i>P. gallinaceum</i> .	67
<b>Figura 23:</b> Imunofluorescência de parasitos não maduros encontrados em cultura após 22 horas.	68
<b>Figura 24:</b> Western Blot usando soro policlonal anti-vWAr 1:500.	69
<b>Figura 25:</b> Microscopia Confocal de oocinetos plenamente desenvolvidos.	70
<b>Figura 26:</b> Microscopia Confocal de parasitos em formas intermediárias de desenvolvimento.	71
<b>Figura 27:</b> Microscopia Confocal de parasitos com morfologia esférica após 22 horas de cultivo.	71
<b>Figura 28:</b> Microscopia Confocal de zigotos coletados a 0 hora do cultivo.	72
<b>Figura 29:</b> PCR de genes a partir do DNA genômico de <i>Plasmodium gallinaceum</i> .	75
<b>Figura 30:</b> Cinética da expressão de mRNAs de genes de <i>P. gallinaceum</i> por RT-PCR.	76
<b>Figura 31:</b> Cinética da expressão de mRNAs de genes de <i>P. gallinaceum</i> por RT-PCR.	77

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Temperaturas de anelamento dos pares de iniciadores para amplificação de genes de *P. gallinaceum* ..... 55

**Tabela 2:** Concentrações das frações e pools das proteínas recombinantes *PfWARPr* e *vWAR* após separação cromatografica obtidas pelo método colorimétrico de Bradford. .... 64

**Tabela 3:** Lista dos identificadores do PlasmoDB para os genes ortólogos em *P. falciparum* e *P. berghei*. ..... 73

**Tabela 4:** Pares de iniciadores para genes de *P. gallinaceum* ..... 74

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** ELISA de diferentes diluições dos soros imunes e pré-imunes dos 4 coelhos imunizados com as proteínas recombinantes *PfWARPr* e *vWAR*. ..... 65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA	– Albumina Bovina Sérica
CDC	– Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	– DNA complementar
CeLTOS	– Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites
CSP	– Circumsporozoite Protein
CTRP	– Circumsporozoite protein and TRAP Related Protein
DAB	– 3,3' Diaminobenzidina
DEPC	– Dietil pirocarbonato
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
dNTP	– Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DOZI	– Development of Zygote Inhibited
DTT	– Ditioneitol
EDTA	– Ácido etilendiamino tetracético
EEFs	– Exoerythrocytic Forms
EGF	– Epidermal Growth Factor
ELISA	– Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	– Retículo Endoplasmático Rugoso
FITC	– Isotiocianato de Fluoresceína
GPI	– Glicofosfatidilinositol
IPTG	– Isopropil $\beta$ -D-Tiogalactopiranosídeo
kDa	– Kilo Dáltons
LB	– Luria-Bertani broth
MAOP	– Membrane Attack Ookinete Protein
MIDAS	– Motivo de Adesão Dependente de Íons Metálicos
mRNA	– Ácido ribonucléico mensageiro
Ni-NTA	– Resina de ácido nitrilotriacético com níquel
O.D.	– Densidade Óptica
PAGE	– Eletroforese de proteína em gel de acrilamida
Pb28	– Proteína P28 de <i>Plasmodium berghei</i>
PbDOZI	– Proteína DOZI de <i>Plasmodium berghei</i>
PBS	– Tampão Fosfato Salina
PBST	– Tampão Fosfato Salina contendo Tween
PbWARP	– Proteína WARP de <i>Plasmodium berghei</i>
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
Pf_vWA	– Domínio vWA da proteína WARP de <i>Plasmodium falciparum</i>

PfWARP	– Proteína WARP de <i>Plasmodium falciparum</i>
Pg25	– Proteína P25 de <i>Plasmodium gallinaceum</i>
Pg28	– Proteína P28 de <i>Plasmodium gallinaceum</i>
PgCTR	– Proteína CTRP de <i>Plasmodium gallinaceum</i>
PgDOZI	– Proteína DOZI de <i>Plasmodium gallinaceum</i>
PgQuitinase	– Proteína Quitinase de <i>Plasmodium gallinaceum</i>
PgWARP	– Proteína WARP de <i>Plasmodium gallinaceum</i>
PMSF	– fluoreto de metilfenilsulfonil
PPLP5	– Plasmodium Perforin-Like Protein 5
RNA	– Ácido ribonucléico
rRNA	– Ácido ribonucléico ribossomal
RT	– Transcriptase Reversa
RT-PCR	– Reação em cadeia da polimerase conjugada com a transcriptase reversa
SDS	– Dodecil Sulfato de Sódio
SOAP	– Secreted Ookinete Adhesive Protein
TAE	– Tampão Tris Acetato EDTA
TDR	– Tropical Disease Research
TEMED	– N,N,N,N Tetrametil etilenodiamina
TRAP	– Thrombospondin Related Adhesive Protein
UTR	– Região não traduzida
vWA	– Domínio do Fator A de von Willebrand
WARP	– von Willebrand Factor A Domain Related Protein
WHO	– World Health Organization

## RESUMO

Durante o ciclo de vida dos parasitos causadores da malária, uma das fases cruciais é o desenvolvimento sexual e a conseqüente invasão do epitélio intestinal do hospedeiro invertebrado. Proteínas dos estágios do ciclo esporogônico podem ser alvos para vacinas Bloqueadoras de Transmissão (TBVs). Uma das proteínas micronemais que já demonstrou ser um alvo promissor para a inibição do desenvolvimento de oocistos e, portanto, da transmissão, é a WARP (von Willebrand Factor A Domain Related Protein), uma proteína secretada, aparentemente envolvida com a adesão e locomoção dos parasitos. Estudos recentes demonstraram que WARP é sujeita à repressão traducional em macrogametócitos de *P. berghei*, com o seu mRNA sendo silenciado pela proteína DOZI através da formação de uma ribonucleoproteína. Os objetivos deste estudo foram i) Analisar o perfil de expressão da proteína WARP nos estágios sexuais de *P. gallinaceum*, ii) Comparar o perfil de transcrição de WARP, durante o desenvolvimento sexual, com perfis de alguns genes relacionados à regulação da expressão ou à invasão epitelial, e iii) Avaliar o potencial da proteína WARP como um candidato à vacina através da análise do seu padrão de expressão. O domínio vWA de PfWARP foi produzido como uma proteína recombinante que foi usada para a produção de anticorpos policlonais. Foram realizados experimentos de microscopia confocal usando estes anticorpos para se detectar WARP em estágios sexuais cultivados de *P. gallinaceum*. RT-PCR foi usada para detectar WARP e os outros genes estudados a partir de amostras de sangue contendo gametócitos e a partir de intestinos de *Aedes fluviatilis* infectados, coletados até 24 horas após a alimentação. A proteína WARP pode ser detectada desde os estágios iniciais do desenvolvimento de oocinetos, em zigotos recém-fertilizados, até as formas maduras alongadas. Em zigotos, sua expressão parece ser intra-vesicular e localizada na periferia citoplasmática, próxima à membrana celular, e em oocinetos maduros, WARP apresenta uma distribuição granular com concentração focal na região apical, corroborando sua localização micronemal. Seu transcrito foi detectado, por RT-PCR, em gametócitos de *P. gallinaceum*. Ainda, o transcrito para a proteína PgDOZI também foi detectado em gametócitos, indicando que a repressão traducional possa ser um mecanismo de regulação gênica também nesta espécie, e que WARP seja, provavelmente, um de seus alvos de regulação. Esta é a primeira vez que a proteína WARP é detectada tão prematuramente durante o desenvolvimento de oocinetos e a primeira evidência de expressão dos genes DOZI,  $\alpha$ -Tubulina e MAOP em *P. gallinaceum*.

## ABSTRACT

During the life cycle of malaria parasites, one of the most crucial phases is the sexual development and the consequential midgut invasion of the invertebrate host. Proteins from stages of sporogonic cycle could be target for Transmission Blocking Vaccines (TBVs). One of the micronemal proteins that has already been shown as a promising target for inhibiting oocysts development, and therefore transmission, is the von Willebrand Factor A Related Protein (WARP), a secreted ookinete protein thought to be involved in parasite adhesion and locomotion. Recent studies have demonstrated that WARP is subjected to repressed translation in macrogametocytes of *P. berghei*, with its mRNA being silenced by the DOZI protein through the formation of a ribonucleoprotein. The goals of this study were i) to analyze the expression profile of the WARP protein during sexual stages of *P. gallinaceum*, ii) to compare WARP's transcription profile, during sexual development, with other genes involved in regulation of expression or midgut invasion, and iii) to evaluate the potential deployment of the WARP protein as a vaccine candidate based on its expression pattern. The vWA domain from PfWARP was produced as a recombinant protein that was used to raise polyclonal antibodies. Confocal microscopy was carried out using these antibodies to detect WARP in cultured *Plasmodium gallinaceum* sexual stages. RT-PCR was used to detect WARP and the other studied genes from samples of blood containing gametocytes and from infected midguts of *Aedes fluviatilis* mosquitoes up to 24 hours post feeding. The WARP protein can be detected since the early stages of ookinete development, in newly fertilized zygotes, up to the mature palmate-shaped forms. In zygotes it appears to have an intra-vesicular expression and to be located in the cytoplasm's periphery in close proximity to the cellular membrane, and in the mature ookinetes, WARP presents an intracellular granular distribution with focal concentration towards the apical end, corroborating its micronemal localization. Its transcript was detected in *P. gallinaceum* gametocytes by using RT-PCR. Also, the transcript for the PgDOZI protein was detected in gametocytes, indicating that repressed translation might be a gene expression regulating mechanism for this species also, and that WARP might be one of the targets. This is the first time that the protein WARP is detected so early in ookinete development, and it is the first evidence for the expression of DOZI,  $\alpha$ -Tubulin and MAOP in *P. gallinaceum*.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Malária

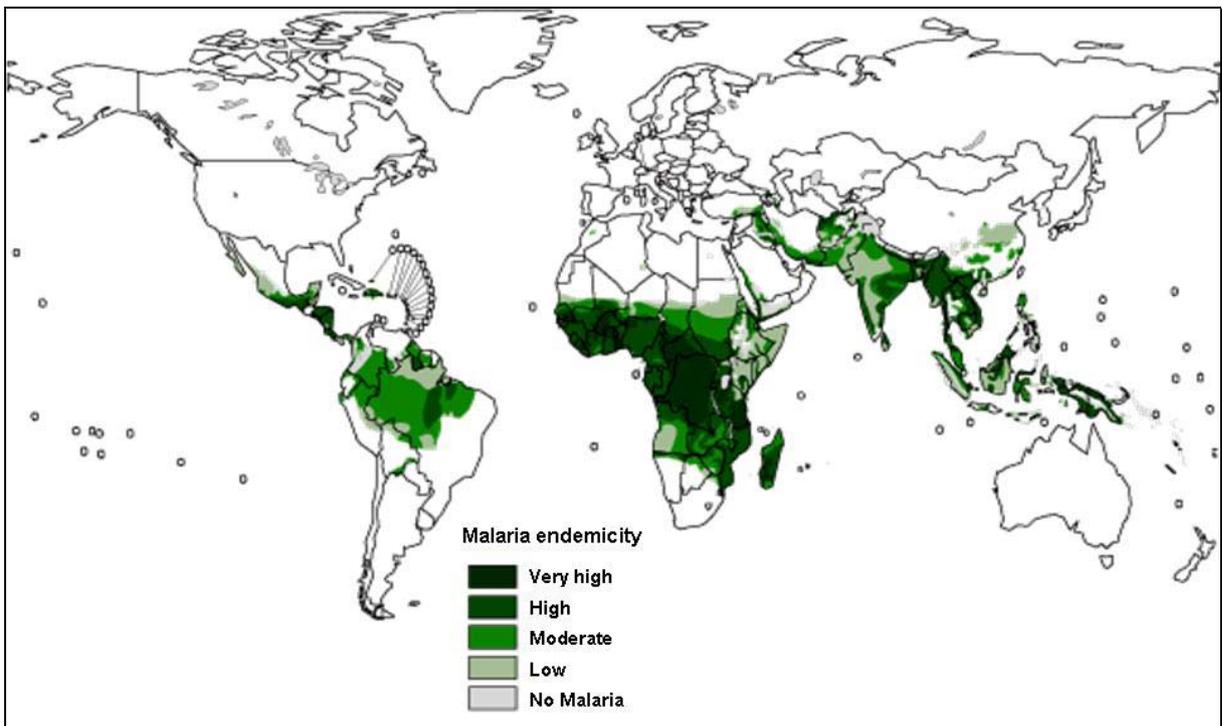
A malária é uma doença parasitária que aflige a humanidade há milhares de anos. Ela é causada pelo parasitismo de um protozoário pertencente ao gênero *Plasmodium* que é transmitido ao homem através da picada de fêmeas de culicídeo pertencente ao gênero *Anopheles* (Sherman, 1998).

São quatro as principais espécies causadoras da malária humana: *Plasmodium ovale*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo as duas últimas responsáveis pela maior parte das infecções. O *P. vivax* é a espécie com a mais ampla distribuição territorial, mas os casos mais severos e potencialmente fatais são causados pela infecção por *P. falciparum* (CDC, 2004).

## 1.2 Situação epidemiológica atual

### 1.2.1 No Mundo

Atualmente, a malária é a doença tropical de maior impacto na saúde humana, sendo estimados de 300 a 500 milhões de casos agudos por ano e um mínimo de 1,5 milhões de mortes anuais. Além dos óbvios danos à saúde humana, a doença também causa sérios prejuízos econômicos, calculados em uma perda média de 1,3% no crescimento econômico de países com taxas de transmissão intensas (WHO, 2005). Aproximadamente, 40% da população mundial vive em áreas de risco localizadas em 107 países ou territórios considerados endêmicos (Figura 1) (Sherman, 1998).



**Figura 1:** Distribuição global do risco de transmissão da malária. Fonte: Adaptado de WHO (<http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>)

A África é o continente mais atingido e concentra a grande maioria (90%) dos casos fatais, que acometem, principalmente, crianças menores de 5 anos. Não coincidentemente, é na África que estão concentrados os casos mais graves, causados pela infecção por *P. falciparum*. Neste continente, a doença representa um entrave ao desenvolvimento social e econômico, e estima-se que os prejuízos causados cheguem a U\$12 bilhões por ano (WHO, 2005).

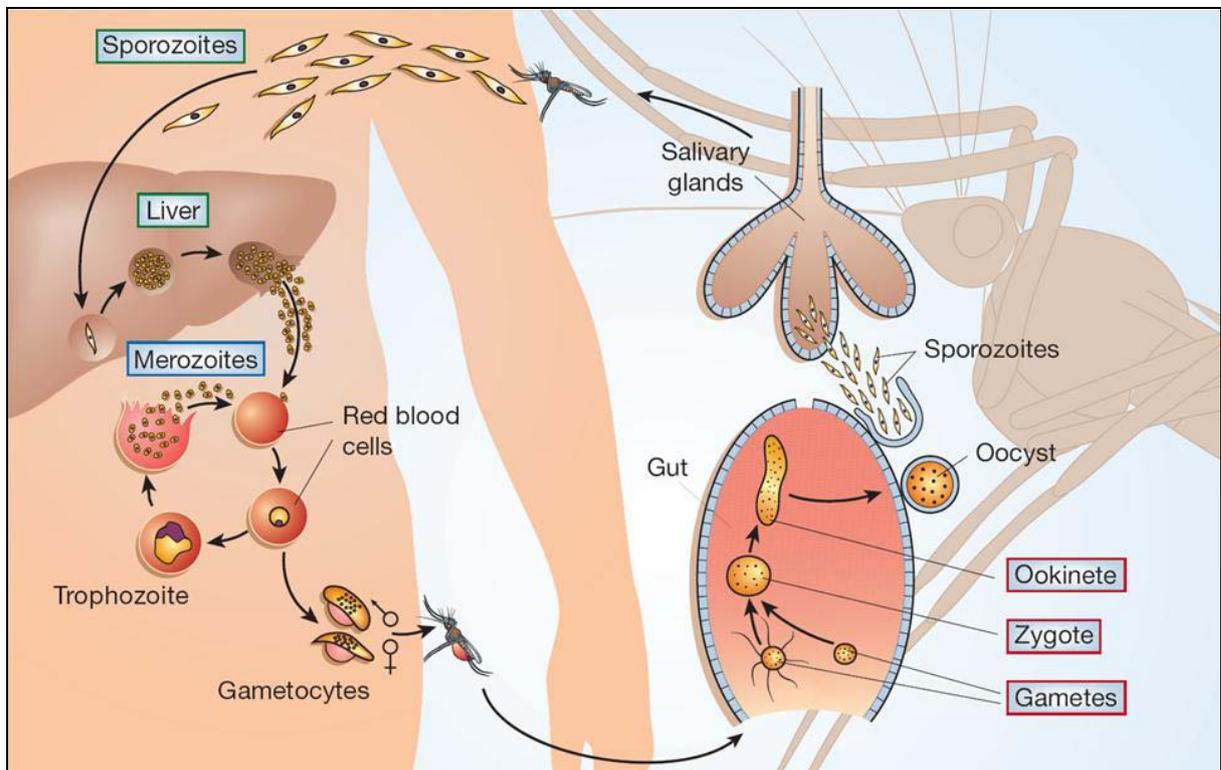
### 1.2.2 No Brasil

Atualmente no Brasil, a malária é endêmica na região da Amazônia Legal onde as atividades desenvolvimentistas sem planejamento colocaram o homem em íntimo contato com o vetor da doença. Existem ainda surtos esporádicos nas demais regiões do país. Em 2006 foram registrados cerca de 540.000 casos de malária no Brasil, sendo a maioria causada por *Plasmodium vivax* (~73%), enquanto o *Plasmodium falciparum* foi responsável por, aproximadamente, um quarto dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), acompanhando a tendência de aumento da proporção de casos por *P. falciparum* observada desde 1999 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

### 1.3 Ciclo de vida dos plasmódios

Os parasitos causadores da malária apresentam um ciclo de vida heteroxênico, pois necessitam, obrigatoriamente, de dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado, sendo o último o hospedeiro definitivo, onde a fase sexual acontece. No caso da malária humana, os hospedeiros invertebrados são exclusivamente fêmeas de anofelinos.

Apesar de serem eucariotos unicelulares, uma multiplicidade de formas altamente especializadas e morfologicamente distintas, que se alternam entre formas invasoras e replicativas, são encontradas ao longo de seu desenvolvimento (Hall *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2:** Ciclo de vida do Plasmodium. Fonte: MENARD, 2005.

#### 1.3.1 Hospedeiro Vertebrado

O ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado tem início após a injeção de esporozoítos na derme do hospedeiro através da picada do anofelino fêmea infectado. Os esporozoítos infectantes movimentam-se erráticamente e interagem com as paredes dos vasos. Uma hora após a picada, aproximadamente a metade

dos parasitos injetados deixa a derme e invade vasos sanguíneos (~35%) ou linfáticos (~15%) (Amino *et al.*, 2006).

Os esporozoítos que entram na corrente sanguínea são levados pela circulação ao fígado, onde interagem e se ligam, através de suas duas principais proteínas de membrana, CSP e TRAP, a proteoglicanos da matriz extracelular expostos nas fenestrações do endotélio dos sinusóides hepáticos (Frevert *et al.*, 2005).

Os esporozoítos então deslizam sobre a parede luminal dos sinusóides até encontrarem uma célula de Kupfer, a qual invadem e atravessam dentro de um vacúolo não fusiogênico até atingirem o espaço de Disse (Frevert *et al.*, 2005). Uma vez dentro do parênquima hepático, os esporozoítos invadem e atravessam múltiplas células hepáticas até alcançarem um hepatócito final, onde se desenvolvem, dentro de um vacúolo parasitóforo, em formas replicativas exo-eritrocíticas (EEFs) (Mota *et al.*, 2001). O estabelecimento da infecção hepática dá origem a esquizontes multinucleados que, quando maduros, se diferenciam em milhares de merozoítos, as formas invasivas que parasitam as hemácias circulantes. Os esquizontes liberam, nos sinusóides hepáticos, vesículas provenientes dos hepatócitos infectados contendo até milhares de merozoítos. Estas vesículas foram denominadas merossomos e seriam um mecanismo de defesa para evitar a fagocitose de merozoítos assim que deixassem o fígado, aumentando assim as chances de invasão de eritrócitos e de sobrevivência dos parasitos (Sturm *et al.*, 2006).

O processo de ruptura de merossomos e liberação dos merozoítos ainda não é bem entendido, mas após atingirem a corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos circulantes. O processo de invasão é complexo e dependente de várias proteínas especializadas. Primeiramente, o merozoíto invasor reconhece o eritrócito e se liga a ele de maneira reversível, ocorre uma re-orientação do parasito que posiciona sua região apical em íntimo contato com a membrana eritrocítica e começa a ser formada a junção, irreversível, entre as células. Neste momento o conteúdo das roptrias e micronemas, organelas especializadas que participam da invasão, é liberado para a formação do vacúolo parasitóforo. A junção promove a internalização do parasito e finalmente as membranas são seladas e a invasão termina.

Os parasitos, chamados agora de trofozoítos jovens, começam a se desenvolver no interior das hemácias. Os anéis se desenvolvem em trofozoítos e

estes dão origem a esquizontes através de múltiplas divisões nucleares. Novos merozoítos são formados no interior dos esquizontes e são liberados pela ruptura destes, para darem início a uma nova rodada de invasões de eritrócitos, fechando o ciclo de reprodução assexuada eritrocítica característico de *Plasmodium* spp. (Miller *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que são os acontecimentos do ciclo eritrocítico e seu impacto sobre o organismo humano que causam as manifestações clínicas da doença (CDC, 2004).

Alguns merozoítos, após invadirem as células sanguíneas, ao invés de transformarem-se em esquizontes e perpetuarem o ciclo de reprodução assexual, passam por um desenvolvimento diferencial que resulta na formação de células sexuais especializadas na transição entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado (Talman *et al.*, 2004). Estas células são chamadas gametócitos e existem dois tipos, os microgametócitos e os macrogametócitos. Sua maturação é descrita em 5 estágios de desenvolvimento (Field e Shute, 1956), no início não podem ser diferenciados de trofozoítos jovens e a diferença entre micro e macrogametócitos só é perceptível a partir do terceiro estágio (Talman *et al.*, 2004).

São os gametócitos maduros, ou do quinto estágio, que são transferidos durante o repasto sanguíneo para as fêmeas dos mosquitos, iniciando então o ciclo sexual dos plasmódios.

### 1.3.2 Hospedeiro Invertebrado

A mudança drástica de ambientes entre o hospedeiro vertebrado e o invertebrado provoca a ativação dos gametócitos que imediatamente iniciam a gametogênese. Dois fatores são considerados os principais indutores das diferenciações nos gametócitos *in vivo* (Sinden, 1999), uma queda na temperatura do sangue de, no mínimo, 5°C e a presença de ácido xanturênico, um subproduto do metabolismo do triptofano (Billker *et al.*, 1998).

Na primeira hora após a alimentação, macrogametócitos escapam dos eritrócitos através de um processo que envolve a rápida desintegração do vacúolo parasitóforo e da membrana dos eritrócitos e dão origem a macrogametas férteis. Paralelamente, os microgametócitos também escapam das células vermelhas e após três rápidos e consecutivos ciclos de divisões nucleares acompanhados por

extremas mudanças morfológicas, dão origem a oito microgametas móveis denominados flagelos. Nos próximos trinta minutos ocorre a fecundação dos macrogametas e a formação do zigoto diplóide. Durante as próximas horas, o zigoto, uma célula de morfologia esférica, irá se transformar em um oocineto, uma célula alongada, com diferenciação antero-posterior e móvel. Esta metamorfose é amparada por uma reorganização do citoplasma, com o aparecimento de um complexo pelicular sob a membrana plasmática, a estruturação de um característico citoesqueleto e a formação de estruturas apicais típicas de formas invasivas. No caso dos oocinetos, é evidenciada a presença de micronemas, organelas vesiculares elétron-densas, formadas a partir do retículo endoplasmático rugoso (ER) e que se concentram na porção anterior da célula.(Sinden, 1999). Ao mesmo tempo, dentro do núcleo, ocorre a meiose, que confere ao oocineto um conteúdo genético igual a 4 vezes o genoma haplótipo (Janse *et al.*, 1987).

São os oocinetos maduros que se encarregam de invadir os tecidos do intestino do vetor e estabelecer, de fato, a infecção neste hospedeiro (Sinden e Bilingsley, 2001). Os oocinetos completam sua maturação ainda inseridos no bolo alimentar no intestino do mosquito, e para alcançarem o epitélio é preciso que cruzem a matriz peritrófica, uma membrana acelular que recobre o intestino médio abdominal e é constituída principalmente por quitina polimerizada (Barillas-Mury e Kumar, 2005). Após vencerem esta barreira os oocinetos entram em contato com as micro vilosidades das células epiteliais, através de moléculas adesivas que reconhecem carboidratos na superfície intestinal, deslizam rapidamente sobre o epitélio e finalmente o invadem (Zieler e Dvorak, 2000).

Muito pouco se conhece acerca dos detalhes do processo de invasão. Uma hipótese intitulada como modelo “bomba relógio” propõe que a rota de invasão tomada pelo oocineto envolve, obrigatoriamente, a invasão de células epiteliais (Han *et al.*, 2000), contrastando com idéias anteriores de uma possível rota intercelular (Meis *et al.*, 1989). Observações consistentes com este modelo já foram registradas com *P. berghei* invadindo *Anopheles stephensi* (Han *et al.*, 2000), *P. gallinaceum* em *Aedes aegypti* (Gupta *et al.*, 2005) e *P. falciparum* atravessando o epitélio de *Anopheles stephensi* (Baton *et al.*, 2004). A mesma hipótese preconiza que a penetração do oocineto ocorre nos pontos onde as membranas celulares apicais de células adjacentes se encontram, um fenômeno também observado em intestinos de *Anopheles stephensi* invadidos por *P. falciparum* (Baton *et al.*, 2004). As células invadidas entram em processo de apoptose, apresentando modificações estruturais



## 1.4 Estabelecimento da infecção no vetor

A sucessão de eventos que se inicia com a ingestão do sangue infectado pelo vetor, passa pelo desenvolvimento das formas sexuais e termina com a invasão dos tecidos e estabelecimento da infecção nos mosquitos, perfaz um dos momentos cruciais no ciclo de vida dos plasmódios (Figura 3). Nas 24 horas entre o repasto e a invasão epitelial, as várias barreiras ao seu desenvolvimento como componentes do sistema do complemento no sangue do vertebrado, proteases produzidas pelo mosquito e secretadas no lúmen intestinal, a matriz peritrófica e elementos do sistema imune do invertebrado (Barillas-Mury e Kumar, 2005), exercem um efeito gargalo capaz de reduzir drasticamente (em 5 ordens de magnitude) o número de parasitos viáveis (Sinden, 1999).

Uma importante consequência é a vulnerabilidade intrínseca desta etapa do ciclo, e as oportunidades que se apresentam para sua exploração em estratégias de combate à malária. Atualmente, existem duas principais linhas de pesquisa que abordam o estabelecimento da infecção vetorial como o ponto para a intervenção no ciclo; a criação de vetores transgênicos refratários à infecção (Anon, 1991) e o desenvolvimento de Vacinas Bloqueadoras da Transmissão (Saul, 2007).

### 1.4.1 Vacinas de Bloqueio de Transmissão

As vacinas que visam o bloqueio da transmissão podem se basear em antígenos dos próprios parasitos causadores da malária, ou antígenos específicos do mosquito vetor (Lavazec *et al.*, 2007).

As vacinas Bloqueadoras de Transmissão que utilizam antígenos do parasito agiram nas formas sexuais que se desenvolvem nos vetores, como gametas, zigotos e oocinetos, ou em antígenos do próprio mosquito, impedindo o desenvolvimento dos parasitos nos mosquitos e cortando o ciclo de transmissão da malária. São também chamadas de vacinas altruístas, pois não atuam diretamente sobre o indivíduo vacinado, uma vez que seus alvos se encontram dentro dos vetores, os quais são protegidos por imunização passiva através de anticorpos adquiridos durante o repasto sanguíneo (Carter *et al.*, 2000).

Estas vacinas apresentariam características biológicas que lhes concederiam uma vantagem teórica sobre as demais vacinas antimaláricas. Primeiramente, os antígenos alvos são expressos exclusivamente no interior do vetor, não existindo pressão seletiva do sistema imune humano, o que leva a um limitado nível de

polimorfismo antigênico (Niederwieser *et al.*, 2001). O mecanismo de ação parece ser predominantemente dependente de anticorpos, o que simplifica o desenvolvimento da vacina (Healer *et al.*, 1999). Devido ao tempo de exposição elevado aos anticorpos, os níveis séricos requeridos dos anticorpos bloqueadores seriam menores (Saul, 1987). E ainda, considerando-se que a transmissão de malária é altamente localizada, um número relativamente pequeno de vacinações poderia resultar em uma queda considerável das taxas de transmissão (Carter, 2002).

A maioria das Vacinas Bloqueadoras de Transmissão que estão sendo desenvolvidas atualmente tem como alvo proteínas exclusivas das fases sexuais de plasmódios. Existem 4 antígenos, descobertos há mais de 20 anos, que são tidos como os maiores alvos em potencial, eles são Pfs230, Pfs45/48, Pfs25 e Pfs28 (e seus ortólogos nas demais espécies). Porém, existem algumas proteínas identificadas mais recentemente como antígenos em potencial para vacinas bloqueadoras. Alguns exemplos são Quitinase, CTRP, WARP, SOAP e MAOP. A importância destas proteínas para a infectividade dos parasitos já foi demonstrada, mas sua utilidade em vacinas antimaláricas ainda não foi esclarecida (Saul, 2007).

Estas vacinas, quando empregadas em conjunto com outras vacinas ou drogas antimaláricas, poderiam prevenir o surgimento de formas resistentes às vacinas e drogas (TDR/WHO, 2000).

## 1.5 Proteínas de *Plasmodium* relacionadas à invasão epitelial

Os antígenos que demonstram um potencial para serem usados em vacinas de bloqueio têm sua função relacionada ao sucesso de alguma das etapas do desenvolvimento do parasito no vetor e, em sua grande maioria, estes antígenos estão envolvidos com a invasão do epitélio intestinal.

As duas proteínas da fase sexual do ciclo de vida de *Plasmodium* sp. mais amplamente estudadas são a P25 e a P28. Elas são antígenos de superfície encontrados em zigotos e oocinetos, que compartilham características estruturais e possuem ortólogos altamente conservados em outras espécies do gênero (Kumar e Carter, 1985). P25 e P28 são proteínas parálogas ancoradas à membrana através de âncoras-GPI e apresentam 4 domínios EGF (Epidermal Growth Factor) (Kaslow *et al.*, 1988). P25 é detectada 30 minutos após a fertilização (del Carmen Rodriguez *et al.*, 2000) e P28 começa a ser detectada após 3 horas (Blanco *et al.*, 1999).

Porém, transcritos para as duas proteínas podem ser detectados já em macrogametócitos circulantes no sangue do hospedeiro vertebrado (Paton *et al.*, 1993). O papel destas proteínas, apesar de não estar completamente esclarecido, parece estar relacionado tanto ao desenvolvimento de oocinetos, através de um papel de proteção, quanto à capacidade dos oocinetos em atravessar o epitélio intestinal e transformarem-se em oocistos (Tomas *et al.*, 2001).

As demais proteínas que participam da invasão epitelial dividem uma característica em comum, são direcionadas aos micronemas nos oocinetos. Os micronemas são organelas especializadas encontradas nas formas invasivas de *Plasmodium* e de outros organismos do filo Apicomplexa. De fato, os micronemas juntamente com outras organelas, fazem parte do complexo apical, uma estrutura complexa e única, da qual deriva o nome do filo. Os micronemas estariam envolvidos em reconhecimento da célula hospedeira, adesão e motilidade (Drubremetz *et al.*, 1998).

CTRP foi a primeira proteína micronemal a ser identificada (Trottein *et al.*, 1995). É uma proteína integral de membrana de alto peso molecular (>200kDa) que possui 6 domínios do tipo Integrina I (domínios do tipo A de von Willebrand) e 7 domínios do tipo Trombospondina em sua região extracelular (Yuda *et al.*, 1999). A presença destes domínios de adesão e experimentos de deleção gênica revelaram que CTRP seria essencial para os eventos de locomoção e invasão por parte de oocinetos maduros (Yuda *et al.*, 1999b e Dessens *et al.*, 1999).

Algumas das proteínas micronemais identificadas em oocinetos de *Plasmodium* spp. são solúveis e são provavelmente secretadas em um processo de exocitose do conteúdo dos micronemas (Drubremetz *et al.*, 1998). A primeira proteína micronemal solúvel a ser detectada foi uma quitinase (Huber *et al.*, 1991), cuja natureza micronemal foi confirmada em experimentos posteriores (Langer *et al.*, 2000). O papel desta quitinase seria causar a ruptura da matriz peritrófica e possibilitar a passagem do oocineto. Ensaio de alimentação artificial com anticorpos anti-quitinase inibiram o desenvolvimento de oocistos em vetores, demonstrando que esta proteína é um alvo potencial para vacinas de bloqueio de transmissão (Li *et al.*, 2004).

Em estudos mais recentes, novas proteínas micronemais com características exclusivas e reveladoras foram descritas. Em 2001, foi descrita a proteína WARP, que é solúvel e possui propriedades adesivas (WARP será melhor descrita posteriormente). Em 2003, foi descoberta a proteína SOAP, também com

propriedades adesivas, mas apresentando dois domínios ricos em cisteínas dispostos em uma estrutura única e, aparentemente, exclusiva ao gênero *Plasmodium*. A deleção de SOAP em *P. berghei* demonstrou que esta é uma proteína essencial à invasão epitelial e ao desenvolvimento de oocistos (Dessens *et al.*, 2003). Em 2004, foi descrita uma proteína de membrana que apresentava um domínio relacionado à atividade formadora de poros, apresentada por perforinas. Essa proteína foi chamada MAOP e pertence a uma família de proteínas de *Plasmodium* com 5 representantes. Oocinetos de *P. berghei knockout* para MAOP perderam completamente a infectividade, sendo capazes de se ligar ao epitélio intestinal mas incapazes de perfurá-lo (Kadota *et al.*, 2004). Outra proteína desta família, PPLP5 foi recentemente identificada em oocinetos de *P. berghei* (Ecker *et al.*, 2007). O mesmo grupo que descreveu MAOP, identificou em 2006, mais uma proteína micronemal de oocinetos relacionada à invasão epitelial. Porém, além de atuar na invasão do vetor, a proteína CeLTOS também atuaria na infecção do fígado por esporozoítos no hospedeiro vertebrado. A deleção de CeLTOS em *P. berghei* e análises por microscopia eletrônica indicaram que os oocinetos *knockout* rompem a membrana das células epiteliais, mas falham ao atravessá-la (Kariu *et al.*, 2006).

### 1.5.1 WARP (von Willebrand Factor A Domain Related Protein)

A proteína WARP foi primeiramente identificada em *Plasmodium berghei*. Os estudos demonstraram tratar-se de uma proteína micronemal de 303 aminoácidos, produzida pelo oocineto, e que seria, provavelmente, secretada (Yuda *et al.*, 2001). Ortólogos altamente conservados da proteína WARP foram identificados em *P. falciparum*, *P. gallinaceum*, *P. yoelli*, *P. vivax*, *P. knowlesi* (Figura 4) (Li *et al.*, 2004).

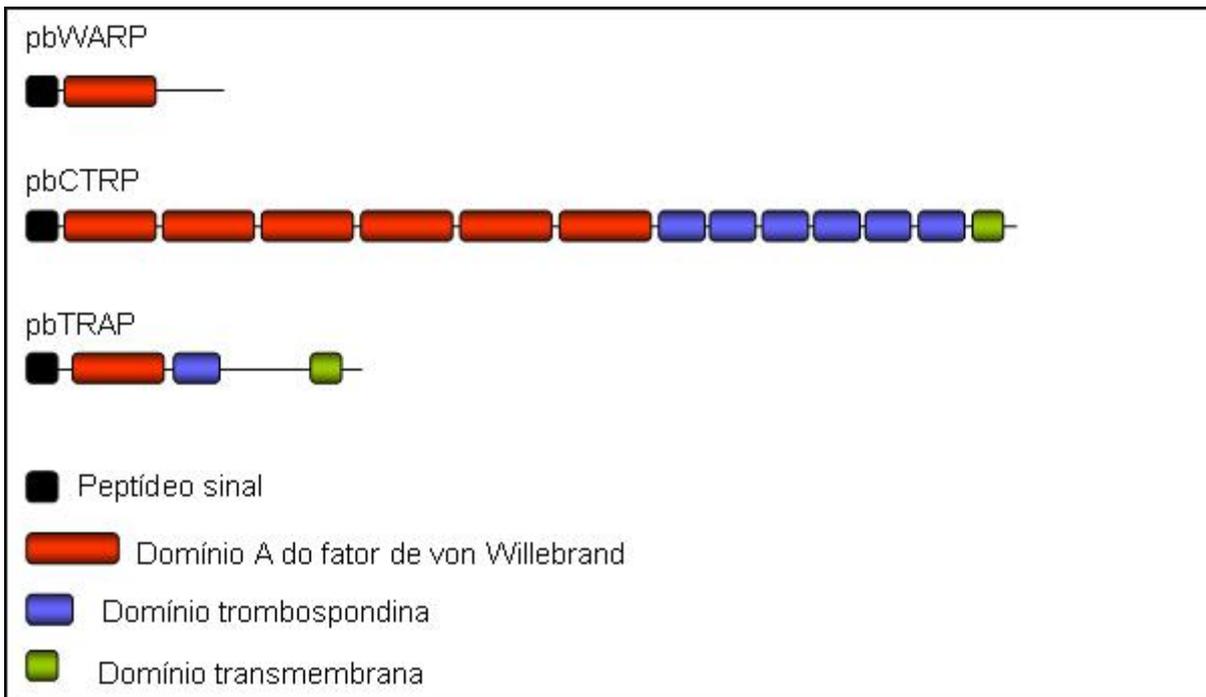
A principal característica da WARP é a presença de um domínio do tipo A do Fator von Willebrand (vWA), encontrado em proteínas de diversos organismos que participam na formação da matriz extracelular e em interações célula-célula e matriz-célula (Yuda *et al.*, 2001). A conformação espacial assumida por este domínio é denominado  $\alpha/\beta$  “Rossmann fold” e a maioria dos domínios do tipo A possui um motivo de adesão dependente de íons metálicos (MIDAS) (Lee *et al.*, 1995) e na proteína WARP este sítio encontra-se parcialmente conservado (Yuda *et al.*, 2001). Em alguns organismos do gênero *Plasmodium*, este domínio está presente em mais duas proteínas micronemais, CTRP e TRAP (Figura 5) (Li *et al.*, 2004), que estão

implicadas em processos de invasão celular do epitélio intestinal (Yuda *et al.*, 1999) e das glândulas salivares (Wengelnik *et al.*, 1999), respectivamente.

O potencial papel de WARP como um alvo para vacinas de bloqueio de transmissão foi demonstrado por ensaios com anticorpos anti-WARP. A contagem de oocistos em mosquitos alimentados com sangue infectado na presença de anticorpos anti-WARP foi significativamente menor que o observado nos grupos controle, alimentados apenas com sangue infectado. Este resultado foi obtido também em mosquitos da espécie *Anopheles stephensi* infectados por *P. berghei* (Abraham *et al.*, 2004), para *A. gambiae* infectados por *P. falciparum* e para *Aedes aegypti* infectados por *P. gallinaceum* (Li *et al.*, 2004). A redução no número de oocistos de *P. gallinaceum* foi obtida com o uso de anticorpos anti-WARP de *P. falciparum*, demonstrando mais uma vez o alto grau de conservação interespecífica desta proteína (Li *et al.*, 2004).

PfWARP	MKSLKVVLCGLMISACMLVGTYGRMNVVSHNS-MKKVGEE-GKDEKIISCVVEYVIKGD	58
PgWARP	MKDIRMISYLMLLSFFAISTYEKLVNVISSS-VSRLNDEK-RNEKVITCVVEYIIRGDM	58
PbWARP	MKSVKGITYIFFSLAFISICMCQKVVVSHNV-TPRVD----SDEKLITCVTEYIIKGD	55
PyWARP	MKSVKGITYIFFSLASISICMCQINNVVSHNV-IPRVD----SDENLITCVTEYIIKGD	55
PvWARP	MKGAAVSCLTLLLLALVHNSVSAKINLVSHNS-VPRIGGEGSDEKVITCVTKYVIKGD	59
PkWARP	MKGARVVSCLTLLLLAYVQSSVSAKMNVASNNASVPRIDGEDGSDEKVITCVTKYVIKGD	60
consensus/85%	** . : : : : . . : * : * . : : . : * : * : * : * : * : * : *	
	MKsh+hl.hhhh..u.h..sh.tphNlhSpss.h.+ls....psEplIoCvscYlI+GDh	
PfWARP	SIDDGDFCDSNSICSNNPGL--CDNGQ----VVVPGDYCSNYYDITLVVESSSFVQKDY	111
PgWARP	EIDNLFCENETSS-----CSPSSSEA----GSGDYCDNYYDITLIVESSNFVQKDY	106
PbWARP	GIDGGFCDSINSINLPP--TESCNGGSEKPEGPTPGNYCDNYYDITLVVENSSSFVQKDY	113
PyWARP	GIDGGFCDSINTIPP-PPEPCN-SIPEKPEGPLGNYYDITLIVENSSSFIQKDY	113
PvWARP	EIDGGFCNSNIGSQPPGSC-----TDGGASPGNYCDNYYDISLVVESSSFVQKDY	113
PkWARP	EIDGGFCSSNIGSE--PPGSSCN-----DTGANPGNYCDNYYDITLVVESSSFIQKDY	112
consensus/85%	***.***. . . . . *;***.*****;*;***;*;***	
	tIDDS.FCpsp..s.....s.GsYCsNYYDIoLlVESSsFlQKDY	
PfWARP	WLKGTIPFLESMVFNNSVSKDKAHMSVVLFAKQRVVVPFTDESSQDKNMLLEKINSIDE	171
PgWARP	WIKGTIPFLESMIRNVRVSKDKAHMSIILFDRDQRLVLPFTDEISQDKQKLIKVKGIN	166
PbWARP	WMKGTIPFLESMARNARVSKDKAHMSIILFAGTQNLVLPFTDEISQDKKLIKIRTLDD	173
PyWARP	WMKGTIPFLESMVRNARVSKDKAHMSIILFAGRQDLVLPFTDELSQDKKLIKIRTLND	173
PvWARP	WQKGTIPFLESMVRNARVSKDKAHMSVVLFAKQRVVVPFTDEASQDKKLIERVRAIDD	173
PkWARP	WKKGTIPFLESMVRNARVSKDKAHMSIVLFARDSRVVLPFTDELSQDKKLIKERVRAIND	172
consensus/85%	* ***** * .*****:*** :***** ***** *::: . : :	
	W.KGTIPFLESMhhNspVSKDKAHMullLFstp.pllVPFTDE.SQDKphLl-+lpsls-	
PfWARP	GIATSSITLYVNALKYAIENVI FGDGTRKDAPKVAVLFYFGDYGANKNMPDVVQTYKE	231
PgWARP	-VARGPITLYVYALEYALENVI FGDGTRSDAPKVAVLFYFGDYGANKSLIPDIVEDYKE	225
PbWARP	-AGTDSNTLYVYALEYAFEKVI FEGGTRSDAPKIAVLFYFGDYGANKSLIPDVVEDYKQ	232
PyWARP	-AATDSNTLYVYALEYAFEKVI FEGGTRSDAPKVAVLFYFGDYGANKSLIPDVVEDYKQ	232
PvWARP	-VGTREPTLYVYALEHTLEHVI FEGGTRKDAPKVAVLFYFGDYGANKSLIPDVVEDYRE	232
PkWARP	-VATSPITLYVYALEHAFEHVI FEGGTRKDAPKVAVLFYFGDYGANKSLIPDVVEDYK	231
consensus/85%	. . . . . *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *::: *	
	.huptssTLYs.AlcashEpVIFG-GTRpDAPKlsVLFYFGaDYGuNpshIPdlVpsY+p	
PfWARP	QNVKLIIVGIALGIRDNAYLLADCSIGDENCNVVFKPWDFVI PAAADVQKICDKNKS-	290
PgWARP	NNIKLIIVGIGLGNKDNDAYLLADCSIDDNNCANVIFKPWFDFVI PAAEQVNERICNKNKSK	285
PbWARP	SNIKLIIVGIGLTLRENALLADCK-SEGDCQNAIFQPWFDFVI PAAEQVNERICNKNKNS	291
PyWARP	NNIKLIIVGIALGNKQNAIFILADCK-SDGDCPNLILEPWDFVIRAAEQVNERICNKNKNS	291
PvWARP	RNVKLIIVGIALGNRDNDAYLLGGCAIGDQNCANVIFKPWFDFVI PAAAEVNERICSKGDS-	291
PkWARP	KNIKLIIVGIALGNRDNDAYLLGGCAIGDNNCANVIFKPWFDFVI PAAAEVNERICNKDDPA	291
consensus/85%	*:*:*:*:* * ::* :*..* . : : * * : : * : * : * : * : * : * : * : *	
	pNlKLIIVGIuLs.+pNAhlLusCt.s-tsC.NhlhpPWdAVI.AAtpVgt-ICsKsp..	
PfWARP	-----	
PgWARP	GKSSMIQKVYK 297	
PbWARP	SLTSERKTTIKN 303	
PyWARP	SLTPESKTMIKN 303	
PvWARP	-----	
PkWARP	STN----- 294	

**Figura 4:** Alinhamento da proteína WARP de 6 espécies do gênero *Plasmodium* sp. Asteriscos indicam aminoácidos idênticos, dois pontos indicam aminoácidos altamente conservados e um ponto indica os pouco conservados. Abaixo do alinhamento é mostrada uma sequência consenso com os aminoácidos conservados em letras maiúsculas e demais aminoácidos indicados por letras minúsculas (s: cadeias laterais pequenas; a: aromáticos; p: polares; h: hidrofóbicos; l: alifáticos; c: cadeias laterais carregadas; +: básicos; u: cadeias laterais muito pequenas). Acima do alinhamento os asteriscos indicam as 7 cisteínas conservadas. **Em VERMELHO:** aminoácidos do sítio MIDAS parcialmente conservado em WARP Fonte: LI *et al.*, 2004.



**Figura 5:** Desenho esquemático dos domínios formadores das proteínas WARP (von Willebrand adhesive domain-related protein), CTRP (*Circumsporozoite and TRAP-related protein*) e TRAP (Trombospondin-related adhesive protein) de *Plasmodium berguei* (adaptado de Abraham *et al.*, 2004)

## 1.6 Regulação da expressão gênica em gametócitos

A multiplicidade de formas e a plasticidade dos parasitos causadores da malária exigem um complexo sistema para a regulação da expressão gênica e protéica nestes organismos (Kooij e Matuschewski, 2007). Esta afirmativa é ainda mais verdadeira no caso dos gametócitos, que são as formas envolvidas na transição entre hospedeiros, e que, uma vez ativados no intestino do vetor, devem responder rapidamente às novas condições ambientais e dar início à gametogênese. Os gametócitos fazem uso de mecanismos regulatórios únicos que propulsionam a formação e maturação dos estágios sexuais.

Um destes mecanismos é responsável pela regulação estágio-específica de RNAs ribossomais distintos. A troca entre os subtipos de rRNA se dá nos gametócitos, durante a transição entre hospedeiros, e é controlada pela mudança de temperatura (Fang e McCutchan, 2002). Outro mecanismo, demonstrado para a regulação de uma proteína nuclear, SET, descreve a presença de dois promotores distintos que controlariam a expressão estágio-específica desta proteína (Pace *et al.*, 2006).

Um mecanismo que parece influenciar diretamente a etapa de invasão do vetor é a regulação da expressão protéica através da repressão traducional de RNA

mensageiros específicos. Estes mRNAs são produzidos ainda por gametócitos mas são armazenados, em complexos multiméricos através de interações com proteínas, até o momento quando sua tradução é necessária (Hall *et al.*, 2005). Uma análise proteômica de gametócitos de *P. berghei* identificou uma RNA helicase restrita a macrogametócitos que compartilha homologia com a família DDX6 e RNA helicases (Khan *et al.*, 2005). Estas helicases são componentes integrais de ribonucleoproteínas envolvidas no armazenamento e silenciamento de mRNAs de origem materna (Weston e Sommerville, 2006). Esta proteína foi denominada DOZI (*Development of Zygote Inhibited*) e experimentos de deleção mostraram que ela é responsável pela repressão traducional de P25 e P28. Além destas duas proteínas foram identificados diversos outros transcritos que teriam sua expressão regulada por DOZI, totalizando 370 proteínas que tiveram seus níveis de mRNAs reduzidos em parasitos *knockout* para DOZI. Entre estas proteínas encontrava-se também a WARP (Mair *et al.*, 2006).

A identificação destes mecanismos de regulação e de seus elementos constituintes pode se tornar uma valiosa ferramenta para novas ações de controle da malária, como por exemplo para o desenvolvimento de drogas ou vacinas que preveniram a transmissão ao vetor ao interferir com o processo de repressão traducional em gametócitos circulantes (Braks *et al.*, 2007)

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar de várias décadas de combate e da implementação de inúmeras estratégias de controle, a malária ainda é uma ameaça à saúde humana, matando mais de 1 milhão de pessoas por ano, principalmente nos países mais pobres.

Como uma consequência dos desafios que os programas de combate à malária enfrentam, há uma forte tendência em se diversificar as estratégias de intervenção no ciclo da doença. Neste contexto, o processo de estabelecimento da infecção vetorial, mais precisamente as etapas de desenvolvimento de formas sexuais e a invasão do epitélio intestinal, tornam-se interessantes alvos para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle epidemiológico.

Duas maneiras de se explorar esta característica do ciclo biológico dos plasmódios, que é a obrigatoriedade da infecção de um vetor, seriam a criação de mosquitos transgênicos refratários à infecção e o desenvolvimento de vacinas bloqueadoras da transmissão. A imunidade induzida por uma vacina bloqueadora da transmissão preveniria a fertilização e/ou o subsequente desenvolvimento do parasito no mosquito, resultando na prevenção ou redução da formação de oocistos e, ultimamente, de esporozoítos nas glândulas salivares.

Muitas proteínas produzidas nos estágios sexuais do ciclo de vida do parasito e que são portanto, potenciais alvos para uma vacina bloqueadora já foram identificadas. Porém, a aplicação destas proteínas em estratégias de controle passa pelo entendimento sobre suas funções e sobre suas reais importâncias em seu contexto biológico.

Uma das proteínas identificadas como candidata em potencial a uma vacina bloqueadora de transmissão é a proteína WARP. O impacto negativo de anticorpos anti-WARP sobre o desenvolvimento do parasito indica que esta proteína, especificamente produzida pelo oocineto, exerce um papel de destaque durante a invasão epitelial. Além disso, devido ao seu alto grau de conservação, é possível que a proteína WARP esteja envolvida em processos ou mecanismos comuns às espécies pertencentes ao gênero *Plasmodium*, o que é extremamente interessante do ponto de vista evolutivo e epidemiológico. Porém, sua função permanece não resolvida e mesmo as especulações sobre seu provável papel na locomoção invasiva são derivadas de funções atribuídas a outras proteínas que possuem um domínio similar ao seu domínio von Willebrand do tipo A.

Portanto, todas as novas observações que indiquem ou proponham a real função da proteína WARP ou ajudem a esclarecer demais aspectos sobre sua expressão, auxiliarão a dimensionar a importância de WARP e poderão reiterar sua escolha como alvo potencial a ser empregado em estratégias de bloqueio de transmissão.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Estudar o perfil de expressão de proteínas de *P. gallinaceum* envolvidas com a invasão do epitélio intestinal do mosquito, dando ênfase à proteína WARP, durante o desenvolvimento sexual do parasito.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Produzir a proteína WARP de *Plasmodium falciparum* (PfWARP) e seu domínio von Willebrand do tipo A (Pf\_vWA) nas formas recombinantes
- Produzir anticorpos policlonais capazes de reconhecer a proteína WARP e o seu domínio vWA.
- Estudar a localização da proteína WARP durante o desenvolvimento sexual de *Plasmodium gallinaceum*.
- Identificar no genoma de *P. gallinaceum* as regiões codificadoras dos genes:  $\alpha$ -Tubulina, DOZI, P25, Quitinase, WARP, CTRP, MAOP e CeLTOS e estudar a expressão dos mesmos.
- Estudar o perfil de expressão do transcrito da proteína WARP de *P. gallinaceum* durante o seu desenvolvimento sexual e a invasão do epitélio intestinal de mosquitos *Aedes fluviatilis*
- Comparar o perfil de expressão do transcrito de WARP de *P. gallinaceum* com os de outros genes envolvidos com o desenvolvimento sexual ou com a invasão do epitélio intestinal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Parasitos

#### 4.1.1 *Plasmodium falciparum*

A cepa W2 de *P. falciparum* foi mantida em cultivo contínuo segundo metodologia descrita por Jensen e Trager, 1977 utilizando-se hemácias humana A+, em Meio RPMI 1640 (GIBCO), pH 7,4 (glutamina 2 mM, HEPES 25 mM, glicose 11 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, e 40 µg/ml de gentamicina) suplementado com 10% de plasma AB<sup>+</sup> inativado, em placas de Petri (60 mm x 15 mm). A parasitemia do cultivo foi monitorada diariamente a partir da contagem de hemácias infectadas em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa.

#### 4.1.2 *Plasmodium gallinaceum*

Nos experimentos, utilizou-se a cepa 8A de *P. gallinaceum*, que é proveniente do isolado original de Brumpt, 1937, e foi gentilmente cedida pela Dra. Antoniana U. Krettli.

A cepa é mantida em laboratório através de sucessivas passagens sanguíneas entre aves (*Gallus gallus*). A parasitemia das aves é acompanhada por esfregaço sanguíneo corado pelo método de GIEMSA e para a passagem sanguínea são usadas aves com parasitemia ascendente entre 5-10%. Uma alíquota do sangue destas aves é retirada e inoculada, por via intramuscular, em aves jovens (0-1 semana). Ciclos de passagens consecutivas são intercalados com passagens da cepa por um vetor invertebrado, o *Aedes fluviatilis*, através da alimentação dos mosquitos em aves infectadas. Após o estabelecimento da infecção nos mosquitos, estes são usados para transmitirem o *P. gallinaceum* a aves jovens, reiniciando o ciclo.

### 4.2 Colônia de *Aedes fluviatilis*

Os mosquitos utilizados nos experimentos são provenientes da colônia mantida no Laboratório de Malária do Instituto René Rachou. A colônia é mantida a

28°C, com umidade relativa do ar de, aproximadamente, 70% e sob um fotoperíodo de 12 horas de luz. Os mosquitos são alimentados com solução de glicose a 10% *ad libitum* e as fêmeas são semanalmente alimentadas com o sangue de camundongos, previamente anestesiados, para permitir a oviposição e a manutenção da colônia.

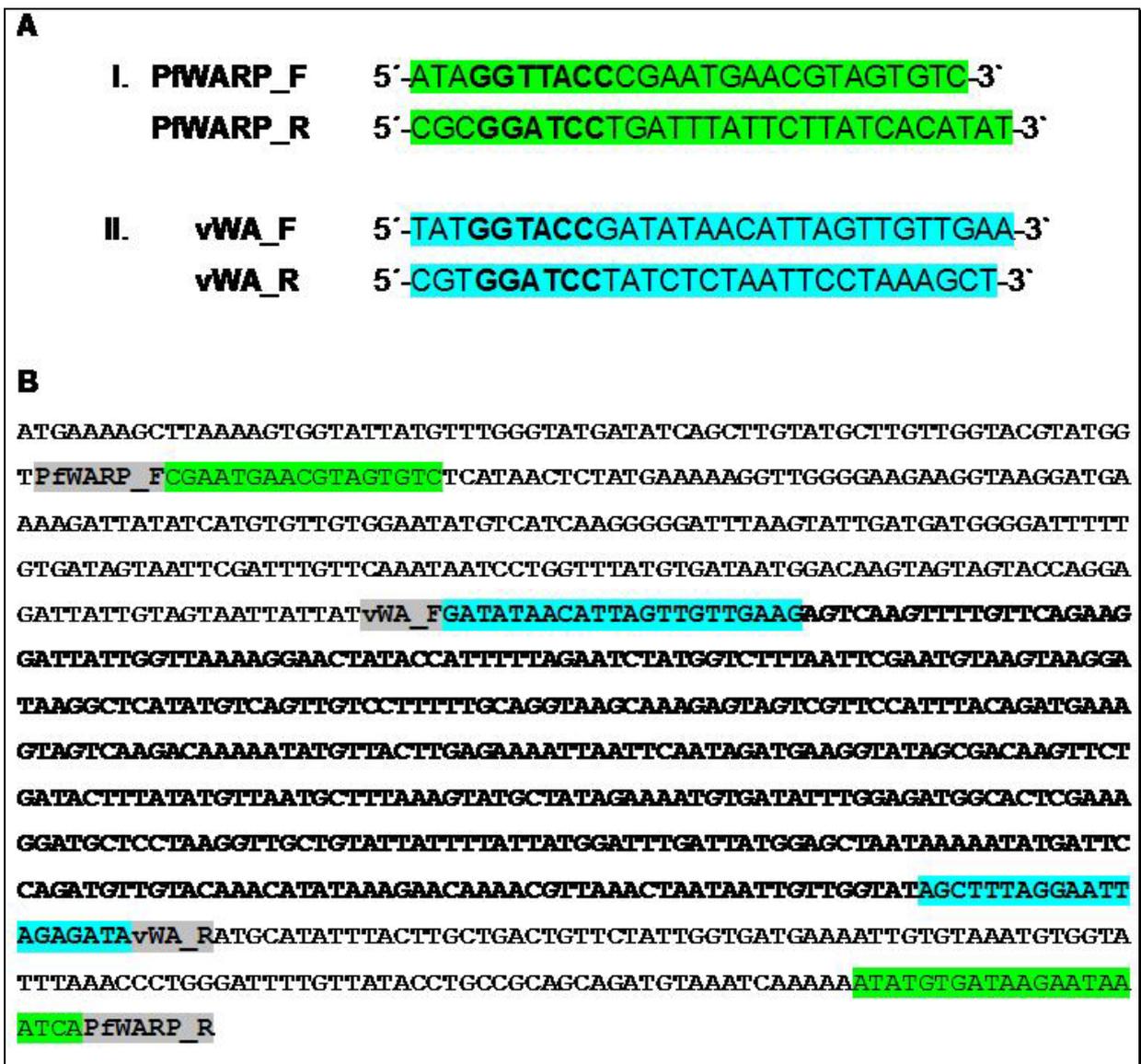
### **4.3 Extração do DNA genômico de *Plasmodium falciparum***

O DNA foi extraído a partir de parasitos cultivados em laboratório utilizando-se o Genomic DNA Purification Kit (Puregene), segundo o protocolo detalhado abaixo.

Em um tubo de microcentrifuga de 15 mL, contendo 9 mL de solução de lise de hemácias, foram adicionados 3 mL de cultura. A mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo invertida periodicamente. Após a incubação a solução foi centrifugada a 2000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspendido em 3 mL de solução de lise celular. Um mL de solução de precipitação foi adicionado ao microtubo e a solução foi agitada por 20 segundos em vórtex e centrifugada a 2000 x g por 10 minutos. O sobrenadante contendo DNA solúvel foi transferido para outro microtubo contendo 3 mL de isopropanol. A solução foi invertida e centrifugada a 2000 x g por três minutos. O sobrenadante foi descartado e 3 mL de etanol 70% foram adicionados para lavar o sedimento de DNA. O microtubo foi centrifugado por um minuto a 2000 x g, em seguida foi invertido em papel absorvente. O DNA foi dissolvido em 30 µL de água destilada e deionizada estéril. A estocagem foi realizada a -20°C.

### **4.4 Amplificação por PCR de PfWARP e de seu domínio, Fator do tipo A de von Willebrand (Pf\_vWA)**

A partir do DNA genômico purificado de *P. falciparum*, foram amplificados, por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Mullis *et al.*, 1986), dois fragmentos. O primeiro compreende a seqüência codificadora de PfWARP sem o peptídeo sinal e o segundo corresponde ao domínio vWA de PfWARP. Para a amplificação destes fragmentos foram usados, respectivamente, os pares de iniciadores PfWARP\_F/PfWARP\_R e vWA\_F/vWA\_R (Figura 6).



**Figura 6:** Pares de iniciadores para a amplificação de PfWARP e de seu domínio vWA. **(A)** Seqüências dos iniciadores utilizados na amplificação específica da PfWARP (PfWARP\_F e PfWARP\_R) e de seu domínio vWA (vWA\_F e vWA\_R). **(B)** Seqüência nucleotídica do gene de PfWARP indicando as regiões de anelamento dos pares de iniciadores PfWARP\_F e PfWARP\_R (verde) e do par de iniciadores vWA\_F e vWA\_R (azul claro). A seqüência do domínio vWA do tipo A de PfWARP está destacada (em negrito).

Os iniciadores designados **F** possuem, em sua extremidade 5', o sítio de clivagem para a endonuclease *KpnI* e os iniciadores designados **R** possuem, em sua extremidade 5' o sítio de clivagem para a endonuclease *Bam*HI.

As condições padronizadas para as reações de amplificação foram: desoxirribonucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) a [0,125 mM] cada, Mg<sup>2+</sup> [2 mM], 10 picomoles de cada iniciador, 1U de Taq Invitrogen e tampão (TRIS-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8,4) em 10 µL de reação. As temperaturas de

anelamento dos pares de iniciadores PfWARP\_F/PfWARP\_R e vWA\_F/vWA\_R foram, respectivamente, 50° C e 52° C.

O programa de termo ciclagem utilizado para as amplificações foi:

94°C/ 5 minutos	}	40 X
94°C/ 30 segundos		
50°C ou 52°C/ 45 segundos		
72°C/ 30 segundos		
72°C/ 3 minutos		

#### 4.4.1 Purificação dos produtos amplificados

Produtos de PCR foram purificados segundo o protocolo descrito no Kit QIAQUICK PCR Purification da QIAGEN. Para cada 1 volume da reação de PCR foram adicionados 5 volumes do tampão PB. Para a ligação do DNA, as amostras foram aplicadas em colunas QUIAquick e centrifugadas a 10.000 x g por 60 segundos e os eluatos foram descartados. As colunas foram lavadas com 750 µL de tampão PE e centrifugadas a 10.000 x g por 60 segundos, os eluatos foram descartados e as colunas centrifugadas por mais 60 segundos para a remoção completa do etanol. As colunas foram transferidas para novos tubos estéreis de 1,5 mL e o DNA ligado a elas foi eluído com a aplicação de 50 µL de água bidestilada à coluna e posterior centrifugação a 10.000 x g por 60 segundos. Todos os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente.

## 4.5 Clonagens

### 4.5.1 Clonagem em vetor pCR2.1 TOPO

A clonagem no vetor pCR2.1 TOPO (Anexo 1) seguiu as instruções do fabricante (INVITROGEN). Na reação de ligação foram utilizados de 1 a 4 µL dos produtos de PCR, 1 µL de solução salina (NaCl 1,2 M, MgCl<sub>2</sub> 60 mM), 1 µL do vetor pCR 2.1 TOPO (10 ng/µL) e água estéril para um volume final de 6 µL. A reação foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente.

#### 4.5.2 Clonagem em vetor pGEM-T easy

A clonagem no vetor pGEM-T easy (Anexo 2) seguiu as instruções do fabricante (PROMEGA). Na reação de ligação foram usados 5  $\mu$ L de tampão de ligação 2X (TRIS-HCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 20mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, 10% polietileno glicol, pH 7,8), 1  $\mu$ L do vetor pGEM-T easy (50 ng), 1 $\mu$ L da enzima T4 DNA ligase fornecida no kit, quantidades variáveis de inserto, e água bidestilada suficiente para completar um volume final de 10  $\mu$ L. As reações ocorreram a 4°C por 16 horas.

#### 4.5.3 Subclonagem em vetor de expressão pET32

##### 4.5.3.1 Digestão com enzimas de restrição

Os fragmentos que se encontravam clonados em vetores TA foram subclonados no vetor pET32a, através da clivagem dos fragmentos com as endonucleases *KpnI* e *BamHI*.

Primeiramente, os insertos ou o vetor foram tratados com *KpnI*, para cada 10  $\mu$ L de reação foram usados 1  $\mu$ L de tampão React 4 10X (TRIS-HCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, KCl 500 mM, pH 7,4) e 1  $\mu$ L da enzima *KpnI*. As reações foram incubadas a 37°C por 3 horas. Após o término da primeira digestão, foram adicionados 2  $\mu$ L do tampão *BamHI* (NaCl 1,5 M, TRIS-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 10 mM, pH 7,9), 2  $\mu$ L da enzima *BamHI*, 1  $\mu$ L de BSA [20  $\mu$ g/mL] e água bidestilada para um volume final de 20  $\mu$ L. A segunda digestão ocorreu por 3 horas a 37°C.

##### 4.5.3.2 Purificação dos produtos amplificados

Após a digestão do vetor pET32 e dos fragmentos por *KpnI* e *BamHI* e sua visualização em gel de agarose, os produtos das digestões utilizados nas reações de ligação foram extraídos dos géis e purificados.

As bandas desejadas foram excisadas do gel com um bisturi esterilizado e, posteriormente, submetidas à purificação com o Kit QIAEX Gel extraction (QIAGEN). As bandas foram pesadas e para cada mg de gel foram adicionados 3  $\mu$ L do tampão QX1. A cada tubo, contendo uma banda individual, adicionou-se 30  $\mu$ L da resina QIAEX II. Os tubos foram incubados a 50°C por 10 minutos para a dissolução da matriz de agarose, as soluções foram homogeneizadas em vortex a cada 2 minutos

durante a incubação. As amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 10.000 x g e o sobrenadante foi removido cuidadosamente com uma pipeta. O sedimentado foi lavado uma vez com 500 µL de tampão QX1 e duas vezes com 500 µL de tampão PE. O sedimento resultante das lavagens foi deixado à temperatura ambiente por 10 minutos para secar. Para dissolver o material genético purificado, o sedimento foi ressuscitado em água bidestilada e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, a solução foi centrifugada por 30 segundos a 10.000 x g e o sobrenadante, contendo o material genético, foi transferido para um novo tubo estéril.

#### 4.5.3.3 Ligação com a enzima T4 DNA ligase

Fragmentos e o vetor pET32 foram ligados em reações com a enzima T4 DNA ligase (INVITROGEN). Vetor e fragmento foram ligados nas seguintes proporções estequiométricas: (1:1); (1:3); (1:8). Para cada 10 µL de reação foram usados 1 µL de tampão para T4 DNA ligase 10X (Tris-HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, ATP 10 mM, DTT 100 mM, BSA [250 µg/mL], pH 7,5), 1 µL da enzima T4 DNA ligase, quantidades variadas de fragmento e vetor e água bidestilada. As reações ocorreram a 4°C por 16 horas.

#### 4.5.4 Preparo de bactérias *E. coli* competentes

As bactérias competentes *Escherichia coli* das cepas TOP 10, BI21(DE3)pLysS ou Origami(DE3)pLysS utilizadas nos experimentos de transformação, foram preparadas segundo Nishimura *et al.*, 1990. As bactérias foram inicialmente semeadas em estrias por esgotamento a partir do estoque em glicerol numa placa de Petri contendo meio ágar LB. Após cultivo por 12 a 16 horas a 37°C, uma colônia isolada foi transferida com ponteira estéril para um tubo de centrifuga de 50ml estéril contendo 10 ml de meio LB e cultivada por 12 horas a 37°C. Fez-se um inóculo de 0,5 ml deste cultivo bacteriano em 50 ml de meio A (44,5 ml meio LB, 0,5ml MgSO<sub>4</sub> 1 M, 5 ml glicose 2 %) e incubou-se a 37°C, sob agitação, até atingir um O.D.<sub>550</sub> de 0,6. As células foram incubadas no gelo por 10 min e recuperadas por centrifugação a 1500 x g por 10 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas gentilmente em 0,5 ml de meio A e 2,5 ml de solução estoque B (36% glicerol, 12% PEG 8000,

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 12 mM em LB, pH 7). As células foram homogeneizadas levemente e estocadas em alíquotas de 0,1 ml em tubos previamente gelados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente estocadas a -70°C por até 3 meses.

#### 4.5.5 Transformação de *E. coli* competentes

Em um tubo de micro centrifuga de 1,5 mL novo e estéril, foram adicionados os 4 µL de vetor recombinante (pCR2.1 TOPO, pGEM-T easy ou pET32) e 50 µL de células competentes *Escherichia coli* das cepas TOP 10, BI21(DE3)pLysS ou Origami(DE3)pLysS. O tubo foi incubado em gelo por 20 minutos e em seguida as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42° C por 30 segundos e transferidas rapidamente para o gelo por mais 2 minutos. As bactérias foram, então, diluídas em 250 µL de meio SOC (20g Triptona, 5g Extrato de levedura, NaCl 85 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Glicose 20 mM, pH 7,0) e incubadas a 37° C por 1 hora sob agitação constante. As bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo antibióticos e crescidas por 16 horas a 37°C. Os antibióticos utilizados para cada cepa foram: para TOP10, ampicilina [100 µg/mL]; para BI21(DE3)pLysS, ampicilina [100 µg/mL] e cloranfenicol [34 µg/mL]; e para Origami(DE3)pLysS ampicilina [100 µg/mL], cloranfenicol [34 µg/mL], kanamicina [15 µg/mL] e tetraciclina [12,5 µg/mL].

#### 4.5.6 Extração de DNA plasmidial (MINIPREPs) de *E. coli* transformadas

Para a purificação do DNA plasmidial foi utilizado o Kit Qiaprep Spin miniprep (QIAGEN), conforme instruções do fabricante. As colônias de bactérias foram crescidas em 1-5 mL de meio LB com antibióticos por 16 horas a 37° C sob agitação constante. Logo após este procedimento, as culturas foram centrifugadas a 13.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e os precipitados de células foram ressuspensos em 250 µL de solução de ressuspensão. Foram adicionados aos tubos, 250 µL de solução de lise e os tubos foram levemente invertidos até que as soluções se tornassem turvas e depois foram adicionados 350 µL do tampão N3. Os tubos foram centrifugados a 13.000 x g por 10 minutos para a formação do sedimento compacto e branco. Os sobrenadantes foram transferidos para as colunas QIAprep e centrifugados por 60 segundos a 13.000 x g. A lavagem das

colunas foi feita, primeiramente, com 500  $\mu$ L de solução PB (hidroclorato de guanidina e isopropanol) e centrifugação por 60 segundos a 13.000 x g e, em um segundo momento, com 750  $\mu$ L deste mesmo tampão. O lavado foi descartado e as colunas centrifugadas mais uma vez. A eluição do DNA plasmidial foi feita com as colunas transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL novos e estéreis, e adicionando-se 30  $\mu$ L de água destilada e deionizada ao centro das colunas, que foram centrifugadas a 3.000 x g por 1 minuto. O DNA plasmidial, purificado, foi estocado a -20° C até o uso.

#### **4.5.7 PCR de colônias de *E. coli***

Após crescimento de colônias em meio LB sólido com antibióticos, algumas colônias foram selecionadas e transferidas da placa para 200  $\mu$ L de meio LB líquido contendo os antibióticos necessários e, então, foram crescidas por 1 hora a 37°C, sob agitação constante. Após o período de crescimento foram retiradas alíquotas de 20  $\mu$ L das colônias, as alíquotas foram fervidas a 100°C por 5 minutos e transferidas para gelo. Para a reação de amplificação utilizava-se 1  $\mu$ L da alíquota fervida para cada 10  $\mu$ L de reação, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente. Os iniciadores utilizados para as amplificações variaram de acordo com o vetor em questão:

- pCR2.1 TOPO – M13F/M13R
- pGEM-T easy – SP6/T7
- pET32 – iniciadores **F** (senso) específicos para os fragmentos de interesse (PfWARP\_F ou vWA\_F)/T7 terminal

Os 180 $\mu$ l restantes das colônias positivas para os fragmentos de interesse foram crescidos em meio LB líquido com antibióticos por 16 horas a 37°C, separadas em alíquotas e misturadas em uma proporção 1:1 com uma solução estéril de glicerol 65% e foram estocadas a -70° C.

#### **4.5.8 Gel de agarose**

As reações de PCR, as digestões com endonucleases, as reações de ligação e as minipreps foram todas visualizadas em géis de agarose 0,8-1,5% em tampão TAE 1X (TRIS 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8), corados com Brometo de Etídeo [10 mg/mL] Os géis foram corridos a 100 V, visualizados em um

transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados utilizando o sistema UVP BioDoc-iT™.

#### 4.5.9 Predição das estruturas primárias das proteínas recombinantes

A seqüência do vetor pET32 ligada a ambos os fragmentos após digestão por *KpnI* e *BamHI* foi montada em um processador de texto e traduzida *in silico* através de uma ferramenta, “Translate”, disponibilizada pelo servidor Expasy Tools (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). O peso molecular das proteínas resultantes foi calculado através de outra ferramenta, “Compute pI/Mw” ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)), também disponibilizada pelo servidor Expasy Tools.

### 4.6 Produção de proteínas recombinantes

#### 4.6.1 Indução da expressão das proteínas recombinantes

Para o ensaio de expressão, colônias de bactérias BL21(DE3)pLysS ou Origami(DE3)pLysS contendo o inserto de interesse foram crescidas em 10 mL de meio LB com os antibióticos específicos por 16 horas a 37°C sob agitação constante. Após o período de crescimento, as colônias foram inoculadas, cada uma, em 990 mL de meio LB com antibióticos e crescidas até alcançarem sua fase logarítmica, indicada por uma leitura espectrofotométrica entre 0,6 e 0,8 no comprimento de onda de 600 nm.

Uma vez alcançada a fase logarítmica, retirava-se uma alíquota de 2 mL de cada colônia, que seriam os controles negativos das induções de expressão, e ao restante das colônias acrescentava-se IPTG para uma concentração final de 1 mM. As colônias e seus controles negativos foram crescidos por mais 4 horas a 37°C sob agitação constante. Após o período de indução, as colônias foram separadas em alíquotas de 50 mL e centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram congelados a -20°C. O perfil protéico de cada cultura foi analisado em gel de poliacrilamida 10 ou 12% na presença de agente desnaturante (SDS) e redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol).

#### 4.6.2 Análise da solubilidade das proteínas recombinantes

Os sedimentos provenientes das alíquotas de culturas bacterianas induzidas foram descongelados e, a cada tubo foram adicionados 40 mL de solução de lise (TRIS-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, DTT, 100  $\mu$ M, pH 7,5) com lisozima [2 ng/mL] e os tubos deixados em gelo por 15 minutos. Depois, os tubos foram submetidos a três ciclos de congelamento em um banho de gelo seco e etanol e descongelamento em um banho a 37°C. Cada tubo foi, então, sonificado por dois pulsos de 30 segundos a uma amplitude de 30% divididos por um intervalo de 30 segundos. Após serem sonificados, os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 x g a 4°C. Sobrenadantes (fração solúvel) e sedimentos (fração insolúvel) foram congelados a -20°C. Alíquotas das frações solúveis e insolúveis foram analisadas em gel de poliacrilamida 10 ou 12% na presença de agente desnaturante (SDS) e redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol).

#### 4.6.3 Gel de poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol (SDS-PAGE)

Em todas as análises foram utilizados géis em sistema descontinuo. Para géis de separação 10(ou 12)%: 4(ou 3,3) mL de água bidestilada, 3,3(ou 4) mL de uma solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%, 2,5 mL de tampão de separação (TRIS 1,5 M, pH 8,8), 0,1 ml de SDS 10%, 0,1 mL de Persulfato de amônia 10% e 4  $\mu$ L de TEMED.

Para géis de concentração 5%: 2,1 mL de água bidestilada, 0,5 mL de solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%, 0,38 mL de tampão de concentração (TRIS 1M, pH 6,8), 30  $\mu$ L de SDS 10%, 30  $\mu$ L de Persulfato de amônia 10% e 3  $\mu$ L de TEMED.

Para serem aplicadas no gel as amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (TRIS-HCl 600 mM, 1,66% SDS, 5% Glicerol, 1%  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos.

O suporte contendo o gel foi imerso em uma cuba contendo tampão de corrida (TRIS 25 mM, Glicina 200 mM, 0,5% SDS, pH 8,3) e a corrida foi realizada, primeiramente, a 60 V e, após a entrada das amostras no gel de separação, a 100 V.

O gel foi corado por solução corante (Comassie Blue R-250 300  $\mu$ M, 40% Metanol, 7% ácido acético) por 30 minutos, sob agitação constante. A descoloração

foi feita com banhos sucessivos em solução descorante (40% metanol, 7% ácido acético) até o aparecimento das bandas.

## **4.7 Purificação das proteínas recombinantes**

### **4.7.1 Tratamento com solução desnaturante Uréia 8M**

As frações insolúveis das culturas bacterianas foram descongeladas em gelo por 15 minutos, ressuspendidas em 5 mL de um tampão de lise ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, TRIS-Cl 10 mM, Uréia 8 M, pH 8,0) e incubadas, sob agitação constante, por 1 hora à temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante, contendo as proteínas recombinantes desnaturadas e solúveis, foi transferido para um novo tubo estéril e armazenado a -20° C.

### **4.7.2 Cromatografia de afinidade em coluna (Ni-NTA)**

Os 5 mL do lisado resultante do tratamento com Uréia foram cuidadosamente misturados a 1 mL de resina NI-NTA e mantidos em um agitador, a baixa velocidade, por 1 hora, para que as proteínas recombinantes com caudas de histidina se ligassem à resina através dos íons  $\text{Ni}^{2+}$ . A mistura foi transferida para uma coluna de cromatografia e, após a sedimentação da resina, a tampa inferior da coluna foi removida e o eluato foi coletado. A coluna foi lavada 2x com 4 mL de tampão de lavagem ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, TRIS-Cl 10 mM, Uréia 8 M, pH 6,3) e as frações de lavagem foram coletadas. A eluição das proteínas recombinantes foi feita com 4 passagens de 0,5 mL de um primeiro tampão de eluição ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, TRIS-Cl 10 mM, Uréia 8 M, pH 5,9) seguidas por mais 4 passagens de 0,5 mL de um segundo tampão ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, TRIS-Cl 10 mM, Uréia 8 M, pH 4,5). Todas as 8 frações foram coletadas, acrescidas de um coquetel de inibidores de proteases (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Aprotinina, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Pepstatina A, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PMSF) e alíquotas foram retiradas para análise por SDS-PAGE. Ao final da eluição 2 mL de tampão de lavagem foram adicionados à coluna e 4 frações de 0,5 mL foram coletadas. Todas as frações foram armazenadas a -70°C.

### 4.7.3 Dosagem das frações cromatográficas

A concentração de proteínas nas frações coletadas para ambas as proteínas recombinantes foi determinada através do método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). A curva padrão foi construída a partir de uma solução de BSA [1 mg/mL] que foi diluída para a obtenção de diferentes concentrações variando de 1 a 100 µg/mL. Frações que apresentaram um perfil protéico semelhante em gel de poliacrilamida foram agrupadas em pools para a dosagem. As leituras foram feitas, em duplicata, em placas de 96 poços com volume final por reação igual a 200 µL, com 180 µL de reagente de Bradford (BioRad) por reação. Após a adição do reagente de Bradford as placas foram lidas a 595 nm em um leitor de placas de ELISA (BioRad).

### 4.8 Produção de anticorpos policlonais

As duas proteínas recombinantes foram usadas na imunização de coelhos para a obtenção de anticorpos policlonais. Foram usados dois coelhos para gerar anticorpos contra cada uma das proteínas. Os animais 1 e 3 foram inoculados com alíquotas de *PfWARPr* e os animais 2 e 4 com alíquotas de *vWAr*. Para a obtenção do soro pré-imune (controle) foram retiradas, por punção cardíaca, alíquotas de sangue antes das imunizações. Permitiu-se a coagulação do sangue nas alíquotas, que foram centrifugadas a 1000 x g para a separação do soro. Foram realizadas quatro inoculações em cada coelho, todas por via subcutânea. Na primeira inoculação (dia 0) foram administrados 250 µg de proteína recombinante conjugada ao adjuvante completo de Freund, nas demais inoculações (dias 7, 21 e 35) foram administrados 125 µg de proteína conjugada com o adjuvante incompleto de Freund. Duas semanas após a última inoculação o sangue dos animais foi coletado, por punção cardíaca, e processado para a obtenção do soro, que foi armazenado a -20°C.

### 4.9 ELISA

A proteína recombinante *vWAr* foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato 50mM pH 9,6 até uma concentração de 5 µg/mL e 100 µL desta solução foram aplicados em poços de uma microplaca e incubados a 4° C por 16 horas. A placa foi lavada com PBS(NaCl 140 mM, KCl 27 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH

7,4) + Tween 0,05% (PBST), bloqueada com Soro Fetal Bovino a 10% por 16 horas a 4°C e lavada novamente. Foram preparadas diluições seriadas dos soros em PBST que foram aplicadas na placa e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, a placa foi incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (SIGMA) diluído 1500x em PBST. A placa foi revelada com a adição de uma solução contendo OPD (orto-fenil-diaminobenzidina) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em um tampão citrato-fosfato pH 5,0. A reação foi parada com ácido sulfúrico 4 N e a microplaca foi lida em um leitor de ELISA (BioRad) a 490 nm.

#### **4.10 Cultivo de oocinetos e demais formas sexuais de *P. gallinaceum***

O protocolo para o cultivo de oocinetos foi modificado a partir de Kaushal *et al.*, 1983. Aves de 2 semanas foram infectadas através de passagem sanguínea e tiveram suas parasitemias acompanhadas por esfregaços sanguíneos corados pelo método de GIEMSA. Aproximadamente uma semana após a inoculação, quando as aves apresentavam parasitemias ascendentes de 20-70%, seu sangue foi retirado, com seringas heparinizadas, por punção cardíaca e imediatamente transferido para tubos Falcon de 50 mL. O sangue foi rapidamente misturado, em uma proporção 1:1 a uma solução inibidora de ativação estéril (TRIS 8 mM, NaCl 140 mM, Glicose 10 mM, pH 7,35). Os tubos foram centrifugados a 3.220 x g por 10 minutos para a separação do plasma e compactação das hemácias. O sobrenadante foi descartado, as hemácias foram ressuspensas, em um volume igual ao do sangue retirado, em um meio contendo ácido xanturênico (16% Soro de galinha inativado, 0,3% NaHCO<sub>3</sub>, ácido xanturênico 50 µM), que estimula a exflagelação dos microgametócitos, e incubadas por 40 minutos à temperatura ambiente para permitir a fecundação dos macrogametas recém formados. Após 15 minutos de incubação, uma alíquota de 5 µL foi retirada, transferida para uma lâmina de microscopia e observada em um microscópio óptico em aumento de 400x para quaisquer sinais de exflagelação.

A separação dos zigotos das demais células foi feita por gradiente de densidade. Aproximadamente 10 mL da solução contendo as células sanguíneas e os parasitos foram transferidos cuidadosamente para tubos Falcon de 50 mL com 15 mL de Histopaque® -1077 (SIGMA). Estes tubos foram centrifugados a 900 x g por 30 minutos. Após a centrifugação, formou-se uma camada onde se encontravam os zigotos, células leucocitárias e poucas hemácias. Esta camada foi retirada,

transferida para um novo tubo estéril de 50 mL, acrescida de solução inibidora de ativação (até 50 mL) e centrifugada a 3.220 x g por 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante, contendo o excesso do Ficoll, foi retirado e o sedimento foi ressuscitado em 10 mL de solução inibidora de ativação e transferido para um tubo Falcon de 15 mL.

Os restos celulares e células leucocitárias foram retirados da solução através de uma reação de aglutinação com 500 µL de uma solução 1 mg/mL de aglutinina de germen de trigo. A solução de aglutinina foi acrescentada ao tubo e este foi agitado por 2 minutos, deixado em posição vertical por 15 minutos e centrifugado a 150 x g por 3 minutos. Após a aglutinação, retirou-se do sobrenadante, contendo os zigotos purificados, uma alíquota de 10 µL para contagem de parasitos em uma câmara de Neubauer. O restante do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 50 mL e lavado em solução inibidora de ativação. O tubo foi centrifugado a 3.220 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O sedimento, contendo zigotos e macrogametas não fecundados, foi ressuscitado em meio 199 pH 8,2 contendo L-glutamina 2 mM, Glicose 10 mM, 500 U/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina, para uma contagem final de 1 a  $2 \times 10^6$  zigotos por mL. Os parasitos foram mantidos em cultura a 26°C por até 24 horas. A presença de oocinetos maduros foi confirmada, após 22 horas em cultivo, por contagem de parasitos em uma câmara de Neubauer.

A viabilidade dos parasitos ao final do cultivo foi averiguada pelo método de exclusão com Azul de Tripán. Uma alíquota da cultura foi retirada após 22 horas, centrifugada a 3.220 x g por 5 minutos, ressuscitada em solução inibidora de ativação contendo 0,2% Azul de Tripán (SIGMA) e as células foram contadas em uma câmara de Neubauer.

#### **4.11 Western Blot de oocinetos cultivados**

Foi preparado um extrato protéico a partir de oocinetos cultivados por 22 horas. Oocinetos maduros foram contados em uma câmara de Neubauer e o volume contendo  $3 \times 10^6$  parasitos foi retirado da cultura e centrifugado a 3.220 x g por 5 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi transferida para um novo tubo estéril e foi armazenada a -70°C, assim como o sedimento contendo os parasitos.

Para preparar o extrato protéico, os parasitos foram descongelados em gelo e tratados com tampão de lise (TRIS-HCl 5 mM, EDTA 2 mM, 2 µg/mL Aprotinina, 1 µg/mL Pepstatina A, 100 µg/mL PMSF, TRITON-X 100 1%, pH 7,4).

Para a eletroforese em condições desnaturantes e redutoras, os extratos e a alíquota de sobrenadante foram acrescidos de tampão de amostra (TRIS-HCl 600 mM, 1,66% SDS, 5% Glicerol, 1% β-mercaptoetanol, pH 6,8) e fervidos por 5 minutos.

Alíquotas das proteínas recombinantes, *PfWARPr* e *vWAR* também foram submetidas à eletroforese como controles positivos. Após a corrida em gel de poliacrilamida 12%, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (poli fluoreto de vinilideno). A transferência foi realizada, a 100 V por 1 hora, em uma cuba imersa em gelo e contendo tampão (TRIS 30 mM, glicina 250 mM, SDS 5 mM, 20% glicerol, pH 8,3) gelado.

Ao final da transferência, a membrana foi corada por Ponceau e o marcador de peso molecular foi cortado para futura comparação das bandas detectadas.

A membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente em uma solução de leite em pó desnatado a 5% em PBS acrescido de Tween 1% (PBST). Após o bloqueio a membrana foi lavada 3x por 5 minutos em PBST. A membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente com o soro pós-imunização do coelho 2 diluído 500x em solução de leite em pó desnatado a 3% em PBST. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à enzima peroxidase (SIGMA) diluído 80.000x em solução de leite em pó desnatado a 3% em PBST. Após cada incubação com anticorpos a membrana era lavada 3x por 5 minutos com PBST. A revelação foi feita com a adição de uma solução contendo 40 mg de DAB (3,3'-diaminobenzidina) e 40 µL de peróxido de hidrogênio 30%.

## **4.12 Microscopia de oocinetos cultivados**

### **4.12.1 Imunofluorescência**

Alíquotas com parasitos maduros foram retiradas 22 horas após o início do cultivo, foram centrifugadas a 3.220 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em solução inibidora de ativação para

uma concentração final aproximada de  $1 \times 10^7$  parasitos maduros por mL. Frações de 10  $\mu$ L foram transferidas para lâminas de vidro com 10 poços, sendo uma fração por poço. As lâminas foram secas ao ar e o material foi fixado em acetona por 2 minutos e lavado 3 x por 5 minutos em PBS. Após fixação e lavagem as lâminas eram estocadas a 4°C, na ausência de luminosidade, até o momento do uso.

Para a marcação fluorescente, as lâminas foram primeiramente bloqueadas, por 1 hora à temperatura ambiente, em PBS contendo Soro fetal Bovino 1% e TRITON-X 100 1%, para permeabilização do material biológico fixado. Após 3 lavagens de 5 minutos em PBS, as lâminas foram incubadas, por 1 hora à temperatura ambiente, com os soros pré e pós-imunização dos 4 coelhos usados diluídos em PBS. Os soros foram testados em diferentes diluições, de 1:40 a 1:640. A marcação secundária foi feita por incubação das lâminas, por 1 hora à temperatura ambiente e protegidas da luz, em diferentes diluições de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a FITC, diluído em PBS e Azul de Evans 1:25. Após cada incubação as lâminas foram lavadas 3 x por 5 minutos em PBS para retirada dos excessos de anticorpos.

As lamínulas foram montadas após a aplicação de glicerina tamponada (9 mL tampão carbonato-bicarbonato 50mM pH 9,6, 1 mL de glicerina) sobre lâminas. As lâminas foram observadas em um microscópio invertido de fluorescência Eclipse TS100 (NIKON), em um aumento de 400x.

#### **4.12.2 Microscopia Confocal**

Para os experimentos de microscopia confocal foram retiradas alíquotas do cultivo em diferentes momentos, a 0 hora, para a visualização de zigotos e após 22 horas, para oocinetos maduros. Após contagem em um câmara de Neubauer a partir de uma alíquota de 10  $\mu$ L, retirou-se da cultura, a cada momento estudado,  $1 \times 10^6$  parasitos. Estas frações foram centrifugadas a 3.220 x g por 5 minutos e os sedimentos foram rapidamente ressuspensos em paraformaldeído 4% gelado e incubados a 4°C por 2 horas para a fixação do material. Terminada a fixação, as células eram lavadas 3x por 5 minutos em PBS gelado e armazenadas a 4° C.

Para as etapas de marcação fluorescente, as amostras foram aplicadas em lamínulas previamente tratadas com uma solução de poli-lisina 0,1%, próprias para a adesão do material, e incubadas por 16 horas à temperatura ambiente. As etapas de incubação e lavagem foram todas realizadas em uma câmara úmida e protegidas da

luz. Após a adesão das amostras, as lamínulas foram incubadas em meio RPMI por 2 horas à temperatura ambiente e então, bloqueadas, por 1 hora à temperatura ambiente, com PBS contendo BSA 1% e TRITON-X 100 1%. Após o bloqueio, as lamínulas foram incubadas por 16 horas, à temperatura ambiente, com o soro pós-imunização do coelho 2 diluído 1:80 em um diluente estabilizador (DAKO) ou com o soro pré imune do mesmo coelho, na mesma diluição, como um controle negativo. Como anticorpo secundário, foi usado um anti-IgG de coelho conjugado a FITC diluído 1:80 em um diluente estabilizador (DAKO) e a incubação foi feita por 1 hora à temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas 3x por 5 minutos com PBS contendo BSA 1% e TRITON-X 100 1%, foram montadas em lâminas de vidro com Mowiol e incubadas por 16 horas a 4°C antes de serem levadas ao microscópio.

Um microscópio Confocal LSM 510 META (ZEISS) foi utilizado para a visualização das amostras após excitação por um Laser Argônio a 488 nm e detecção das imagens em um espectro de emissão de 505 a 550 nm sob um aumento de 630x.

## 4.13 RT-PCR

### 4.13.1 Genes estudados

Foram estudados os genes codificadores das seguintes proteínas de *Plasmodium gallinaceum*: WARP,  $\alpha$ -Tubulina, DOZI, CTRP, P25, QUITINASE, CeLTOS e MAOP .

### 4.13.2 Busca por ortólogos em *Plasmodium gallinaceum*

Foram realizadas buscas por genes de *P. falciparum* e *P. berghei*, ortólogos aos genes relacionados acima, no PlasmoDB ([www.plasmodb.org](http://www.plasmodb.org)), o banco de dados que gerencia e disponibiliza as seqüências anotadas destas espécies.

A procura pelos genes ortólogos no genoma de *P. gallinaceum* foi feita com base na seqüência de aminoácidos das proteínas de *P. falciparum* através do algoritmo TBLASTN, disponibilizado pelo Wellcome Trust Sanger Institute ([www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/p\\_gallinaceum](http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/p_gallinaceum)), que faz buscas exclusivamente em “reads” ou “contigs” do genoma de *P. gallinaceum*. Os resultados

obtidos foram confirmados por uma nova busca baseada, desta vez, na seqüência de nucleotídeos utilizando-se o algoritmo BLASTN e a seqüência encontrada foi traduzida *in silico* através de uma ferramenta, “Translate”, disponibilizada pelo servidor Expasy Tools (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). Caso os resultados fossem inconclusivos, o mesmo processo era repetido utilizando-se as seqüências dos genes de *P. berghei*.

#### **4.13.3 Desenho de iniciadores**

As seqüências obtidas acima foram utilizadas para o desenho dos pares de iniciadores através do software OLIGO™. Para o desenho de iniciadores degenerados, capazes de se ligarem a genes de duas ou mais espécies, foram analisados alinhamentos das seqüências nucleotídicas realizados no software Jalview.

#### **4.13.4 Amostras**

##### **4.13.4.1 Sangue de aves infectadas**

Foi retirada uma alíquota de 40 µL de sangue de uma ave infectada por *P. gallinaceum* e que apresentava uma taxa de gametócitos circulantes de 3%. O sangue foi imediatamente misturado a 1 mL de TRIZOL (INVITROGEN) e congelado em banho de gelo seco em etanol. A alíquota foi armazenada a -70° C até ser processada.

##### **4.13.4.2 Mosquitos *Aedes fluviatilis* infectados**

Fêmeas adultas (5-7 dias após a emergência) de *Aedes fluviatilis* foram submetidas a um período de jejum de 18-24 horas antes de serem alimentadas, por 30 minutos, em uma ave infectada apresentando gametócitos de *P. gallinaceum*. Após a alimentação, os mosquitos foram mantidos nas mesmas condições da colônia.

A coleta de amostras começou logo após a alimentação dos mosquitos. Grupos de 30 fêmeas foram retirados da gaiola em diferentes momentos; a 0 hora, a 2 horas, a 4 horas, a 16 horas e a 24 horas. As fêmeas retiradas foram anestesiadas a 4°C e seus intestinos foram dissecados em PBS gelado e estéril e imediatamente

transferidos para um tubo estéril em banho de gelo seco e etanol. Após todos os intestinos do grupo serem coletados, 1 mL de TRIZOL foi adicionado ao tubo ainda no banho congelante. As alíquotas foram armazenadas a -70°C.

Sete dias após a alimentação infectante, parte do grupo de mosquitos infectados foi anestesiado em gelo e então dissecados em PBS, com a ajuda de uma lupa Stemi DV4 (ZEISS). Os intestinos foram corados com mercúrio-cromo (2%) para a contagem de oocistos sob um microscópio óptico de campo escuro (OLYMPUS), sob aumento de 200x.

#### **4.13.5 Extração do RNA total das amostras**

A extração de RNA das amostras em TRIZOL (INVITROGEN) seguiu o protocolo proposto pelo fabricante, com algumas modificações. As amostras provenientes de mosquitos infectados foram maceradas com pistilos estéreis e também para estas amostras, uma etapa inicial de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C foi adicionada para a retirada de detritos macroscópicos insolúveis.

As amostras em TRIZOL foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIZOL usado na homogeneização das amostras, os tubos foram agitados vigorosamente e incubados à temperatura ambiente por 3 minutos antes de serem centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação a fase aquosa, contendo o RNA, foi recuperada e transferida para um novo tubo estéril. A fase orgânica, contendo o DNA genômico, foi armazenada a -70°C novamente para posterior extração de DNA. Uma segunda etapa de extração foi incluída para eliminar qualquer contaminação por DNA genômico da fase aquosa. Foram adicionados à fase aquosa 500 µL de uma solução de Fenol: clorofórmio 5:1 pH 4,3, incubou-se por 3 minutos à temperatura ambiente antes de centrifugar a 2.200 x g por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo estéril.

O RNA foi precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol às amostras, que foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado formou um gel visível no fundo dos tubos. O sobrenadante foi descartado.

O sedimento contendo o RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75%, agitado em um vortex e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco ao ar.

O RNA foi dissolvido em 20 µL de água tratada com DEPC, aquecido a 60°C por 10 minutos para evaporação do etanol residual e armazenado a -70°C.

#### **4.13.5.1 Dosagem do RNA**

Logo após a extração dos RNAs, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi retirada e diretamente dosada em um leitor NanoDrop ND-1000.

#### **4.13.5.2 Tratamento com DNase**

Para cada amostra foram digeridos 0,5 µg de RNA total em reações contendo 1 µL de tampão 10 x (Tris-HCl 400 mM, MgSO<sub>4</sub> 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM ,pH 8,0), 1 µL de RQ1 DNase (PROMEGA) e água tratada com DEPC para um volume final de 10 µL. As reações foram realizadas a 37°C por 40 minutos, ao final, 1 µL de solução de parada (EDTA 20 mM, pH 8,0) foi acrescentado e a temperatura foi elevada a 65°C por mais 10 minutos para a inativação da enzima.

#### **4.13.5.3 Síntese do cDNA**

Seguindo o tratamento com DNase, foram acrescentados a cada reação 1 µL de uma solução de dNTPs (10 mM) e 1 µL do iniciador OLIGO dT (10 mM). As reações foram incubadas a 65°C por 2 minutos, colocadas em gelo, acrescidas de 4 µL de tampão 5x (TRIS-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, DTT 50 mM, pH 8,0) para a enzima M-MLV RT e de 2 µL de DTT (100 mM), incubadas a 42°C por 2 minutos, acrescidas de 1 µL da enzima M-MLV RT (PROMEGA) e incubadas por 50 minutos a 42°C. Após os 50 minutos de reação a temperatura foi elevada a 70°C para a inativação da enzima.

Foram feitos controles negativos para as reações de transcrição reversa, onde ao invés da adição da enzima M-MLV RT, adicionou-se 1 µL de água tratada com DEPC.

#### 4.13.6 Extração do DNA genômico de *P. gallinaceum*

O DNA de *P. gallinaceum* foi extraído a partir de uma amostra de zigotos cultivados (0 hora) armazenada em TRIZOL (INVITROGEN). Basicamente, o DNA foi precipitado da fase orgânica pela adição e mistura de 300  $\mu$ L de etanol 100% seguidas por incubação à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com 1 mL de citrato de sódio 0,1 M em etanol 10% por 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1,5 mL de etanol 75%, incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sedimento formado, contendo o DNA foi seco ao ar, dissolvido em 300  $\mu$ L de NaOH 8 mM e armazenado a -20°C.

#### 4.13.7 Amplificação por PCR e RT-PCR

As reações de amplificação foram feitas tanto a partir do DNA de *P. gallinaceum* quanto a partir das diferentes amostras de cDNA (RT-PCR). As amplificações foram feitas em 40 ciclos (25 segundos de aquecimento a 94°C, 30 segundos para anelamento dos iniciadores, 35 segundos a 72°C para extensão dos fragmentos) precedidos por 5 minutos de aquecimento a 94°C e seguidos por uma etapa de extensão final de 3 minutos a 72°C. Os seguintes componentes foram adicionados a todas as reações: 0,125 mM dNTPs, 5 pMoles de cada iniciador, 1,5 mM Mg<sup>2+</sup> e 0,5U de Taq DNA polimerase recombinante (INVITROGEN).

Para reações a partir de DNA genômico foi usado 1  $\mu$ L de DNA molde para a amplificação de todos os genes. Para as RT-PCRs, foram aplicados 1  $\mu$ L ou 1,5  $\mu$ L de cDNA ou controles negativos de acordo com o gene a ser amplificado. As temperaturas de anelamento dos pares de iniciadores específicos foram as seguintes:

**Tabela 1:** Temperaturas de anelamento dos pares de iniciadores para amplificação de genes de *P. gallinaceum*

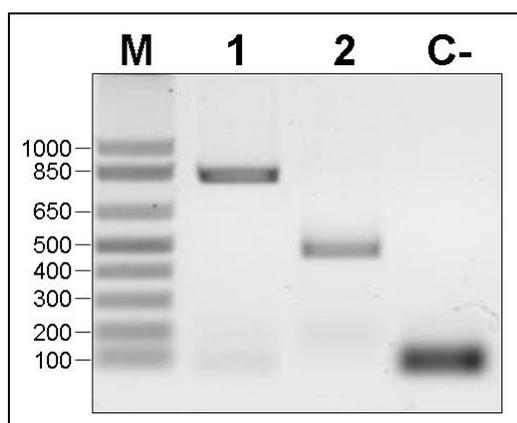
<b>Gene</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>
<b>WARP</b>	<b>56,0</b>
<b>QUITINASE</b>	<b>54,0</b>
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	<b>56,0</b>
<b>P25</b>	<b>57,4</b>
<b>CTRP</b>	<b>55,1</b>
<b>DOZI</b>	<b>57,4</b>
<b>CeLTOS</b>	<b>46,1</b>
<b>MAOP</b>	<b>61,9</b>

Os resultados foram visualizados em géis de agarose 1,3 - 1,8% corados com Brometo de Etídeo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Amplificação da região codificadora da proteína PfWARP e de seu domínio vWA

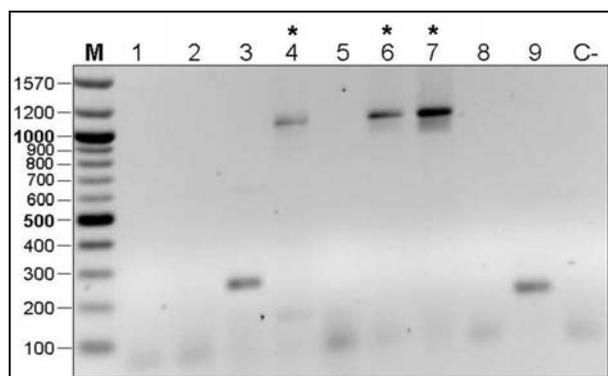
Os dois pares de iniciadores construídos para a amplificação da seqüência gênica de PfWARP e de seu domínio vWA foram capazes de gerar fragmentos com os tamanhos esperados a partir do DNA genômico de *P. falciparum*. O par PfWARP\_F/PfWARP\_R amplificou um fragmento de 819pb, correspondente à seqüência codificadora completa da proteína madura, ou seja, sem o peptídeo sinal (nucleotídeos 1 ao 69) e o par vWA\_F/vWA\_R amplificou um fragmento de 475pb, correspondente ao domínio A de von Willebrand (ver esquema na Figura 6, e amplificação na Figura 7).



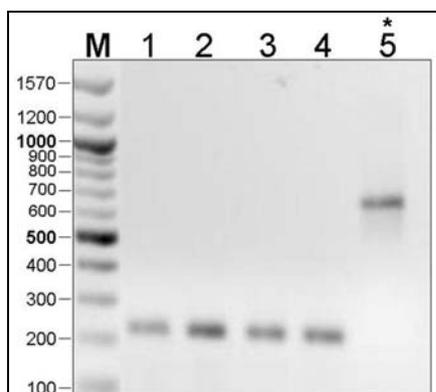
**Figura 7:** Amplificação da região codificadora de PfWARP e de seu domínio A de von Willebrand em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo **M:** Marcador de peso molecular 100pb DNA ladder; **Canaleta 1:** PfWARP; **Canaleta 2:** domínio A de von Willebrand; **C-:** Controle negativo.

#### 5.1.1 Clonagem em vetores TA dos fragmentos amplificados

Os produtos amplificados por PCR foram diretamente ligados a vetores TA e estes foram utilizados na transformação de células competentes *E. coli* TOP10. As PCR de colônias demonstram que o fragmento correspondente a PfWARP foi clonado com sucesso apenas no vetor pGEM-T easy enquanto o fragmento correspondente ao domínio vWA foi clonado apenas em vetor pCR 2.1 TOPO (Figuras 8 e 9).



**Figura 8:** PCR de colônias em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo de Células TOP 10 contendo o vetor pGEM-T easy recombinante. **M:** Marcador de peso molecular 100pb; **1-7:** colônias de bactérias transformadas com vetores contendo a seqüência completa de PfWARP madura; **8-9:** colônias de bactérias transformadas com vetores contendo a seqüência do domínio A de von Willebrand; **C-:** Controle negativo. Colônias positivas e com insertos de tamanho esperado estão marcadas com um asterisco \*.



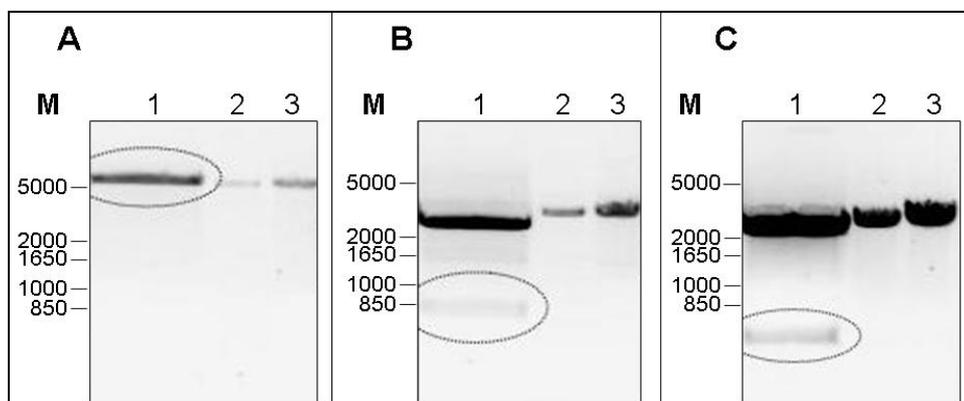
**Figura 9:** PCR de colônias em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo de Células TOP 10 contendo o vetor pCR 2.1 TOPO recombinante. **M:** Padrão de peso molecular 100pb; **1-3:** colônias de bactérias transformadas com vetores contendo a seqüência completa de PfWARP; **4-5:** colônia de bactérias transformadas com vetores contendo a seqüência do domínio A de von Willebrand. Colônias positivas e com insertos de tamanho esperado estão marcadas com um asterisco \*.

## 5.1.2 Sub-clonagem dos insertos em pET32

### 5.1.2.1 Digestão dos fragmentos

O vetor pET32 e os fragmentos que codificam para a PfWARP e seu domínio vWA foram digeridos com *KpnI* e *BamHI* e os produtos das reações de digestão foram excisados dos géis (Figura 10) e posteriormente purificados para a realização das reações de ligação. A digestão do vetor pET32 o linearizou, permitindo a inserção dos fragmentos nos sítios de clonagem utilizados. Como os sítios para *KpnI*

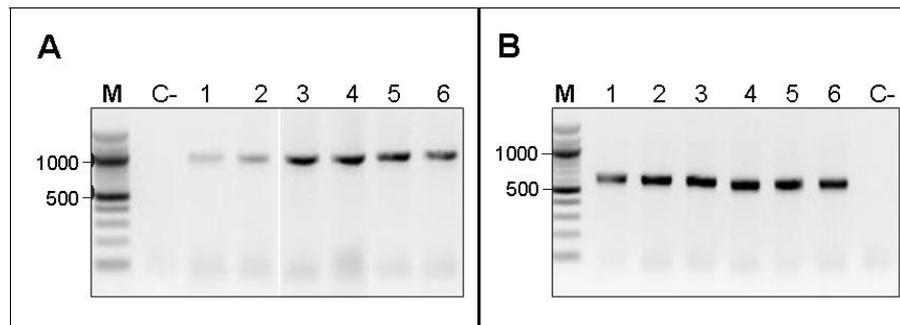
e *Bam*HI se encontram muito próximos no vetor, o tamanho do vetor digerido se iguala ao vetor original (Anexo 3). Os fragmentos de interesse foram recuperados a partir dos vetores TA e a ação das enzimas de restrição, criando extremidades coesivas específicas, permitiu sua posterior ligação de maneira direcionada em pET32.



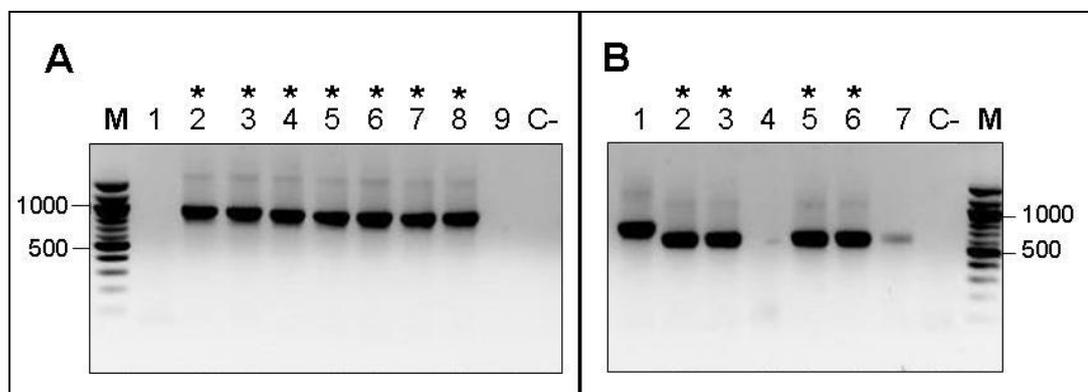
**Figura 10:** Visualização em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo da digestão dos vetores pET32, pGEM-T easy recombinante e pCR2.1 TOPO recombinante por *Kpn*I e *Bam*HI. **M:** Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder; **A) A.1:** pET32 digerido por *Kpn*I e *Bam*HI; **A.2:** pET32 linearizado por *Kpn*I; **A.3:** pET32 não digerido. **B) B.1:** PfWARP clivado de pGEM-T easy por *Kpn*I e *Bam*HI (banda circundada); **B.2:** pGEM-T easy/PfWARP linearizado por *Kpn*I; **B.3:** pGEM-T easy/PfWARP não digerido. **C) C.1:** vWA clivado de pCR2.1 TOPO por *Kpn*I e *Bam*HI (banda circulada); **C.2:** pCR2.1 TOPO/vWA linearizado por *Kpn*I; **C.3:** pCR2.1 TOPO/vWA não digerido.

### 5.1.2.2 Transformações

As cepas TOP10, Origami<sup>TM</sup>(DE3)pLysS e BL21(DE3)pLysS foram transformadas com os vetores pET32 recombinantes. A cepa TOP10 foi transformada porque propicia um meio de armazenamento estável aos vetores por longos períodos de tempo. Origami<sup>TM</sup>(DE3)pLysS e BL21(DE3)pLysS são cepas utilizadas exclusivamente para a produção de proteínas recombinantes sendo que a diferença entre estas cepas é o fato que Origami<sup>TM</sup>(DE3)pLysS foi geneticamente modificada para permitir a produção de proteínas que apresentam pontes dissulfeto em suas estrutura terciária, uma provável característica da proteína WARP madura que possui 7 resíduos de cisteína conservados. Bactérias da cepa Origami<sup>TM</sup> possuem mutações em duas enzimas, glutathiona redutase e tioredoxina redutase, permitindo que haja formação de pontes dissulfeto em seu citoplasma. PCRs de colônias destas cepas confirmaram a presença dos dois insertos clonados a partir do genoma de *P. falciparum* (Figuras 11 e 12).



**Figura 11:** Visualização em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo do PCR de colônias de TOP10 contendo o vetor recombinante pET32. **M:** Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder; **C-:** controles negativos **A) 1-6;** colônias de bactérias transformadas com pET32 contendo a seqüência completa de PfWARP. **B) 1-6;** colônias de bactérias transformadas com pET32 contendo a seqüência completa de vWA.



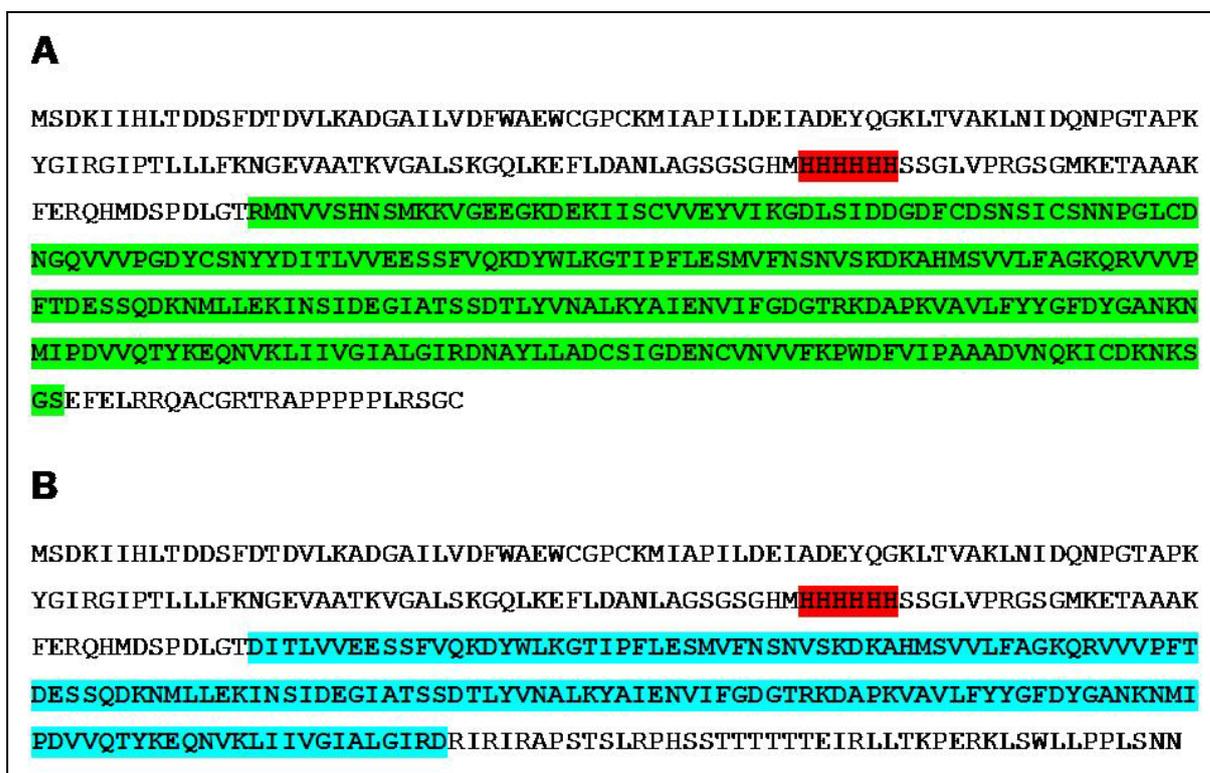
**Figura 12:** Visualização em gel de agarose 1% corado por Brometo de Etídeo de PCR de colônias de Origami™(DE3)pLysS ou BL21(DE3)pLysS contendo o vetor recombinante pET32. **M:** Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder; **C-:** controles negativos **A) 1-9;** colônias de Origami™(DE3)pLysS transformadas com pET32 contendo a seqüência completa de PfWARP. **B) 1-7;** colônias de BL21(DE3)pLysS transformadas com pET32 contendo a seqüência completa de vWA. Colônias positivas e com insertos de tamanho esperado estão marcadas com um asterisco \*.

## 5.2 Proteínas recombinantes

### 5.2.1 Estruturas primárias e pesos moleculares

A tradução *in silico* das seqüências resultantes das ligações entre o vetor pET32 digerido e os fragmentos PfWARP ou vWA resultou na previsão das estruturas primárias das proteínas recombinantes a serem expressas após indução por IPTG das culturas de *E. coli*. Foi predita uma proteína (*PfWARP*) com 446 aminoácidos e com um peso molecular de 48,8 kDa a partir da construção

pET32/PfWARP e outra proteína (*vWAr*) com 349 aminoácidos e com um peso molecular de 38,5 kDa a partir da construção pET32/vWA (Figura 13).

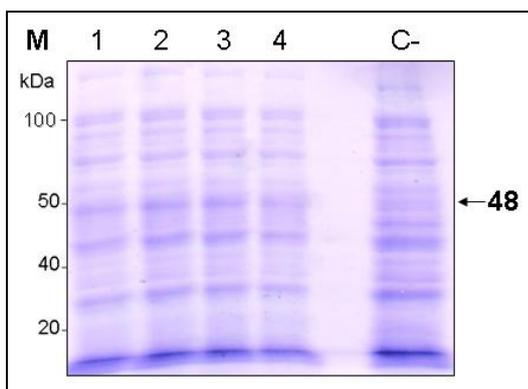


**Figura 13:** Estruturas primárias previstas para as proteínas recombinantes produzidas, após indução por IPTG em cepas de *E. coli*, a partir das construções pET32/PfWARP e pET32/vWA. **A)** Estrutura da proteína a partir da construção pET32/PfWARP (*PfWARP<sub>r</sub>*). **Em VERDE:** seqüência clonada do genoma de *P. falciparum* codificando a proteína WARP madura. **B)** Estrutura da proteína a partir da construção pET32/vWA (*vWAr*). **Em AZUL:** seqüência clonada do genoma de *P. falciparum* codificando o domínio vWA da proteína WARP. **Em VERMELHO:** caudas de histidina (6His).

### 5.2.2 Expressão

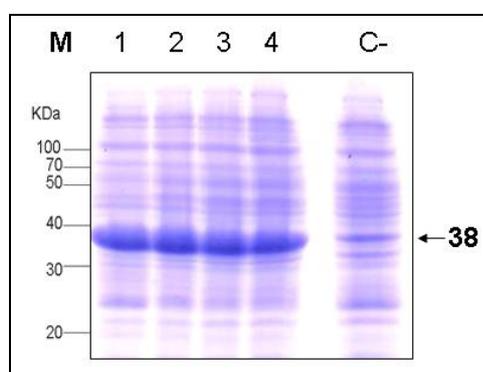
Duas proteínas recombinantes, ambas contendo caudas de histidina, foram produzidas em cepas de *Escherichia coli* após indução por IPTG e o peso molecular de ambas é condizente com aqueles previstos.

A primeira destas proteínas, cujo peso molecular é aproximadamente 48 kDa, contém elementos provenientes do próprio vetor pET32 e a seqüência de aminoácidos da proteína madura WARP de *Plasmodium falciparum* sem o peptídeo sinal (Figura 13A). Esta proteína, nomeada *PfWARP<sub>r</sub>*, foi expressa em baixos níveis pela cepa Origami<sup>TM</sup>(DE3)pLysS mas não foi detectada nas colônias não induzidas (Figura 14).



**Figura 14:** Visualização em gel de poliacrilamida 10% corado por coomassie blue do perfil de proteínas na cultura de bactérias Origami™(DE3)pLysS transformadas com pET32/PfWARP após indução da expressão de *PfWARP* pela adição de IPTG [1mM]. **M:** Marcador Molecular; **1-4:** Culturas induzidas; **C-:** Cultura não-induzida.

A segunda proteína, com um peso molecular de aproximadamente 38 kDa, apresenta, além da cauda de histidina e dos demais elementos do vetor pET32, apenas os aminoácidos correspondentes ao domínio vWA da WARP de *P. falciparum* (Figura 13B). Esta proteína, nomeada *vWAr*, foi expressa em altos níveis pela cepa BL21(DE3)pLysS, sendo a proteína mais abundante produzida pela cultura após indução (Figura 15).

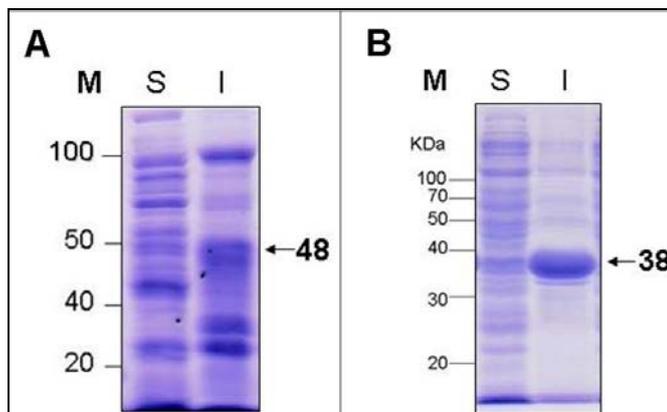


**Figura 15:** Visualização em gel de poliacrilamida 12% corado por coomassie blue do perfil de proteínas na cultura de bactérias BL21(DE3)pLysS transformadas com pET32/vWA após indução da expressão de *vWAr* pela adição de IPTG [1mM]. **M:** Marcador Molecular; **1-4:** Culturas induzidas; **C-:** Cultura não-induzida.

### 5.2.3 Solubilidade

A análise da solubilidade das proteínas recombinantes obtidas indicou que ambas encontravam-se nas frações insolúveis das respectivas culturas bacterianas

(Figura 16). A segregação destas proteínas na fração insolúvel indica a possibilidade delas se encontrarem em corpúsculos de inclusão.

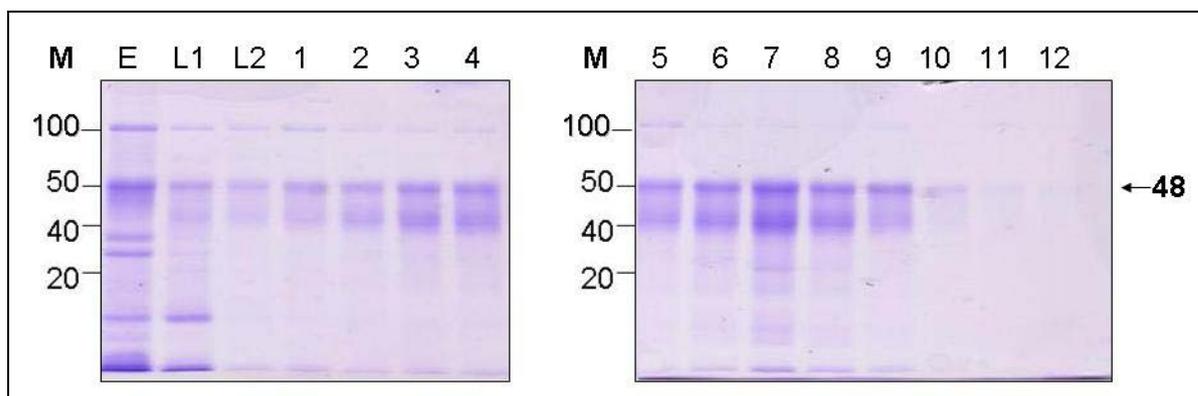


**Figura 16:** Visualização em géis de poliacrilamida 10 e 12% dos perfis protéicos das frações solúveis e insolúveis de culturas de OrigamiTM(DE3)pLysS transformada por pET32/PfWARP ou BI21(DE3)pLysS transformada por pET32/vWA. **A)** Cepa Origami(DE3)pLysS transformada por pET32/PfWARP **B)** Cepa BI21(DE3)pLysS transformada por pET32/vWA. **M:** Marcador Molecular **S:** Frações solúveis; **I:** Frações Insolúveis.

#### 5.2.4 Purificação

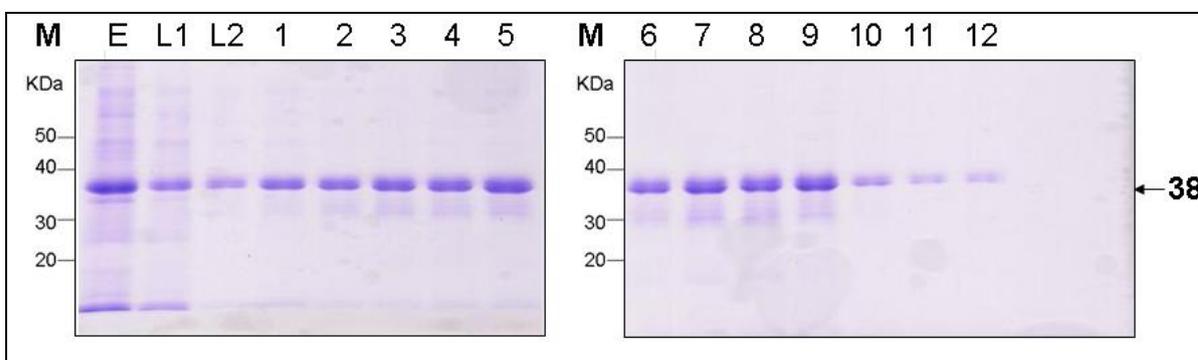
As proteínas recombinantes *PfWARPr* e *vWAr* foram purificadas em condições desnaturantes através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

A análise das frações da purificação de *PfWARPr* por SDS-PAGE mostra que a maior parte das proteínas contaminantes não se ligou à coluna (Figura 17, fração E) e que outras foram perdidas durante as etapas de lavagem (Figura 17, frações L1 e L2). Ainda assim, algumas das frações eluídas apresentaram contaminantes, porém em quantidades inferiores à proteína recombinante. Quanto à proteína recombinante, ela foi encontrada em todas as frações da purificação, inclusive na fração de proteínas que não se ligaram e nas lavagens. Ocorreu certa degradação da proteína recombinante, verificada pela presença de bandas de menor peso molecular, mesmo com a utilização de alguns inibidores de proteases.



**Figura 17:** Visualização em gel de poliacrilamida 10% corado com coomassie blue das frações resultantes da purificação da proteína recombinante *PfWARPr* através de cromatografia de afinidade (resina de níquel). M: Peso Molecular; E: Eluato; L1: Primeira Lavagem ; L2: Segunda Lavagem ; 1-12: Frações da purificação.

Um perfil semelhante ao observado na purificação da primeira proteína foi repetido com a purificação de *vWAR*, com a maioria dos contaminantes não se ligando à coluna ou sendo perdidos nas lavagens. Nas frações da eluição, principalmente nas primeiras, há ainda alguns resquícios de contaminantes mas em um grau inferior ao observado para *PfWARPr*, principalmente de baixo peso molecular, podendo ser indício de degradação da proteína recombinante (Figura 18).



**Figura 18:** Visualização em gel de poliacrilamida 12% corado com coomassie blue das frações resultantes da purificação da proteína recombinante *vWAR* através de cromatografia de afinidade (resina de níquel). M: Peso Molecular; E: Eluato; L1: Primeira Lavagem ; L2: Segunda Lavagem ; 1-12: Frações da purificação.

### 5.2.5 Dosagem

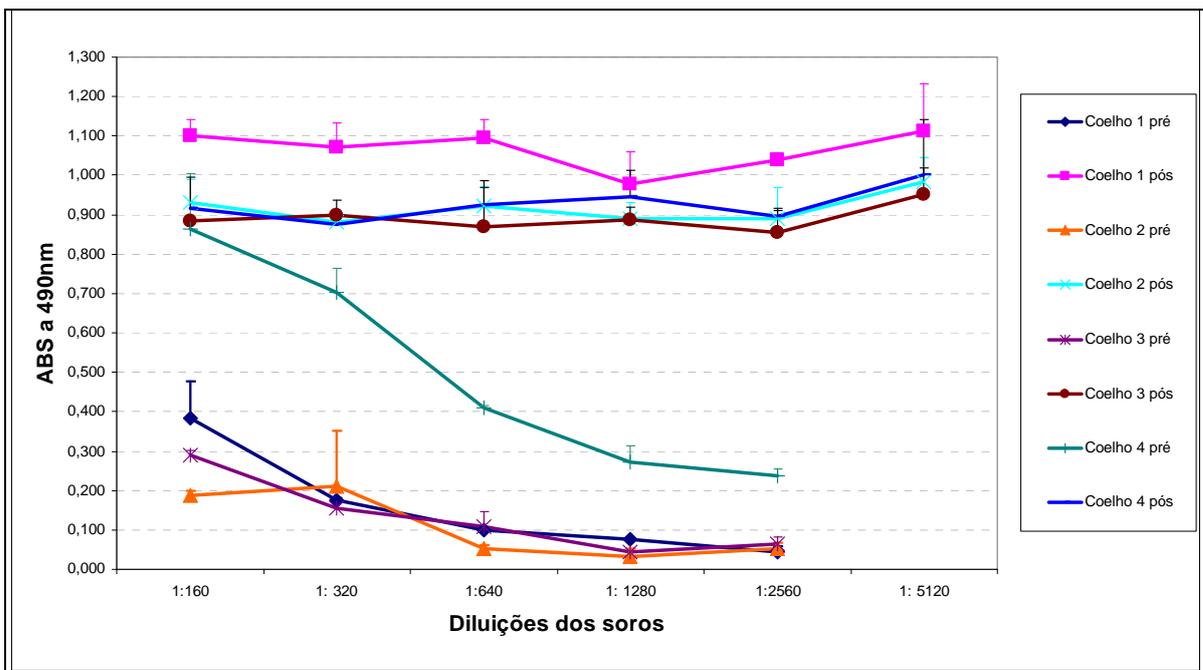
As concentrações das frações e pools resultantes da separação cromatográfica das proteínas recombinantes *PfWARPr* e *vWAR* foram as seguintes:

**Tabela 2:** Concentrações das frações e pools das proteínas recombinantes *PfWARPr* e *vWAr* após separação cromatográfica obtidas pelo método colorimétrico de Bradford.

Proteína recombinante	Frações e pools	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>PfWARPr</i>	Pool 1-2	149,19 $\mu\text{g/mL}$
	Pool 3-6	375,14 $\mu\text{g/mL}$
	Fração 7	894,59 $\mu\text{g/mL}$
	Pool 8-9	403,43 $\mu\text{g/mL}$
<i>vWAr</i>	Pool 3-4	527,61 $\mu\text{g/mL}$
	Fração 5	858,37 $\mu\text{g/mL}$
	Pool 6-8	779,92 $\mu\text{g/mL}$
	Fração 9	1219,29 $\mu\text{g/mL}$

### 5.2.6 Produção de anticorpos policlonais

Os coelhos 1 e 3 foram imunizados com a proteína recombinante *PfWARPr* e os coelhos 2 e 4 com a proteína recombinante *vWAr*. Após as 4 inoculações, os soros coletados dos animais foram testados através de um ELISA (Gráfico 1). Os quatro coelhos imunizados produziram altos títulos de anticorpos específicos contra o domínio vWA, usado na sensibilização da placa. Porém, o soro de um dos animais (coelho 4) apresentou uma reação cruzada ao antígeno (*vWAr*) presente na placa.

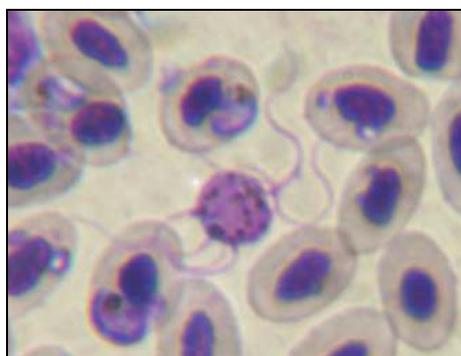


**Gráfico 1:** ELISA de diferentes diluições dos soros imunes e pré-imunes dos 4 coelhos imunizados com as proteínas recombinantes *PfWARPr* e *vWAR* em uma placa sensibilizada com *vWAR*. Diluições dos soros pré-imunes: 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 e 1:2560. Diluições dos soros imunes: 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560 e 1:5120.

### 5.3 Análise da expressão protéica de WARP em formas sexuais de *P. gallinaceum*

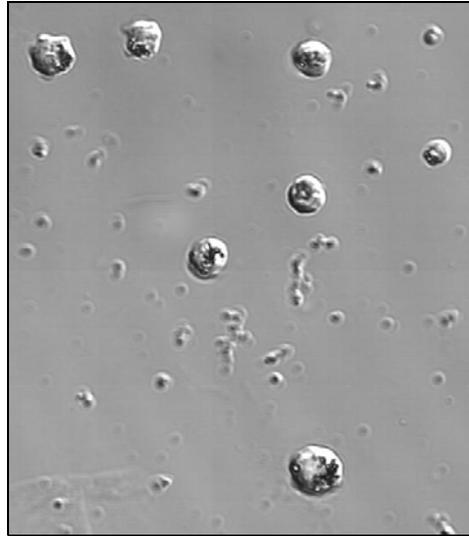
#### 5.3.1 Cultivo de oocinetos de *P. gallinaceum*

A adição de uma solução contendo ácido xanturênico promoveu a exflagelação dos microgametócitos presentes no sangue das aves infectadas (Figura 19).



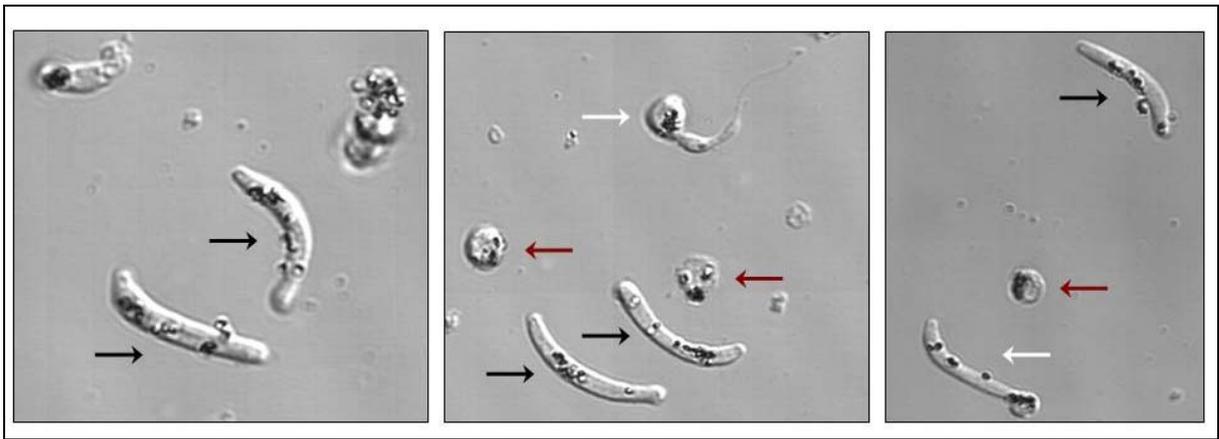
**Figura 19:** Exflagelação de microgametócito. Lâmina de sangue infectado incubado em uma solução contendo ácido xanturênico corada por GIEMSA. Aumento de 1000x.

Após o tempo necessário para que ocorresse a fecundação e depois da etapa de separação celular por um gradiente de densidade, células arredondadas, semelhantes a zigotos, foram observadas em abundância (Figura 20).



**Figura 20:** Zigotos. Células resultantes da fecundação. Contraste Diferencial por Interferência (DIC) em aumento de 630x.

A incubação destas células por 22 a 24 horas resultou no desenvolvimento de oocinetos maduros (Figura 21). Além destes parasitos com a morfologia de um oocineto plenamente desenvolvido, foram observadas também formas imaturas e até mesmo a presença das células arredondadas (Figura 21). Ao longo dos diversos cultivos que foram realizados, as formas maduras representaram aproximadamente de 10 a 40% das células totais ao final da cultura e sua contagem oscilava em torno  $1 \times 10^5$  parasitos/mL de cultura, chegando a  $5 \times 10^5$  parasitos/mL nas culturas com as mais altas taxas de conversão de zigotos em parasitos maduros.

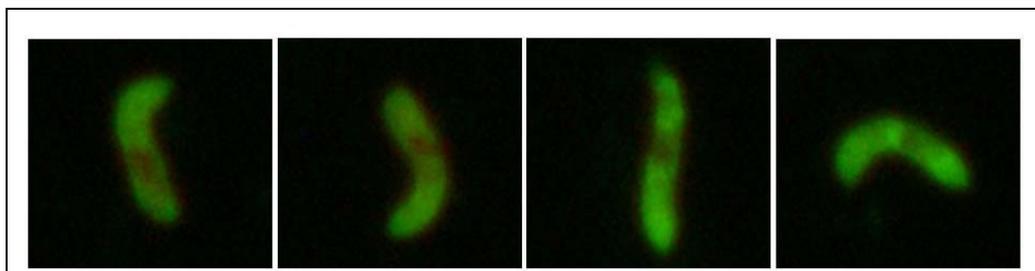


**Figura 21:** Cultura de oocinetos de *Plasmodium gallinaceum*. Formas encontradas após 22 horas de incubação. **Setas negras:** formas maduras; **setas brancas:** formas intermediárias; **setas vermelhas:** formas arredondadas semelhantes aos zigotos. Contraste Diferencial por Interferência (DIC) em aumento de 630x.

O teste de viabilidade celular por exclusão com Azul de Tripán revelou que ao final do cultivo mais do que 90% das células se encontravam viáveis, mesmo as formas imaturas ou as células arredondadas.

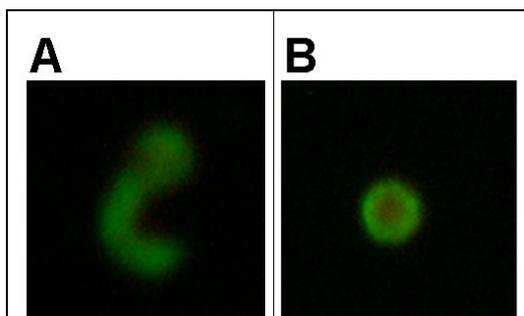
### 5.3.2 Imunofluorescência de oocinetos maduros

Os soros dos 4 coelhos imunizados foram testados quanto à sua capacidade em reconhecer a proteína WARP em parasitos cultivados fixados em lâminas de vidro. Porém, apenas o soro proveniente do animal 2, que havia sido inoculado com a proteína *vWAr*, foi capaz de reconhecer antígenos nos parasitos. Parasitos maduros incubados com o soro pós-imunização deste coelho apresentaram marcação fluorescente distribuída por toda a célula mas aparentemente ausente no núcleo (Figura 22).



**Figura 22:** Imunofluorescência de oocinetos maduros de *P. gallinaceum*. Parasitos incubados com o soro pós-imunização do coelho 2 observados em microscópio invertido de fluorescência a um aumento de 400x.

Além da marcação observada em parasitos maduros, outras formas encontradas após 22 horas de cultivo também apresentaram fluorescência após incubação com o soro policlonal. Formas imaturas, intermediárias no processo de desenvolvimento de oocinetos apresentaram uma marcação semelhante à de parasitos completamente desenvolvidos. Ainda, parasitos com uma morfologia semelhante à de zigotos recém formados, mas que foram encontrados em culturas de 22 horas, também apresentaram uma marcação fluorescente característica, com maior intensidade de sinal próximo à membrana celular (Figura 23).

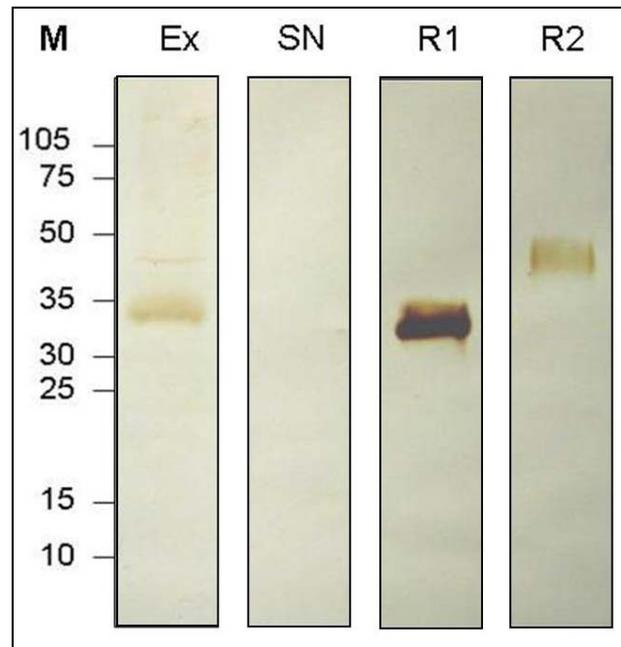


**Figura 23:** Imunofluorescência de parasitos não maduros encontrados em cultura após 22 horas. Parasitos incubados com o soro pós-imunização do coelho 2 observados em microscópio invertido de fluorescência a um aumento de 400x. **A)** Formas imaturas (*retorts*). **B)** Formas arredondadas semelhantes a zigotos recém fecundados.

Diferentes diluições dos soros do coelho 2 (pré e pós-imune) foram testadas e foi determinado que a diluição de 1:80 otimizou a observação das amostras e a comparação entre os soros.

### 5.3.3 Western Blot de extratos de oocinetos maduros

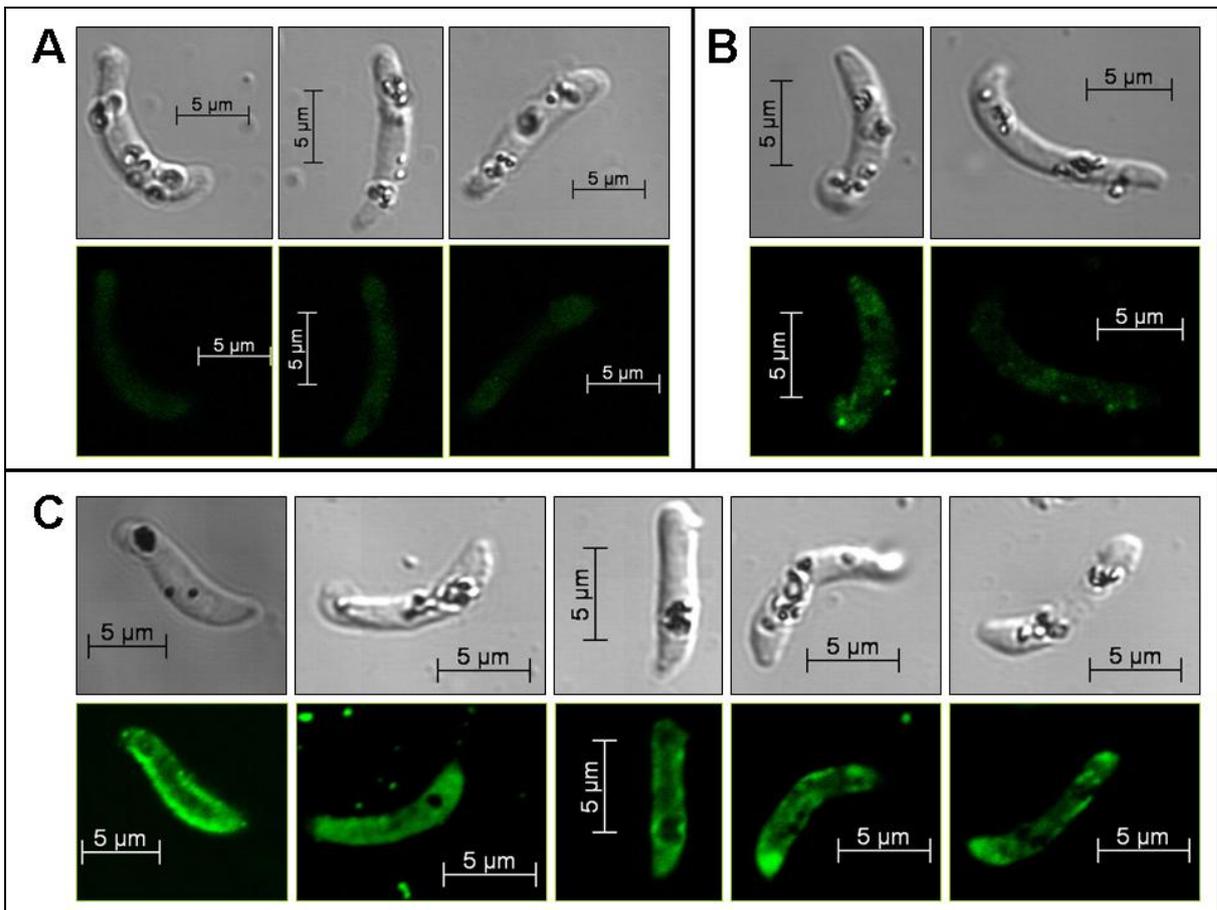
Em um Western blot, o soro do coelho 2 foi testado para a detecção da proteína WARP em um extrato de proteínas de oocinetos maduros cultivados de *P. gallinaceum* cultivados. O soro foi capaz de reconhecer, uma banda de aproximadamente 33 kDa, que corresponde ao tamanho esperado para a proteína PgWARP, ortóloga à proteína PfWARP. Não foi detectada a presença da proteína no sobrenadante da cultura. As proteínas recombinantes *PfWARP*r e *vWAr* foram usadas como controles positivos e também foram reconhecidas pelo soro (Figura 24).



**Figura 24:** Western Blot usando soro policlonal anti-*vWAr* 1:500. **M:** Marcador Molecular; **Ex:** Extrato de oocinetos maduros; **SN:** Sobrenadante da cultura **R1:** proteína recombinante *vWAr*; **R2:** proteína recombinante *PfWARPr*.

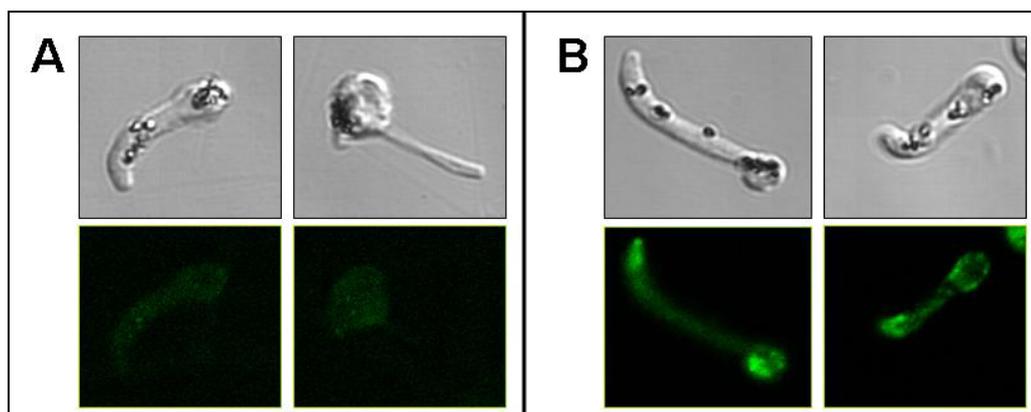
#### 5.3.4 Microscopia confocal de formas sexuais

A microscopia confocal revelou que, em oocinetos completamente desenvolvidos, a proteína WARP se concentra na extremidade apical do parasito, possui uma distribuição granular e não uniforme no citoplasma e uma marcação bem delineada em regiões do contorno celular (Figura 25C). Esta marcação foi específica para oocinetos incubados com o soro pós-imunização do coelho 2. A incubação com o soro pré-imune (Figura 25B) retirado do mesmo animal resultou em um sinal semelhante ao obtido em observações de parasitos que foram somente fixados (Figura 25A).



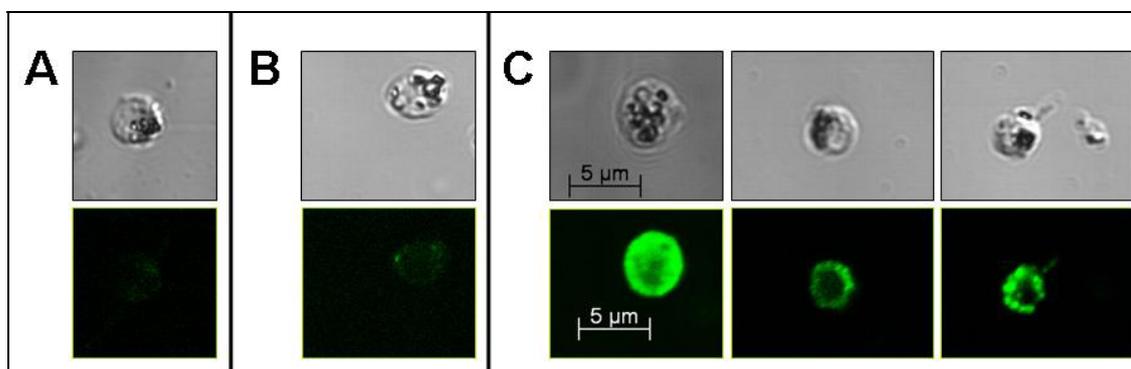
**Figura 25:** Microscopia Confocal de oocinetos plenamente desenvolvidos. **(A)** Oocinetos apenas fixados em paraformaldeído 4%; **(B)** Oocinetos incubados com soro pré-imune (coelho 2) 1:80 + anti-IgG de coelho-FITC 1:80; **(C)** Oocinetos incubados com soro anti-WARP 1:80 + anti-IgG de coelho-FITC 1:80. Aumento de 630x.

Assim como observado nos experimentos de imunofluorescência, as formas imaturas presentes em culturas de 22 horas apresentaram uma marcação fluorescente similar em intensidade às das formas maduras (Figura 26B). Estágios intermediários do desenvolvimento sexual (até a formação de oocinetos) de *P. gallinaceum*, denominados *retorts*, foram marcados principalmente ao redor do corpo residual do zigoto (uma estrutura arredondada) e na extremidade apical anterior que se desenvolve como uma protuberância alongada que se afasta do corpo arredondado (Figura 26).



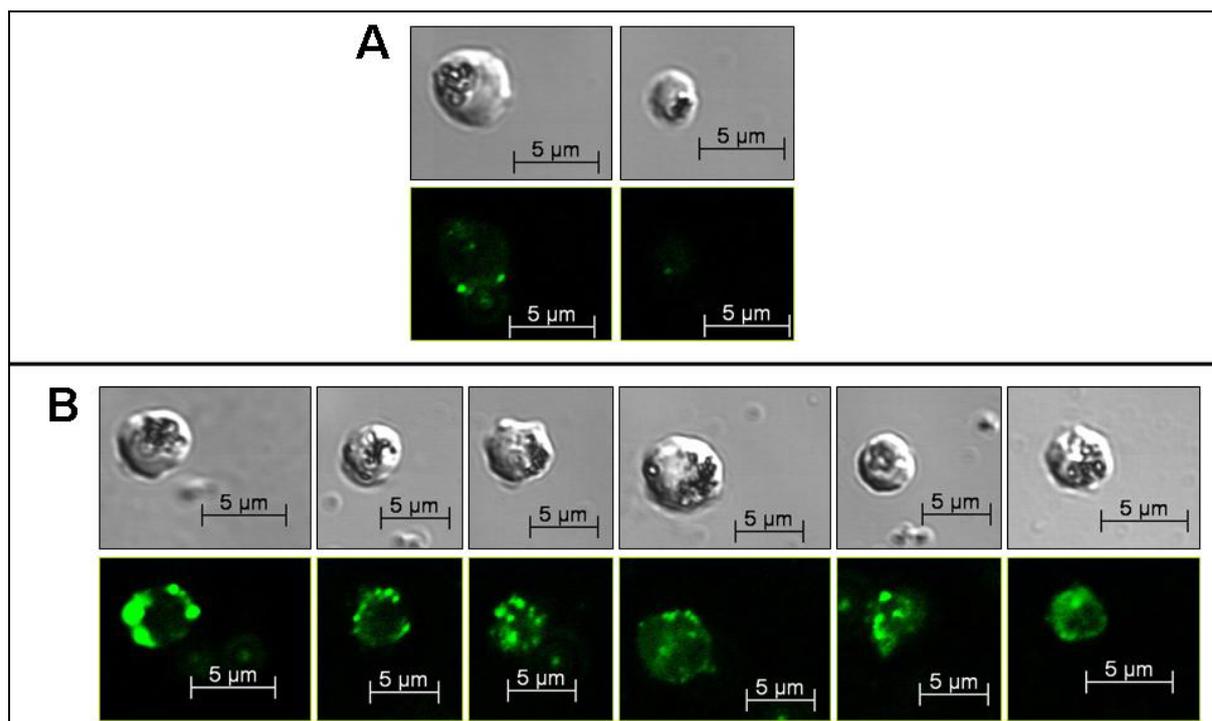
**Figura 26:** Microscopia Confocal de parasitos em formas intermediárias de desenvolvimento. **(A)** Parasitos apenas fixados em paraformaldeído 4%; **(B)** Parasitos incubados com soro anti-WARP 1:80 + anti-IgG de coelho-FITC 1:80. Aumento de 630x.

As células que mesmo após passadas 22 horas mantiveram sua forma arredondada também apresentaram marcação fluorescente, e como observada anteriormente por fluorescência comum, concentrada próxima à região da membrana celular. Em alguns casos a marcação observada nestas células assumiu aspectos vesiculares ou de concentração em regiões bem definidas (Figura 27).



**Figura 27:** Microscopia Confocal de parasitos com morfologia esférica após 22 horas de cultivo. **(A)** Parasito apenas fixado em paraformaldeído 4%; **(B)** Parasito incubado com soro pré-imune (coelho 2) 1:80 + anti-IgG de coelho-FITC 1:80; **(C)** Parasitos incubados com soro anti-WARP 1:80 + anti-IgG de coelho-FITC 1:80. Aumento de 630x.

A proteína WARP foi detectada também em zigotos fixados logo após a fecundação, no momento do início do cultivo (Figura 28). A proteína parece se concentrar na periferia celular, próxima à membrana celular e sua distribuição é não-uniforme, restrita a apenas algumas regiões, assim como foi observado para as células de morfologia esférica no final da cultura.



**Figura 28:** Microscopia Confocal de zigotos coletados a 0 hora do cultivo. **(A)** Zigotos incubados com soro pré-imune (coelho 2) 1:80 + anti-IgG de coelho-FITC 1:80; **(B)** Zigotos incubados com soro anti-WARP 1:80 + anti-IgG de coelho-FITC 1:80. Aumento de 630x.

## 5.4 Análise da expressão de mRNAs de genes de *P. gallinaceum*

### 5.4.1 Identificação de genes no genoma de *P. gallinaceum*

O Wellcome Trust Sanger Institute coordena um projeto de seqüenciamento parcial por shotgun do genoma de *Plasmodium gallinaceum* ([www.sanger.ac.uk/Projects/P\\_gallinaceum](http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_gallinaceum)), e estão disponíveis para análise algumas seqüências com uma cobertura de 3x do genoma. Porém, apesar da disponibilidade, estes dados não foram anotados, o que torna impossível a obtenção direta de seqüências codificadoras de genes de *P. gallinaceum*.

Portanto, o primeiro passo para a identificação dos genes de interesse em *P. gallinaceum* foi a identificação de seus ortólogos em outras duas espécies, *P. falciparum* e *P. berghei*. Uma busca no banco de dados PlasmoDB resultou na identificação de ortólogos para todos os genes nas duas espécies alvo (Tabela 3).

**Tabela 3:** Lista dos identificadores do PlasmoDB para os genes ortólogos em *P. falciparum* e *P. berghei*.

Gene	<i>P. falciparum</i>	<i>P. berghei</i>
<b>WARP</b>	PF08_0136b	PB000020.03.0
<b>QUITINASE</b>	PFL2510w	PB001032.02.0
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	PFI0180w	PB000857.00.0
<b>P25</b>	PF10_0303	PB000266.01.0
<b>CTRP</b>	PFC0640w	PB000233.00.0
<b>DOZI</b>	PFC0915w	PB000603.01.0
<b>CeLTOS</b>	PFL0800c	PB301106.00.0
<b>MAOP</b>	PFI1145w	PB000936.01.0

As seqüências de nucleotídeos, assim como as seqüências de aminoácidos das proteínas de interesse das duas espécies foram recuperadas do PlasmoDB e usadas na construção de um banco de dados local.

Através do alinhamento destas seqüências contra o banco de dados de *P. gallinaceum*, ortólogos putativos para todos os genes estudados foram encontrados. Suas seqüências foram recuperadas, traduzidas *in silico* e adicionadas ao banco de dados local.

#### 5.4.2 Desenho de pares de iniciadores para genes de *P. gallinaceum*

Para cada gene estudado foi desenhado um par de iniciadores que amplificasse um fragmento menor que 200pb a partir do mRNA, para que estes mesmos pares pudessem ser eventualmente utilizados em experimentos de Real-Time RT-PCR.

Os iniciadores foram baseados nas seqüências obtidas do genoma de *P. gallinaceum* ou em alinhamentos entre estas seqüências e ortólogos de *P. falciparum* e *P. berghei*.

Os iniciadores **F** (senso) para os genes  $\alpha$ -Tubulina e CTRP possuem bases degeneradas, permitindo que estes oligonucleotídeos sejam também empregados para a amplificação dos genes ortólogos em *P. falciparum*.

Tabela 4: Pares de iniciadores para genes de *P. gallinaceum*

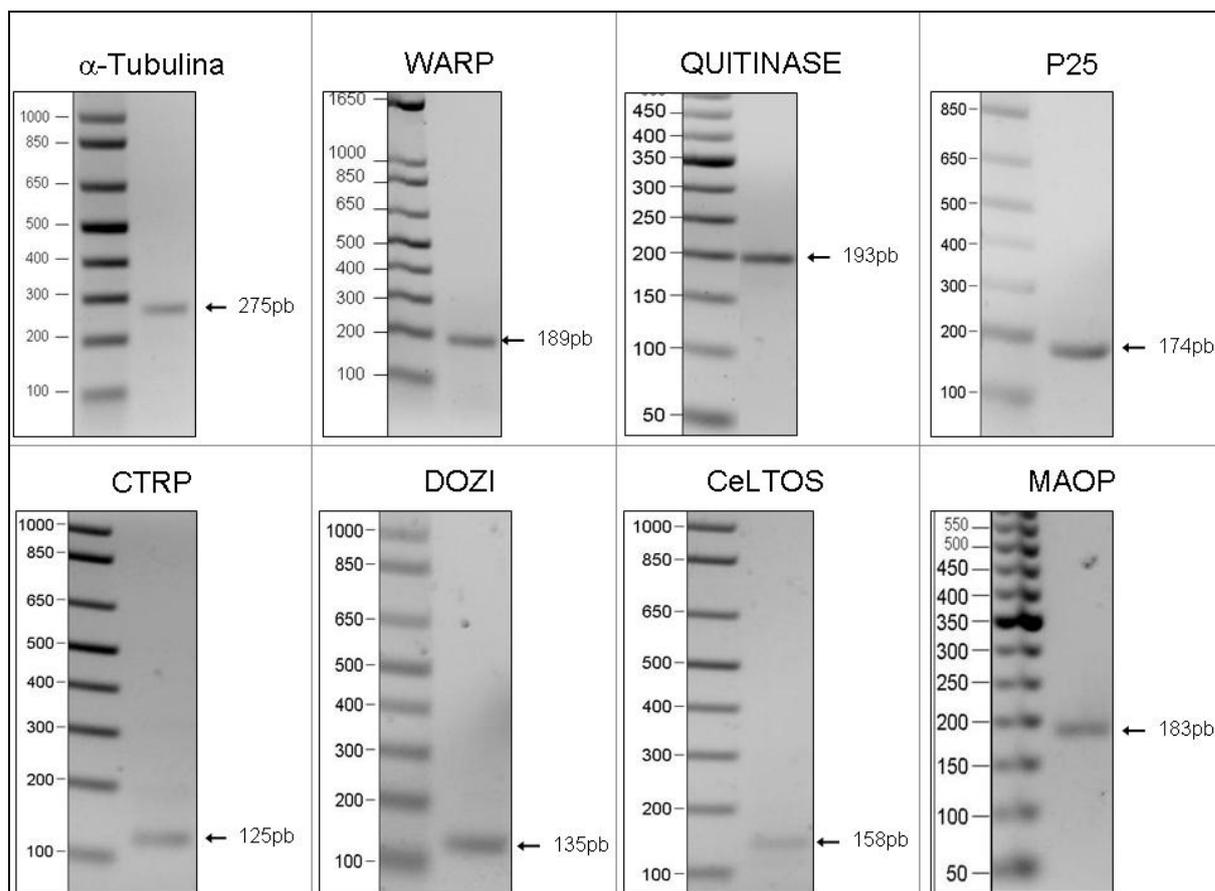
Gene	Iniciador F (5'-3')	Iniciador R (5'-3')	tamanho
<b>WARP</b>	GGAGATGGCACTCGAAAGG	CAATAGAACA(AG)TC(AT)GCAAGTAA *	<b>189</b>
<b>QUITINASE</b>	TTGGTTTAGAATACATAGGAATA	AACGTCAATTCCATCAAATCC	<b>193</b>
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	AGAAAC(AG)GG(AG)GCAGGAAAAC *	AGGATGAAATAATTGACGATAA	<b>105</b>
<b>P25</b>	AAGTAAAGAAAACAATAACACG	ATTAAATAGTGAAAAAGAAATGC	<b>174</b>
<b>CTRP</b>	(CT)TATGTAATGA(GA)TGGGAAGAATG *	ACCCATATTTCCATTTATATCTT	<b>125</b>
<b>DOZI</b>	AATAGAGTTTTTCATGATTTTAG	AATATGTTTCTGAATTTTTTGGGA	<b>135</b>
<b>CeLTOS</b>	TCTTCATTTATTTTACAACCCC	AGGACAAATAAAAAGACACGC	<b>158</b>
<b>MAOP</b>	CTTCTGCTGGCTTTGGTTTATT	TTATCCTTTATGCTTTTTGCCC	<b>183</b>

\*( ) – Indicam nucleotídeos degenerados em iniciadores que podem ser usados para a amplificação dos genes ortólogos em *P. falciparum*.

#### 5.4.3 Amplificação a partir do DNA genômico de *P. gallinaceum*

Todos os genes de *P. gallinaceum* para os quais foram desenhados pares de iniciadores específicos foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico deste parasito (Figura 29). Os tamanhos dos fragmentos amplificados, previstos com base nas seqüências recuperadas do Projeto Genoma de *P. gallinaceum*, foram confirmados para todos os genes.

O único desses genes que possui um íntron entre as seqüências de iniciadores desenhados é o que codifica para a proteína  $\alpha$ -Tubulina. Para este gene a amplificação a partir de DNA genômico gerou um fragmento de 275pb, enquanto o tamanho esperado para amplificações a partir de cDNA seria de 105pb.

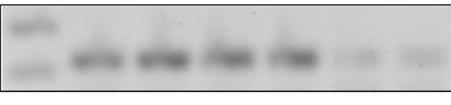
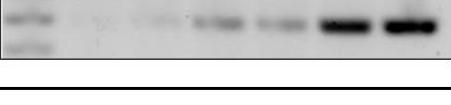


**Figura 29:** PCR de genes a partir do DNA genômico de *Plasmodium gallinaceum*. Genes amplificados:  $\alpha$ -Tubulina, WARP, QUITINASE, P25, CTRP, DOZI e CeLTOS .

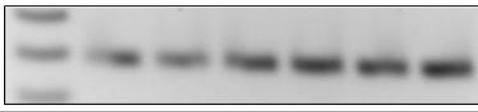
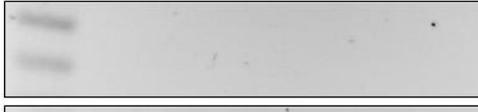
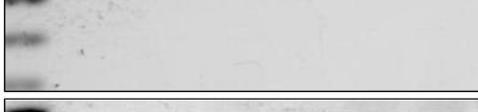
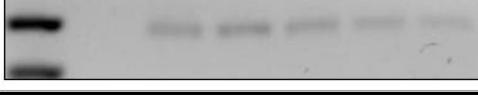
#### 5.4.4 Amplificação a partir dos cDNAs de mosquitos infectados

O único gene que não foi amplificado a partir de nenhuma das amostras testadas foi CeLTOS. Os demais apresentaram variáveis padrões de expressão em relação ao tempo de infecção. RNAs mensageiros para  $\alpha$ -Tubulina foram detectados em todas as amostras, porém com um sinal mais fraco a partir de 16 horas. A  $\alpha$ -Tubulina foi adicionada ao estudo por ser um gene de expressão constitutiva (Ecker *et al.*, 2007). DOZI e P25, Quitinase e WARP também foram encontrados em todas as amostras, sendo que o sinal permaneceu constante para os 3 primeiros e apresentou um aumento gradual para WARP.

Para nenhum dos genes estudados foi observada qualquer amplificação a partir dos controles sem a enzima transcriptase reversa, mesmo após os 40 ciclos de amplificação, indicando a ausência de contaminação por DNA genômico das amostras.

GENE	M	G	0	2	4	16	24	RT	pb
$\alpha$ -Tubulina								-	105
								+	
DOZI								-	135
								+	
P25								-	174
								+	
WARP								-	189
								+	

**Figura 30:** Cinética da expressão de mRNAs de genes de *P. gallinaceum* por RT-PCR. Genes amplificados:  $\alpha$ -Tubulina, DOZI, P25, WARP, QUITINASE. **M:** Marcador Molecular; **G:** amostra de cDNA a partir de sangue contendo gametócitos; **0, 2, 4, 16 e 24:** Horas após a alimentação dos mosquitos; **RT+:** cDNA sintetizados pela enzima Transcriptase Reversa. **RT-:** controles negativos nos quais não foi adicionada a enzima Transcriptase reversa às amostras de RNA. **bp:** Tamanho em pares de bases do fragmento amplificado.

GENE	M	G	0	2	4	16	24	RT	pb
QUITINASE								-	
								+	193
CeLTOS								-	
								+	158
CTRP								-	
								+	125
MAOP								-	
								+	183

**Figura 31:** Cinética da expressão de mRNAs de genes de *P. gallinaceum* por RT-PCR. Genes amplificados: CeLTOS, CTRP e MAOP. **M:** Marcador Molecular; **G:** amostra de cDNA a partir de sangue contendo gametócitos; **0, 2, 4, 16 e 24:** Horas após a alimentação dos mosquitos; **RT+:** cDNA sintetizados pela enzima Transcriptase Reversa. **RT-:** controles negativos nos quais não foi adicionada a enzima Transcriptase reversa às amostras de RNA. **pb:** Tamanho em pares de bases do fragmento amplificado.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 A expressão da proteína WARP em oocinetos maduros

Desde sua identificação em *P. berghei*, WARP foi sempre descrita como uma proteína micronemal provavelmente secretada. Esta observação é resultante da análise da sua estrutura primária, que indicou a presença de um peptídeo sinal, e de observações feitas por ensaios de imunofluorescência, que detectaram WARP principalmente na porção anterior de oocinetos, e ensaios de microscopia eletrônica, que confirmaram a presença de WARP dentro de vesículas micronemais (Yuda *et al.*, 2001).

Outro estudo, realizado por Li *et al.*, em 2004 usando oocinetos de *P. gallinaceum*, também observou, por microscopia eletrônica, WARP em vesículas micronemais de oocinetos maduros, mas o mesmo estudo, baseando-se em experimentos de imunofluorescência, reportou que PgWARP não se concentrava na extremidade apical de oocinetos.

A proteína WARP de *P. gallinaceum* apresenta 62% de identidade quando comparada à sua ortóloga em *P. falciparum*. Ensaios de alimentação artificial, através de membrana, com soro anti-PfWARP foram capazes de inibir o desenvolvimento de oocistos de *P. gallinaceum* em *Aedes aegypti*, demonstrando haver uma alta reatividade cruzada entre as duas espécies (Li *et al.*, 2004), que pode ser explicada pela proximidade genética observada utilizando alguns marcadores moleculares (Escalante e Ayala, 1994; McCutchan *et al.*, 1996).

Esta proximidade genética foi também explorada em nosso estudo, pois foram usados anticorpos policlonais produzidos em um coelho imunizado com uma proteína recombinante baseada na seqüência de aminoácidos do domínio vWA da proteína WARP de *P. falciparum* (Figura 13B) e estes anticorpos foram capazes de reconhecer a proteína WARP em extratos de oocinetos de *P. gallinaceum* em ensaios de Western Blot (Figura 24). A razão de termos usado a seqüência de *P. falciparum* como base para a produção de anticorpos é a possibilidade do emprego destes anticorpos em estudos de bloqueio de transmissão de *P. falciparum* em vetores de malária de ocorrência natural no Brasil. Porém, para alcançarmos os objetivos do presente estudo, era necessário trabalhar com um modelo cujo ciclo completo pudesse ser reproduzido em condições laboratoriais, por isso a escolha de trabalharmos com *P. gallinaceum*.

Estes anticorpos foram usados em experimentos de microscopia confocal, nos quais foram observados oocinetos maduros de *P. gallinaceum*, cultivados *in vitro* e posteriormente fixados. As imagens revelaram um padrão característico, no qual a proteína WARP apresenta uma distribuição citoplasmática granular não-uniforme com uma nítida concentração na região apical dos parasitos (Figura 25), resultados que estão de acordo com as observações feitas por Yuda *et al.* (2001) para *P. berghei*. Este padrão seria o esperado para uma proteína micronemal, a distribuição citoplasmática aqui observada indicaria a presença de WARP no retículo endoplasmático do parasito, onde é feito o processamento de proteínas secretadas e que no oocineto é bem desenvolvido e extenso (Sherman, 1998 e Sinden, 1999), e a concentração apical indicaria o armazenamento de WARP em vesículas micronemais maduras, prontas para serem secretadas.

A microscopia confocal apresenta como uma de suas vantagens a capacidade de visualização em diferentes planos focais, mesmo de estruturas internas da amostra, sem a necessidade de cortes histológicos utilizando micrótomo. Assim é possível realizar uma observação mais detalhada de oocinetos fixados em comparação com a imunofluorescência convencional. Uma observação feita por nós baseada exclusivamente nos resultados da microscopia confocal foi a detecção de WARP em regiões do contorno celular dos parasitos. Resta-nos a dúvida, porém, se WARP estaria sendo apresentada no lado exterior da membrana plasmática ou se esta marcação seria da periferia citoplasmática, pois, como outros marcadores não foram utilizados nestes experimentos, não é possível saber com exatidão a localização da proteína. WARP não possui região transmembrana, não sendo, portanto uma proteína de membrana, mas uma hipótese apresentada por Yuda *et al.* (2001) propõe que WARP poderia interagir com outras proteínas do próprio parasito, inclusive proteínas de membrana, podendo explicar esta observação.

Outra possibilidade seria a acumulação de WARP no espaço supra alveolar. Oocinetos apresentam uma estrutura denominada complexo pelicular, formada pela membrana celular e por uma vesícula localizada logo abaixo da membrana. A vesícula possui uma morfologia achatada, com suas duas camadas bipolares praticamente superpostas uma à outra e com poros formados por complexos multiprotéicos que atravessam ambas. A vesícula envolve todo o citoplasma do oocineto, formando um tubo selado por uma única sutura longitudinal. Os microtúbulos do citoesqueleto são conectados à vesícula através de proteínas da sua membrana interior. Entre a vesícula e a membrana plasmática forma-se um

compartimento denominado espaço supra alveolar (Raibaud *et al.*, 2001). Várias proteínas relacionadas à locomoção por deslizamento, que é realizada por organismos do filo Apicomplexa, estão localizadas no espaço supra alveolar, como, por exemplo, Miosina A e F-actina (Baum *et al.*, 2006).

Se a presença de WARP neste compartimento for confirmada isso permitiria uma nova interpretação sobre sua função, ligando-a a porção intracelular da maquinaria de locomoção de oocinetos.

## 6.2 A expressão da proteína WARP em zigotos e em oocinetos imaturos

O estudo que descreve a proteína WARP mostra, através de um Western Blot, que sua expressão se iniciaria 12 horas após o início do cultivo *in vitro* de oocinetos (Yuda *et al.*, 2001). Neste momento, os oocinetos ainda não se encontram completamente maduros e apresentam uma morfologia característica, com uma protuberância que se alonga e se distancia gradativamente da forma arredondada residual do zigoto (Aikawa *et al.*, 1984) sendo chamados de *retorts*.

Porém, em nossos experimentos, observamos uma marcação específica com anticorpos anti-WARP em zigotos recém fertilizados através de microscopia confocal (Figura 28). Estas células apresentaram um padrão de fluorescência característico, com WARP sendo detectada principalmente na periferia do citoplasma e concentrando-se em ponto distintos e bem delineados, que poderiam indicar a presença de vesículas.

Esta diferença em relação ao tempo de aparecimento de WARP entre as observações poderia ser uma diferença intrínseca entre as espécies estudadas, uma vez que Yuda *et al.* (2001) utilizaram o *P. berghei* em seus experimentos. Outra explicação seria o fato que ambos os parasitos foram provenientes de culturas *in vitro*. Por mais que estes sistemas de cultivo consigam gerar oocinetos maduros ao final, ainda assim suas condições são bastante distintas daquelas encontradas pelos parasitos no interior do intestino do vetor e é possível que essa diferença modifique, de maneiras ainda desconhecidas, o desenvolvimento das formas sexuais cultivadas e acabe por gerar artefatos de observação. Não obstante, as próprias condições de cultivo para oocinetos de *P. gallinaceum* (kaushal *et al.*, 1984) e *P. berghei* (Munderloh e Kurtti, 1987) diferem entre si e poderiam responder por diferenças observadas entre as espécies.

Durante o procedimento de cultivo de oocinetos, após a etapa de fertilização, as células devem ser separadas por um gradiente de densidade, lavadas diversas vezes e purificadas por uma reação de aglutinação. Este procedimento leva aproximadamente 1 hora e 30 minutos, o que significa que as células observadas ao microscópio confocal são na verdade zigotos que já se desenvolveram por certo tempo. Como citado anteriormente, a proteína P25 pode ser detectada em zigotos 30 minutos após a fertilização (del Carmen Rodriguez *et al.*, 2000) sendo apresentada na superfície, o que significa que a maquinaria de transporte de proteínas está ativa. Trabalhos recentes, que serão discutidos em maiores detalhes posteriormente, indicam que a regulação da expressão de P25 e WARP seja controlada pelo mesmo mecanismo, o que poderia explicar a presença de WARP ainda nos estágios iniciais do desenvolvimento pós-fertilização.

Outra observação, proveniente tanto da microscopia confocal quanto da imunofluorescência convencional, foi a marcação de células que mesmo após 22 horas de cultivo conservaram a morfologia arredondada de zigotos. Uma quantidade considerável de parasitos não se desenvolve em cultivo, mas o fato de que mesmo estas células parecem expressar a proteína WARP pode significar que os eventos e mecanismos que garantem sua expressão se manifestam no início do desenvolvimento pós-fertilização, antes mesmo dos mecanismos que levam zigotos a transformarem-se em oocinetos.

Após 22 horas de cultivo, além de oocinetos maduros e células ainda arredondadas, foram observados também alguns parasitos que se encontravam no meio do processo de diferenciação e apresentavam formas intermediárias (Figura 26), porém não foi possível identificar se eles se desenvolveriam mais ou se haviam estagnado no meio do processo. Estes parasitos também apresentaram marcação fluorescente, indicando que WARP estava sendo expressa. A marcação concentrava-se em duas localidades, na extremidade arredondada posterior residual do zigoto, onde mais uma vez parecia estar restrita à periferia celular, e na extremidade apical, na protuberância onde se encontram o complexo apical e os micronemas já então formados.

### **6.3 A função da proteína WARP**

Baseados na presença do domínio fator A de von Willebrand com propriedades adesivas e no fato de tratar-se de uma proteína micronemal, solúvel e

secretada, Yuda *et al.* (2001) hipotetizaram que a função de WARP estaria relacionada ao processo de invasão epitelial. WARP atuaria como um substrato adesivo ligando-se às moléculas tanto de superfície do parasito quanto de células epiteliais do intestino. A observação feita pelos mesmos pesquisadores de que WARP formaria complexos oligoméricos *in vitro*, provavelmente através de pontes dissulfeto intercadeia, reforçaria esta hipótese, pois a estrutura multimérica potencializaria a capacidade de adesão ao aumentar o número de sítios de ligação por molécula.

Ao considerarmos que WARP poderia ser expressa desde zigotos recém fertilizados (1 a 2 horas após a fertilização) podemos inferir que WARP tenha alguma função ainda não esclarecida, relacionada aos primeiros momentos do desenvolvimento pós-fertilização. Um bom exemplo seria a proteína P25, já citada anteriormente, que é expressa desde zigotos (30 minutos após a fertilização) (del Carmen Rodriguez *et al.*, 2000) e persiste durante todo o desenvolvimento sexual, sendo detectada até mesmo em oocistos (Lensen *et al.*, 1992). Pelo menos duas funções distintas já foram atribuídas a esta proteína. Parasitos *P. berghei knockout* para P25 mostraram uma maior sensibilidade a ação de tripsinas, indicando um papel protetor desta proteína (del Carmen Rodriguez *et al.*, 2000) e P25 está também envolvida nos processos de locomoção e invasão epitelial (Baton e Ranford-cartwright, 2005). Um fato interessante, e que será discutido em maiores detalhes posteriormente, é a descoberta de um mecanismo de regulação da expressão gênica que parece controlar P25 e WARP, além de vários outros genes.

Considerando-se as semelhanças de expressão entre P25 e WARP, é plausível imaginar que existam possibilidades não exploradas acerca do papel desempenhado pela proteína WARP. O próprio domínio Fator A de von Willebrand, que praticamente define a proteína WARP e que geralmente é atribuído às proteínas extracelulares de adesão, pode também ser encontrado em proteínas com as mais diversas funções. Domínios vWA são encontrados, por exemplo, em proteínas envolvidas com transcrição, reparo de DNA, transporte de membranas, proteassoma, quelatases, fatores do complemento, inibidores de tripsina, etc. (Whitaker e Hynes, 2002).

## 6.4 Regulação do desenvolvimento sexual – inferências sobre *P. gallinaceum*

A repressão traducional é um mecanismo de regulação gênica comum em organismos multicelulares do reino Metazoa e parece ser crítico para o desenvolvimento de zigotos e embriões. Este mecanismo também ocorre em organismos do gênero *Plasmodium* (Braks *et al.*, 2007). A repressão traducional é um mecanismo regulador pós-transcricional, no qual mRNAs específicos produzidos em células da linhagem materna são estocados e têm sua tradução silenciada até que ocorra a fertilização. Assim, zigotos recém formados já possuiriam um repertório de mRNAs de proteínas essenciais ao seu desenvolvimento e poderiam iniciar prontamente a síntese protéica (Gebauer e Hentze, 2005). O silenciamento geralmente envolve a interação entre os mRNAs e proteínas que se ligam a motivos presentes nas seqüências reguladoras de mRNAs, levando à formação de complexos multiméricos que influenciam na estabilidade e na acessibilidade dos mRNAs (Wilkie *et al.*, 2003).

Em *Plasmodium* especificamente, o fenômeno de repressão traducional já havia sido descrito para as proteínas P25 e P28 de *P. berghei*, cujos transcritos são encontrados em gametócitos, mas cujas proteínas são detectadas somente após a ativação dos gametas (Paton *et al.*, 1993). Os detalhes sobre o mecanismo de regulação destas proteínas começaram a ser esclarecidos com a identificação de uma proteína RNA-helicase expressa em macrogametócitos de *P. berghei* (Khan *et al.*, 2005). Esta proteína mostrou alta homologia com membros da família DDX6 de RNA-helicases, que está relacionada com o armazenamento de mRNAs em ribonucleoproteínas. Em outro estudo, foi feito o silenciamento (*knockout*) desta proteína em *P. berghei*, e seu envolvimento com a regulação dos transcritos de P25 e P28 foi demonstrado. A RNA helicase identificada co-localiza com os transcritos de P25 e P28 em macrogametócitos de *P. berghei* e quando ela é deletada, estes mesmos transcritos não são mais detectados, indicando que aparentemente sua perda afetou severamente a capacidade dos parasitos em armazenar e estabilizar estes mRNAs. Além de P25 e P28 vários outros genes foram afetados com esta deleção, somando um total de 370 genes que tiveram seus níveis de expressão reduzidos em, pelo menos, duas vezes e, interessantemente, WARP foi um dos genes afetados. Os parasitos *knockout* demonstraram um desenvolvimento normal das formas assexuais e de gametócitos, porém os zigotos provenientes de gametas femininos que tiveram este gene deletado não foram capazes de se desenvolver em

ocinotos e por causa disso esta proteína foi denominada DOZI (Development of Zygote Inhibited) (Mair *et al.*, 2006).

Até o presente momento, DOZI havia sido estudada apenas em *P. berghei*, mas através de uma busca por ortólogos no banco de dados PlasmoDB, é possível identificar ortólogos potenciais para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. chabaudi*, *P. yoelii* e *P. knowlesi*, que são todas as espécies com dados genômicos depositados neste banco de dados em particular. O fato de prováveis ortólogos serem achados em todas elas indica que DOZI pode ter um papel conservado em todo o gênero.

Como foi demonstrado, em *P. berghei*, que DOZI está diretamente relacionada à regulação da expressão de WARP, e como o foco principal deste trabalho é a expressão de WARP em *P. gallinaceum*, concluímos que seria interessante e profundamente esclarecedor averiguar se DOZI era também encontrada nesta espécie. As seqüências de aminoácidos de PbDOZI e de seu ortólogo em *P. falciparum* foram empregadas em buscas por homologia contra um banco de dados do genoma de *P. gallinaceum* e uma provável proteína ortóloga foi identificada. A partir da sua seqüência foi desenhado um par de iniciadores específicos e uma reação de PCR, tendo o DNA genômico de *P. gallinaceum* como molde, foi capaz de amplificar um fragmento de tamanho correspondente ao esperado (Figura 29). Portanto, este foi o primeiro indício de que um ortólogo para DOZI havia sido encontrado no genoma de *P. gallinaceum*, esses dados serão confirmados através do seqüenciamento do seu gene codificador.

Os mesmos iniciadores foram utilizados para se detectar a presença de transcritos de PgDOZI através de RT-PCR. DOZI é descrita como sendo expressa exclusivamente em macrogametócitos, então amostras de sangue de aves infectadas por *P. gallinaceum* e que apresentavam gametócitos circulantes foram testadas. A RT-PCR detectou os transcritos nestas amostras, indicando que aquele gene estava sendo transcrito e que a proteína poderia estar sendo expressa (Figura 30). Estes resultados parecem confirmar que DOZI é realmente uma proteína ubíqua no gênero *Plasmodium* e que portanto, o mesmo mecanismo de regulação gênica no qual esta proteína participa é, provavelmente, encontrado também em *P. gallinaceum* e, provavelmente, em outras espécies do gênero.

Os resultados de outro estudo recente demonstraram que a região 3'UTR de Pb28 é suficiente para tornar o mRNA de uma proteína repórter (GFP) um alvo da repressão traducional em macrogametócitos de *P. berghei*. E este mesmo estudo reforça ainda mais o caráter conservado deste mecanismo de regulação, pois

demonstra que a região 3'UTR de Pg28 (o ortólogo de *P. gallinaceum*) é também capaz de mediar a repressão traducional em macrogametócitos de *P. berghei*, o que significa que a maquinaria celular de uma espécie reconhece elementos provenientes de outra espécie do gênero (Braks *et al.*, 2007).

A análise da expressão de transcritos de PgDOZI em amostras de intestinos de mosquitos até 24 horas após se alimentarem com sangue infectado revelou que existe a possibilidade de que DOZI seja expressa mesmo em estágios após a ativação de macrogametócitos até o desenvolvimento de oocinetos maduros (Figura 30). Esta análise porém deve ser considerada de forma criteriosa, uma vez que a RT-PCR detecta apenas a presença de transcritos e é necessário levar em consideração que as amostras retiradas durante as 24 horas após a alimentação podem conter macrogametócitos não fertilizados ou parasitos que tiveram, por alguma razão, seu desenvolvimento interrompido, mas que podem ainda assim contribuir para a detecção de transcritos de genes expressos em um momento anterior. Vale ressaltar que os trabalhos sobre a proteína DOZI acima citados, não relatam quaisquer experimentos que confirmem a presença ou ausência de transcritos de DOZI em outros estágios do desenvolvimento sexual de *Plasmodium*.

## 6.5 Identificação de genes em *P. gallinaceum*

Alguns dos desafios deste trabalho são resultantes do fato de seu desenvolvimento ter sido feito a partir de um modelo de malária aviária. O modelo de malária aviária é importante, uma vez que possibilita a obtenção de todos os estágios do ciclo de vida do parasito em laboratório, sendo o seu uso suportado pela proximidade genética entre *P. gallinaceum* e *P. falciparum* como já discutido anteriormente. A disponibilidade de dados sobre *P. gallinaceum* é muito menor quando comparada às outras espécies do gênero, sejam elas de importância médica, como *P. falciparum* e *P. vivax*, ou outros modelos experimentais bem estabelecidos, como *P. berghei* e *P. chabaudi*. Um exemplo disso é a inexistência de dados sobre *P. gallinaceum* no PlasmoDB, um banco de dados dedicado à anotação e integração de dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos de espécies do gênero *Plasmodium*. Para esta espécie em particular, a única fonte de dados disponível são seqüências não anotadas provenientes do projeto genoma (ainda não concluído).

Portanto, para que fosse possível estudarmos genes de *P. gallinaceum* foi necessário, primeiramente, identificá-los no genoma. E para vários destes genes, esta identificação foi o primeiro relato confirmando sua presença nesta espécie.

A escolha dos genes estudados foi feita a partir tanto das funções atribuídas a eles nos modelos em que foram estudados quanto dos seus perfis de expressão conhecidos.

A identificação da proteína PgDOZI e a razão pela qual ela foi estudada foram descritas em maiores detalhes anteriormente, mas vale reforçar que sua identificação em *P. gallinaceum* tem implicações importantes sobre o desenvolvimento sexual desta espécie.

O gene para  $\alpha$ -Tubulina foi incorporado a este estudo por apresentar expressão constitutiva nas diferentes formas do desenvolvimento do parasito, já tendo sido empregado com o mesmo propósito em um estudo com *P. berghei* (Ecker *et al.*, 2007). Não há na literatura porém, quaisquer estudos o descrevendo em *P. gallinaceum*, o que significa que a sua identificação, neste estudo, no genoma desta espécie é uma novidade (Figura 29).

P25 é uma proteína que tem sido estudada há vários anos, e vários trabalhos, já citados anteriormente, descreveram em detalhe o perfil de expressão desta proteína em *P. berghei* e a identificaram como um conhecido alvo para a repressão traducional em gametócitos. Seu ortólogo em *P. gallinaceum* já havia sido identificado (Kaslow *et al.*, 1989) e extensivamente estudado (Sieber *et al.*, 1991). Portanto, a detecção de P25 no genoma de *P. gallinaceum* (Figura 29) já era antecipada. Porém, os resultados deste trabalho que são relacionados à Pg25, e que serão discutidos em detalhes posteriormente, vêm acrescentar novas e relevantes informações sobre a expressão desta proteína.

Os demais genes estudados compartilham duas importantes características, são todos codificadores de proteínas micronemais e acredita-se que seus produtos estejam envolvidos em processos de locomoção ou de invasão de epitélios.

Dois destes genes, PgCTRP e PgWARP (Li *et al.*, 2004) são estruturalmente relacionados, pois apresentam domínios vWA, e já foram ambos descritos como proteínas micronemais em *P. gallinaceum*. A PgQuitinase foi também um dos genes estudados que já havia sido descrito para *P. gallinaceum* (Vinetz *et al.*, 2000). Assim como para P25, a detecção destes 3 genes já era prevista (Figura 29).

As outras duas proteínas exploradas neste trabalho, MAOP e CeLTOS, foram descritas recentemente em *P. berghei*. Ambas parecem estar envolvidas com a

invasão epitelial, sendo que MAOP, que apresenta um domínio do tipo perforina, estaria relacionada com a penetração das células epiteliais (Kadota *et al.*, 2004) e CeLTOS seria responsável pela migração intracelular do oocineto nestas células (Kariu *et al.*, 2006). A identificação de transcritos para estas proteínas em *P. gallinaceum* é descrita pela primeira vez neste trabalho (Figura 29), e reforça a percepção de que os elementos envolvidos no estabelecimento da infecção vetorial são altamente conservados no gênero *Plasmodium*.

## 6.6 Cinética de transcrição de genes de *P. gallinaceum*

Após a confirmação, por PCR, da presença dos genes de interesse em *P. gallinaceum*, o nosso propósito foi estudar a expressão de cada um destes genes durante o desenvolvimento sexual desta espécie. Considerando-se a relevância dos gametócitos na regulação da expressão gênica, o ponto de partida para o estudo da cinética de expressão foi uma amostra de sangue de uma ave infectada que apresentava gametócitos circulantes. De fato, a amostra sanguínea foi retirada imediatamente antes de se iniciar a alimentação de mosquitos na mesma ave. As demais amostras foram retiradas com a intenção de se conseguir uma amostragem representativa do desenvolvimento sexual no intestino do hospedeiro invertebrado. Assim, a dissecação de mosquitos a 0 hora visou a amostragem dos estágios envolvidos na fertilização, a 2 e 4 horas os alvos foram os zigotos em desenvolvimento, a 16 horas foram as formas intermediárias e a 24 horas os oocinetos maduros prontos para a invasão epitelial.

A primeira ressalva em relação a esta análise deve ser feita sobre a amostra sanguínea. Apesar de esta análise ser voltada aos macrogametócitos maduros, o sangue retirado da ave infectada apresenta, na verdade, uma mistura das formas encontradas na circulação. Em segundo lugar, é importante deixar claro que esta não é uma análise quantitativa em relação aos níveis de expressão dos genes estudados. Como citado anteriormente, este momento particular do ciclo de vida dos plasmódios é caracterizado por uma redução drástica no número de parasitos à medida que se desenvolvem (Sinden, 1999) o que significa que há uma alta taxa de mortalidade de parasitos. Porém, estes parasitos mortos, assim como aqueles que não se desenvolveram (como por exemplo, macrogametócitos não fertilizados) permanecem no bolo alimentar e são fontes de mRNAs que podem persistir e serem detectados em momentos posteriores. Além disso, a única padronização durante o

preparo de amostras para RT-PCR foi a utilização de 1µg de RNA total de cada amostra para a síntese do cDNA, e como descrito na metodologia, foram usadas quantidades diferentes de cDNA molde dependendo do gene em questão.

Portanto, a análise sendo proposta é de caráter qualitativo/comparativo e focada principalmente na correlação entre o momento em que um gene é detectado, sua função e sua regulação.

Como esperado para um gene constitutivo, o transcrito para  $\alpha$ -Tubulina foi detectado em todas as amostras testadas (Figura 30), porém o nível de detecção foi muito inferior nas amostras de intestinos dissecados 16 e 24 horas após a alimentação em comparação com as demais. Apesar de reafirmarmos o caráter não quantitativo desta análise, entendemos que esta queda na expressão de um gene constitutivo possa estar exatamente relacionada ao efeito gargalo observada durante as primeiras 24 horas no hospedeiro invertebrado, responsável pela drástica redução no número de parasitos viáveis.

Os transcritos de P25 também foram detectados em todas as amostras coletadas (Figura 30). Apesar de os estudos que descrevem a regulação de P25 pelo mecanismo de repressão traducional terem sido realizados somente para a proteína ortóloga em *P. berghei*, a identificação de transcritos de Pg25 e a identificação de PgDOZI também em amostras sanguíneas contendo macrogametócitos (discutida anteriormente), nos levou a propor que a repressão traducional provavelmente ocorre em *P. gallinaceum* e que Pg25 é uma das proteínas reguladas por este mecanismo.

Duas outras proteínas tiveram seus transcritos detectados ainda em parasitos do sangue circulante, WARP e Quitinase (Figuras 30 e 31). No caso de PgWARP, este é um resultado antecipado, pois sua ortóloga, PbWARP, foi recentemente identificada em macrogametócitos circulantes sendo regulada por repressão traducional, como citado anteriormente. Ainda, os resultados obtidos no presente trabalho sobre a expressão de PgWARP em zigotos recém fertilizados e que foram discutidos anteriormente, indicavam que mRNAs para esta proteína deveriam ser detectados logo no início do desenvolvimento. Porém, a detecção de transcritos para PgWARP apresentou uma característica peculiar, um aumento gradual e constante até o último ponto medido (Figura 30) e que não poderia ser explicado somente pela presença de mRNAs de parasitos degradados. Portanto, acreditamos que PgWARP é regulada por repressão traducional em macrogametócitos e que sua transcrição persiste nos demais estágios do desenvolvimento.

A detecção de quitinase foi um resultado inesperado. O seu ortólogo em *P. berghei* não foi identificado na lista de genes regulados por repressão traducional (Mair *et al.*, 2006) e o seu produto protéico é detectado somente 10 horas após a alimentação sanguínea (Langer *et al.*, 2000). Portanto, apesar de ter tido seu transcrito detectado já no início do desenvolvimento sexual, assim como WARP e P25, ainda é muito cedo para se afirmar que o gene da quitinase é também regulado pelo mesmo mecanismo, pois não há nada na literatura que sugira esta possibilidade.

Quanto aos demais genes estudados, para nenhum deles foram detectados transcritos na amostra de sangue infectado contendo gametócitos (Figura 31). Como descrito anteriormente, três destes genes, CTRP, MAOP e CeLTOS, estão diretamente relacionados à invasão epitelial e portanto, pode-se inferir que as proteínas codificadas por estes genes são necessárias somente nos momentos finais da fase intra-intestinal, quando oocinetos já maduros e móveis aderem e penetram as células colunares epiteliais. Nossos resultados mostram que os mRNAs de CTRP e MAOP são detectados, pela primeira vez, a 2 horas e a 0 hora após a alimentação, respectivamente (Figura 31).

Um resultado interessante foi a não detecção de CeLTOS durante o desenvolvimento sexual (Figura 31) apesar do gene que a codifica ter sido identificado no genoma de *P. gallinaceum* (Figura 29). Quando o ortólogo de CeLTOS foi descrito em *P. berghei* (Kariu *et al.*, 2006) ele foi identificado como um gene de dupla função, estando relacionado tanto à travessia de células do epitélio intestinal do vetor pelo oocineto quanto à travessia de múltiplos hepatócitos do hospedeiro vertebrado pelo esporozoíto. Porém, o ciclo exoeritrocítico de *P. gallinaceum* é bastante diferente, com o parasito invadindo e infectando macrófagos logo após a transmissão pela picada, o que significa que não existe a etapa de invasão e travessia de múltiplas células (Frevort *et al.*, 2007). Esta diferença entre a biologia dos parasitos poderia estar relacionada à não detecção de CeLTOS em oocinetos de *P. gallinaceum*.

WARP sempre foi descrita como uma proteína micronemal de oocinetos provavelmente relacionada à invasão epitelial, porém nossos resultados apontam uma diferença entre o perfil de expressão de WARP e de outras proteínas como CTRP e MAOP, que são também relacionadas à invasão. O fato de WARP preceder estas proteínas e, ainda mais importante, de ser a única destas “proteínas de invasão” a ser regulada pelo mecanismo de repressão traducional em

macrogametócitos, indica a possibilidade de que WARP possua uma importante função, ainda não esclarecida, durante o desenvolvimento sexual em *Plasmodium*.

## 6.7 WARP e Vacinas Bloqueadoras de Transmissão

A principal razão de se estudar quaisquer aspectos da biologia dos plasmódios é poder, eventualmente, aplicar o conhecimento adquirido no combate à malária humana. Uma das estratégias de controle mais promissoras, e que vem sendo pesquisada há algumas décadas, é o desenvolvimento de vacinas antimaláricas. Um grupo específico de vacinas, chamadas Vacinas Bloqueadoras de Transmissão, tem como objetivo a eliminação ou redução da infecção em vetores transmissores da malária (Carter, 2001).

Dentre os alvos mais promissores para este tipo de vacina, estão as proteínas de plasmódios que são expressas exclusivamente na fase de estabelecimento da infecção vetorial. A proteína WARP faz parte deste contexto e é justamente por isso que sua importância é justificada. Como citado anteriormente, o seu potencial uso em vacinas de bloqueio já foi demonstrado por mais de um trabalho. Assim, esclarecimentos quanto à sua cinética de expressão e regulação podem auxiliar no desenho de vacinas eficazes.

Por exemplo, se a proteína WARP for realmente expressa já em zigotos recém fertilizados, como sugerem alguns dos resultados obtidos neste trabalho, isso poderia torná-la um alvo ainda mais atrativo para ser explorado em uma eventual vacina, pois o seu tempo de exposição aos anticorpos bloqueadores seria provavelmente maior, levando a uma resposta mais eficiente (Saul, 1987).

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos ao final deste trabalho nos permitiram concluir que:

1. Em oocinetos maduros de *P. gallinaceum*, a proteína WARP apresenta um padrão de expressão condizente com o de uma proteína micronemal, estando concentrada na região apical da extremidade anterior.
2. Ainda em oocinetos maduros, há uma concentração da proteína WARP em regiões do contorno celular. Não foi determinado porém se esta marcação é intra ou extracelular.
3. A proteína WARP foi também detectada em zigotos recém fertilizados. Nestas células, sua expressão apresentou um padrão granular restrito à periferia do citoplasma, que indicava uma possível localização intra-vesicular.
4. Quatro genes, DOZI,  $\alpha$ -Tubulina, MAOP e CeLTOS, já conhecidos para outras espécies do gênero, foram identificados pela primeira vez em *P. gallinaceum* através de buscas por homologia. Demonstrando um alto grau de conservação entre estas proteínas em *Plasmodium*.
5. A identificação de um provável ortólogo da proteína DOZI em *P. gallinaceum*, sugere que o mecanismo de regulação gênica por repressão traducional também ocorra em macrogametócitos deste espécie. Ainda, reforçando esta hipótese, o gene codificador da proteína Pg25 foi detectado em uma amostra com macrogametócitos.
6. A detecção de transcritos para PgWARP em uma amostra sanguínea contendo macrogametócitos indica que, assim como demonstrado para *P. berghei*, WARP pode ser um dos alvos da regulação por repressão traducional em *P. gallinaceum*.

7. Inesperadamente, a Quitinase, outra proteína micronemal, teve mRNAs detectados na amostra sanguínea. Porém não há qualquer indício na literatura que a Quitinase seja também um alvo para a repressão traducional.
8. Duas proteínas micronemais, CTRP e MAOP, que estão diretamente ligadas à invasão epitelial, só começam a ser expressas em estágios do parasito encontrados exclusivamente no interior do intestino do vetor.
9. Outra proteína micronemal chamada CeLTOS e que havia sido identificada em *P. berghei* e implicada na invasão epitelial, aparentemente não é expressa em oocinetos de *P. gallinaceum*.
10. Esta diferença observada entre a expressão de WARP e de outras proteínas micronemais relacionadas à invasão poderia indicar que a importância de WARP não está restrita às etapas finais do desenvolvimento sexual em *Plasmodium*.
11. A detecção de WARP ainda nas primeiras horas do desenvolvimento de *Plasmodium* dentro do intestino do vetor, contrastando com uma expressão mais tardia, como havia sido descrito anteriormente, pode torná-la um alvo mais atraente para o desenvolvimento de uma Vacina Bloqueadora da Transmissão.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ciência contemporânea experimenta uma fase excitante, em que uma profusão de novos dados são gerados a uma velocidade estarrecedora, acompanhada de perto por uma crescente oferta de ferramentas para sua exploração.

A própria pesquisa em malária foi alterada profundamente nas últimas décadas. Hoje, os genomas de hospedeiros e parasitos estão disponíveis e, o mais importante, facilmente acessáveis. A disponibilidade de *microchips* que permitem o estudo de milhares de genes de uma só vez, ou de ferramentas de bioinformática capazes de detectar quais proteínas estão representadas em uma amostra, revolucionaram a maneira que a biologia de um organismo é revelada. E estes estudos têm, com certeza, seus méritos. Um bom exemplo foi profundamente discutido durante este trabalho: a identificação da proteína DOZI, um importante regulador da expressão gênica em plasmódios, foi resultante de um estudo sobre o proteoma de gametócitos.

Mas, a maior virtude destas abordagens holísticas talvez seja apontar a direção em que devam se concentrar os esforços, pois para que dados se transformem em informações relevantes é necessário que o processo biológico seja escrutinado em seus mínimos detalhes.

Quando nos propusemos a estudar os aspectos da expressão da proteína WARP, fomos impulsionados pela curiosidade em tentar clarificar questões que acreditávamos não estarem completamente resolvidas. E um importante incentivo era o fato que esta proteína apresentava sua própria importância, sendo considerada um potencial alvo para uma vacina antimalárica.

Acreditamos que este trabalho venha a acrescentar novas informações e perspectivas ao campo em que se insere. E como é comum para trabalhos desta natureza, seus resultados vêm acompanhados de uma série de novas perguntas, hipóteses e inferências.

Este trabalho apresenta algumas perspectivas como a exploração dos novos genes identificados em *P. gallinaceum*, que devem ser seqüenciados, a ampliação do número de genes a terem sua expressão estudada, o aprofundamento sobre aqueles que se mostraram uma surpresa, o uso de diferentes ferramentas para

tentar resolver questões ainda indefinidas ou mesmo para confirmar algumas das respostas propostas.

## 9 REFERÊNCIAS

- Abraham EG, Islam S, Srinivasan P, Ghosh AK, Valenzuela JG, Ribeiro JMC, Kafatos FC, Dimopoulos G, Jacobs-lorena M. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* Transcriptional Repertoire during Ookinete Development and Midgut Invasion. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279 (7): 5573-5580.
- Aikawa M, Carter R, Ito Y, Nijhout MM. New observations on gametogenesis, fertilization, and zygote transformation in *Plasmodium gallinaceum*. *Journal of Protozoology* 1984 Aug; 31(3): 403-13.
- Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 2006 Feb;12(2):220-4. Epub 2006 Jan 22.
- Anon. (1991). Prospects for malaria control by genetic manipulation of its vectors (TDR/BCV/MAL-ENT/91.3), World Health Organization.
- Arrighi RBG, Hurd H. The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts. *International Journal of Parasitology* 2002; 32: 91-98.
- Barillas-Mury C, Kumar S. *Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cellular Microbiology* 2005 Nov; 7(11): 1539-45.
- Baton LA, Ranford-cartwright LC. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. *Parasitology* 2004; 129: 663–676.
- Baton LA, Ranford-Cartwright LC. Do malaria ookinete surface proteins P25 and P28 mediate parasite entry into mosquito midgut epithelial cells? *Malaria Journal* 2005 Feb 25;4(1):15.
- Baum J, Papenfuss AT, Baum B, Speed TP, Cowman AF. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Aug;4(8):621-8.
- Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):289-92.
- Blanco AR, Paez A, Gerold P, Dearsly AL, Margos G, Schwarz RT, Barker G, Rodriguez MC, Sinden RE. The biosynthesis and post-translational modification of Pbs21 an ookinete-surface protein of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Jan 25;98(2):163-73.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
- Carter R. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* 2001; 19: 2309-2314.
- Braks JA, Mair GR, Franke-Fayard B, Janse CJ, Waters AP. A conserved U-rich RNA region implicated in regulation of translation in *Plasmodium* female gametocytes. *Nucleic Acids Res.* 2007 Dec 23 [Epub ahead of print]
- Carter R, Mendis KN, Miller LH, Molineaux L, Saul A. Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med.* 2000 Mar;6(3):241-4.

- Carter R. Spatial simulation of malaria transmission and its control by malaria transmission blocking vaccination. *Int J Parasitol.* 2002 Dec 4;32(13):1617-24.
- del Carmen Rodriguez M, Gerold P, Dessens J, Kurtenbach K, Schwartz RT, Sinden RE, Margos G. Characterisation and expression of pbs25, a sexual and sporogonic stage specific protein of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Sep;110(1):147-59.
- Dessens JT, Beetsma AL, Dimopoulos G, Wengelnik K, Crisanti A, Kafatos FC, Sinden RE. CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *EMBO J.* 1999 Nov 15;18(22):6221-7.
- Dessens JT, Sidén-Kiamos I, Mendoza J, Mahairaki V, Khater E, Vlachou D, Xu XJ, Kafatos FC, Louis C, Dimopoulos G, Sinden RE. SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Molecular Microbiology* 2003 Jul;49(2):319-29.
- Dubremetz F, Garcia-Reguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host cell invasion by Apicomplexa. *International Journal for Parasitology* 1998; 17: 1007-1013.
- Ecker A, Pinto SB, Baker KW, Kafatos FC, Sinden RE. *Plasmodium berghei*: *Plasmodium* perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. *Experimental Parasitology* 2007 Aug;116(4):504-8.
- Escalante AA, Ayala FJ. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from RNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 22;91(24):11373-7.
- Fang J, McCutchan TF. Thermoregulation in a parasite's life cycle. *Nature.* 2002 Aug 15;418(6899):742.
- Frevert U, Engelmann S, Zougbedé S, Stange J, Ng B, Matuschewski K, Liebes L, Yee H. Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* 2005 Jun;3(6):e192.
- Frevert U, Späth GF, Yee H. Exoerythrocytic development of *Plasmodium gallinaceum* in the White Leghorn chicken. *Int J Parasitol.* 2007 Oct 12 [Epub ahead of print]
- Field JW, Shute PG: The microscopic diagnostic of human malaria. In *A morphological study of the erythrocytic parasites* Kuala Lumpur: Government Press; 1956:142.
- Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Oct;5(10):827-35.
- Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PF, Barillas-Mury C. Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *PNAS* 2005 Mar 15;102(11):4010-5.
- Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TW, Berriman M, et al. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science.* 2005 Jan 7;307(5706):82-6.
- Han YS, Thompson J, Kafatos FC, Barillas-mury C. Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *The EMBO Journal* 2000 Nov 15;19(22): 6030-40.
- Healer J, Graszynski A, Riley E. Phagocytosis does not play a major role in naturally acquired transmission-blocking immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 1999 May;67(5):2334-9.

- Huber M, Cabib E, Miller LH. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 1;88(7):2807-10.
- Janse CJ. DNA synthesis in malaria parasites during sexual and erythrocytic asexual development. PhD thesis University of Leiden, The Netherlands. 1987
- Jensen JB, Trager W. *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol*. 1977 Oct;63(5):883-6.
- Kadota K, Ishino T, Matsuyama T, Chinzei Y, Yuda M. Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *PNAS* 2004 Nov 16;101(46):16310-5.
- Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. CeITOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Molecular microbiology* 2006 Mar;59(5):1369-79.
- Kaslow DC, Quakyi IA, Syin C, Raum MG, Keister DB, Coligan JE, McCutchan TF, Miller LH: A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* 1988, 333:74-76.
- Kaushal DC, Carter R, Howard RJ, McAuliffe FM. Characterization of antigens on mosquito midgut stages of *Plasmodium gallinaceum*. I. Zygote surface antigens. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1983 May;8(1):53-69.
- Kaslow DC, Syin C, McCutchan TF, Miller LH. Comparison of the primary structure of the 25 kDa ookinete surface antigens of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium gallinaceum* reveal six conserved regions. *Mol Biochem Parasitol*. 1989 Mar 15;33(3):283-7.
- Khan SM, Franke-Fayard B, Mair GR, Lasonder E, Janse CJ, Mann M, Waters AP. Proteome analysis of separated male and female gametocytes reveals novel sex-specific *Plasmodium* biology. *Cell*. 2005 Jun 3;121(5):675-87.
- Kooij TW, Matuschewski K. Triggers and tricks of *Plasmodium* sexual development. *Curr Opin Microbiol*. 2007 Dec;10(6):547-53.
- Kumar N, Carter R. Biosynthesis of two stage-specific membrane proteins during transformation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes into ookinetes. *Mol Biochem Parasitol*. 1985 Feb;14(2):127-39.
- Langer RC, Hayward RE, Tsuboi T, Tachibana M, Torii M, Vinetz JM. Micronemal transport of *Plasmodium* ookinete chitinases to the electron-dense area of the apical complex for extracellular secretion. *Infection and Immunity* 2000 Nov;68(11):6461-5.
- Lavazec C, Boudin C, Lacroix R, Bonnet S, Diop A, Thiberge S, Boisson B, Tahar R, Bourgoignie C. Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1635-42.
- Lee JO, Rieu P, Arnout MA, Liddington R. Crystal Structure of the A Domain from the  $\alpha$  Subunit of Integrin CR3 (CD11b/CD18) *Cell* 1995; 80: 631-638.
- Lensen AH, Van Gemert GJ, Bolmer MG, Meis JF, Kaslow D, Meuwissen JH, Ponnudurai T. Transmission blocking antibody of the *Plasmodium falciparum* zygote/ookinete surface protein Pfs25 also influences sporozoite development. *Parasite Immunol*. 1992 Sep;14(5):471-9.

- Li F, Templeton TJ, Popov V, Comer JE, Tsuboi T, Torii M, Vinetz JN. *Plasmodium* Ookinete-secreted Proteins Secreted through a Common Micronemal Pathway Are Targets of Blocking Malaria Transmission. *The Journal of Biological Chemistry* 2004 Jun 18; 279(25): 26635-44.
- Mair GR, Braks JA, Garver LS, Wiegant JC, Hall N, Dirks RW, Khan SM, Dimopoulos G, Janse CJ, Waters AP. Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science* 2006 Aug 4;313(5787):667-9.
- McCutchan TF, Kissinger JC, Touray MG, Rogers MJ, Li J, Sullivan M, Braga EM, Krettli AU, Miller LH. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarial parasites: biological and phylogenetic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15;93(21):11889-94.
- Meis JF, Pool G, Van gemert GJ, Lensen AH, Ponnudurai T, Meuwissen JH. *Plasmodium falciparum* ookinetes migrate intercellularly through *Anopheles stephensi* midgut epithelium *Parasitology Research* 1989; 76(1):13-9.
- Menard R. Medicine: Knockout malaria vaccine? *Nature* 2005 Jan 13; 433(7022):113-4.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):673-9.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2007.
- Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodríguez A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*. 2001 Jan 5;291(5501):141-4.
- Mullis K, Faloona, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1:263-73, 1986.
- Munderloh UG, Kurtti TJ. The infectivity and purification of cultured *Plasmodium berghei* ookinetes. *The Journal of Parasitology* 1987 Oct;73(5):919-23.
- Niederwieser I, Felger I, Beck HP. Limited polymorphism in *Plasmodium falciparum* sexual-stage antigens. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;64(1-2):9-11.
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, v.18, n.20, p.6169, 1990.
- Pace T, Olivieri A, Sanchez M, Albanesi V, Picci L, Sinden Kiamos I, Janse CJ, Waters AP, Pizzi E, Ponzi M. Set regulation in asexual and sexual *Plasmodium* parasites reveals a novel mechanism of stage-specific expression. *Molecular Microbiology* 2006 May;60(4):870-82.
- Paton MG, Barker GC, Matsuoka H, Ramesar J, Janse CJ, Waters AP, Sinden RE. Structure and expression of a post-transcriptionally regulated malaria gene encoding a surface protein from the sexual stages of *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Jun;59(2):263-75.
- Raubaud A, Lupetti P, Paul RE, Mercati D, Brey PT, Sinden RE, Heuser JE, Dallai R. Cryofracture electron microscopy of the ookinete pellicle of *Plasmodium gallinaceum* reveals

- the existence of novel pores in the alveolar membranes. *Journal of structural biology* 2001 Jul;135(1):47-57.
- Saul A. Kinetic constraints on the development of a malaria vaccine. *Parasite Immunol.* 1987 Jan;9(1):1-9.
- Saul A. Mosquito stage, transmission blocking vaccines for malaria. *Curr Opin Infect Dis.* 2007 Oct;20(5):476-81.
- Sherman IW, ed. *MALARIA: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*. Washington, DC: ASM Press; 1998.
- Sieber KP, Huber M, Kaslow D, Banks SM, Torii M, Aikawa M, Miller LH. The peritrophic membrane as a barrier: its penetration by *Plasmodium gallinaceum* and the effect of a monoclonal antibody to ookinetes. *Experimental Parasitology* 1991; 72:145-156.
- Sinden RE. *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia* 1999 Sep; 41(1-3): 139-48.
- Sinden RE, Billingsley PF. *Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol.* 2001 May;17(5):209-12.
- Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.
- Su X, Hayton K, Wellems TE. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nat Rev Genet.* 2007 Jul;8(7):497-506.
- Talman AM, Domarle O, McKenzie FE, Ariey F, Robert V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2004 Jul 14;3:24.
- TDR/WHO. *Malaria transmission blocking vaccines: an ideal public good*, 2000.
- Tomas AM, Margos G, Dimopoulos G, van Lin LH, de Koning-Ward TF, Sinha R, Lupetti P, Beetsma AL, Rodriguez MC, Karras M, Hager A, Mendoza J, Butcher GA, Kafatos F, Janse CJ, Waters AP, Sinden RE. P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *EMBO J.* 2001 Aug 1;20(15):3975-83.
- Trottein F, Triglia T, Cowman AF. Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 Nov;74(2):129-41.
- Vinetz JM, Valenzuela JG, Specht CA, Aravind L, Langer RC, Ribeiro JM, Kaslow DC. Chitinases of the avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*, a class of enzymes necessary for parasite invasion of the mosquito midgut. *J Biol Chem.* 2000 Apr 7;275(14):10331-41.
- Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. *Cellular Microbiology* 2004 Jul;6(7):671-85.
- Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJH, Janse CJ, Bistoni F, Waters AP, Crisanti A. The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *The EMBO Journal* 1999 Oct 1; 18(19): 5195-204.

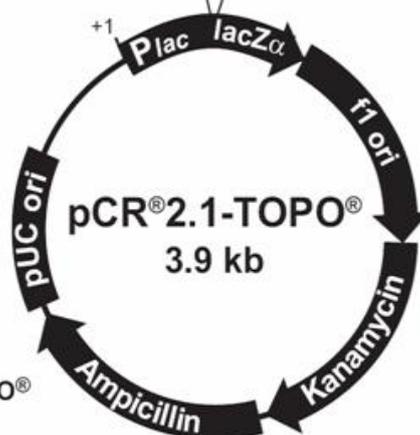
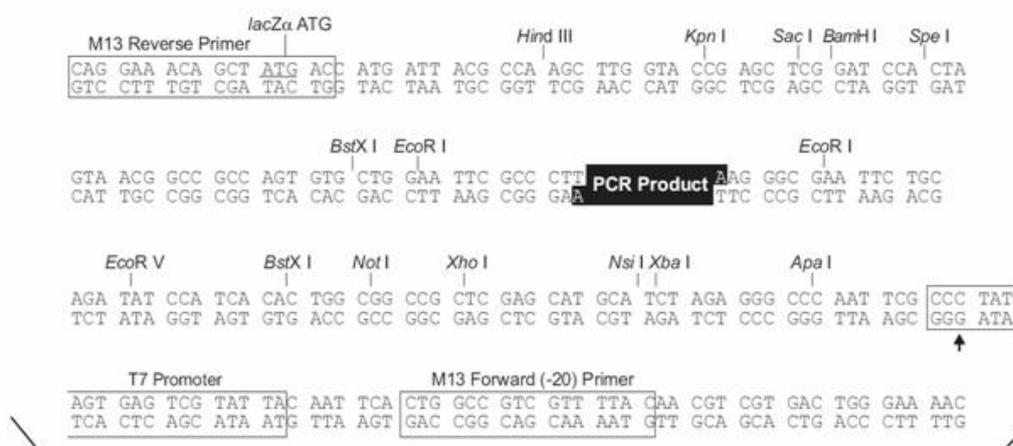
- Weston A, Sommerville J. Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jun 12;34(10):3082-94.
- Whittaker CA, Hynes RO. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Molecular biology of the Cell* 2002 Oct;13(10):3369-87.
- WHO. Roll Back Malaria. Fact Sheet n.94, 2005.
- WHO. WORLD MALARIA REPORT 2005.
- Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci.* 2003 Apr;28(4):182-8.
- Yuda M, Toshiki S, Chinzei Y. Structure and Expression of an Adhesive Protein-like Molecule of Mosquito Invasive-stage Malarial Parasite. *The Journal of Experimental Medicine* 1999 Jun 21; 189(12):1947-52.
- Yuda M, Sakaida H, Chinzei Y. Targeted Disruption of the *Plasmodium berghei* CTRP Gene Reveals Its Essential Role in Malaria Infection of the Vector Mosquito. *Journal of Experimental Medicine* 1999 Dec 6; 190(11):1711-6.
- Yuda, M, Yano K, Tsuboi T, Torii M, Chinzei Y. von Willebrand Factor A Domain-related Protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout *Plasmodium* parasites. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2001 Aug; 116(1): 65-72.
- Zieler H, Dvorak JA. Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *PNAS* 2000 Oct 10;97(21):11516-21.

## 10 ANEXOS

## Anexo 1: Mapa do vetor pCR2.1 TOPO

Map of pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>  
Map

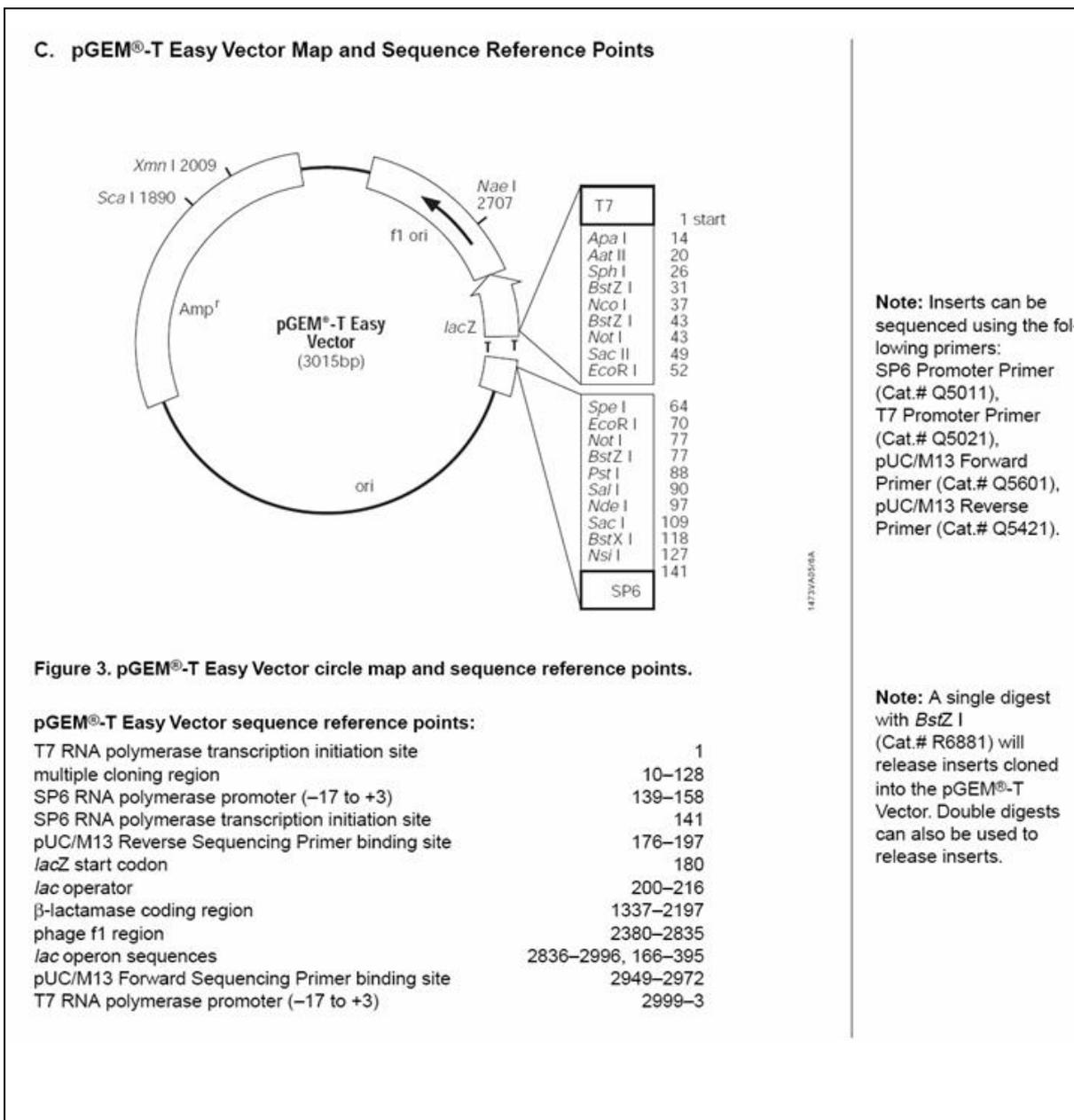
The map below shows the features of pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> and the sequence surrounding the TOPO<sup>®</sup> Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The arrow indicates the start of transcription for T7 polymerase. **The complete sequence of pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> is available for downloading from our Web site ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) or by contacting Technical Service (page 24).**



**Comments for pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>**  
3931 nucleotides

LacZ $\alpha$  fragment: bases 1-547  
M13 reverse priming site: bases 205-221  
Multiple cloning site: bases 234-357  
T7 promoter/priming site: bases 364-383  
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406  
f1 origin: bases 548-985  
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113  
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991  
pUC origin: bases 3136-3809

Anexo 2: Mapa do vetor pGEM-T easy



### Anexo 3: Mapa do vetor pET32

#### pET-32a-c(+) Vectors

TB122 12/98

	Cat. No.
pET-32a DNA	69015-3
pET-32b DNA	69016-3
pET-32c DNA	69017-3

The pET-32 series is designed for cloning and high-level expression of peptide sequences fused with the 109aa Trx•Tag™ thioredoxin protein (1). Cloning sites are available for producing fusion proteins also containing cleavable His•Tag® and S•Tag™ sequences for detection and purification. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circle map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The fl origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

1. LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. (1993) *Bio/Technology* 11, 187-193.

#### pET-32a(+) sequence landmarks

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx•Tag coding sequence	366-692
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites ( <i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
fl origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.

