



Gabriela Mendes de Oliveira

**OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO *ApiAP2* E SEU PAPEL
NA BIOLOGIA DE *Plasmodium spp.***

LAVRAS – MG

2022

Gabriela Mendes de Oliveira

**OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO ApiAP2 E SEU PAPEL NA BIOLOGIA DE
*Plasmodium spp.***

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Curso de Ciências Biológicas,
para a obtenção do título de
Bacharel.

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

LAVRAS – MG

2022

Gabriela Mendes de Oliveira

**OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO ApiAP2 E SEU PAPEL NA BIOLOGIA DE
*Plasmodium spp.***

**THE ApiAP2 TRANSCRIPTION FACTORS AND THEIR ROLE IN *Plasmodium*
spp. BIOLOGY**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Curso de Ciências Biológicas,
para a obtenção do título de
Bacharel

_____ em 27 de janeiro de 2022

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

Dr. Mauro Ferreira de Azevedo

Me. Arne Krüger

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

Orientador

LAVRAS – MG

2022

À Deus, causa primordial de todas as coisas,

sem Ele nada seria possível.

À minha família pelo apoio incondicional e exemplo de perseverança.

Dedico

AGRADECIMENTO

A minha mãe pela presença e cuidado constante, por ser minha inspiração de força e sabedoria, por sempre guiar meus passos e acreditar nos meus sonhos. Ao meu pai pelo acolhimento e por sempre estar disposto a me escutar. Aos meus avós pelo amor incondicional que nutre meu coração e pelas mãos carinhosas que me ampararam durante toda a caminhada...a vocês devo meus sonhos e minhas conquistas. Aos meus irmãos pelo companheirismo de uma vida inteira. Aos meus tios que sempre se fizeram presente independente da distância e nunca mediram esforços para me amparar quando necessário.

As minhas amigas de longa data, Amanda, Carolina, Marcella e Alexias pela amizade sincera e incondicional, e por sempre me incentivarem. Aos meus amigos de graduação, Yuri, Marcela e Lázaro, por terem tornado essa experiência tão mais leve e feliz. Aos meus novos colegas de laboratório do ICB pelo acolhimento, paciência para ensinar e pelo carinho com que o fizeram. Gratidão!

Ao meu companheiro, Guilherme, por todo incentivo e amor durante praticamente toda minha graduação, por ter permanecido ao meu lado e se fazer presente mesmo quando distante fisicamente.

Ao Gerd pela incrível oportunidade de aprendizado, pela orientação e todo ensinamento. Muito obrigada por acreditar em mim!

Ao meu primeiro orientador, Welison Pereira, por me passar a paixão pela biologia molecular e por ter proporcionado meu primeiro contato com a ciência.

Às instituições de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMG, pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

“A vida é curta para ser pequena”

Chacal

RESUMO

Plasmodium spp., parasita causador da malária, possui um ciclo de vida complexo, com estágios morfologicamente diferentes e dois hospedeiros. A regulação dos genes envolvidos nessas importantes modificações ao longo do seu desenvolvimento tem sido relacionada aos possíveis fatores de transcrição AP2. Semelhantes à família AP2/ERF de fatores de transcrição encontrada em plantas, essas proteínas são amplamente conservadas também em protozoários apicomplexos. Apesar dos recentes estudos relacionarem diversos genes codificadores de proteínas apiAP2 com um papel crítico no genoma destes organismos, muitos não tem sua função completamente elucidada e a base molecular destes processos ainda permanece pouco compreendida. A fim de sintetizar o avanço já realizado na compreensão dos diferentes membros ApiAP2 presentes em *Plasmodium spp.*, o presente estudo realizou uma revisão bibliográfica das principais pesquisas desenvolvidas em *P. berghei*, *P. yoelii* e *P. falciparum*, principal causador da doença em humanos, que contribuíram para este progresso. O entendimento aprofundado da biologia desses organismos e seus mecanismos de regulação gênica fornecem recursos importantes para o combate à malária.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium spp.* Fatores de transcrição ApiAP2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	A MALÁRIA	10
3	O CICLO DA MALÁRIA	11
4	A FAMÍLIA ApiAP2	12
5	ApiAP2 E O CICLO DE DESENVOLVIMENTO DE <i>Plasmodium spp.</i>	15
5.1	Estágio assexual	15
5.2	Diferenciação sexual	18
5.3	Esporogônia	21
6	METODOLOGIA	22
7	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	23
8	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma das principais doenças tropicais, com 241 milhões de novos casos no ano de 2020 e resultando na morte de 627 mil, sendo crianças menores de 5 anos de idade e mulheres grávidas a maioria das vítimas (WHO, 2021).

Transmitida por mosquitos *Anopheles* e causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, ao menos cinco espécies são capazes de infectar e desencadear a malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*. Quando causada por *P. falciparum* a doença pode evoluir para sua forma grave, ocasionada principalmente pela capacidade de adesão das formas maduras do parasita às células do endotélio microvascular, sequestrando os glóbulos vermelhos e obstruindo vênulas e capilares, causando disfunção vital dos tecidos e órgãos.

Com os altos níveis de mortalidade acarretados pela doença, a crescente resistência do parasita aos medicamentos antimaláricos (Menard & Dondorp, 2017) e dos vetores aos inseticidas utilizados, há a emergente necessidade de descobertas de novos tratamentos efetivos, sendo imprescindível o conhecimento aprofundado da biologia do parasita.

Mesmo com os avanços dos estudos moleculares de *Plasmodium spp* a presença e atuação dos mecanismos envolvidos no controle de expressão de seus genes ainda não foram completamente elucidados. Em 2005, Balaji *et al.* identificaram uma família de possíveis fatores de transcrição no filo Apicomplexa, denominada ApiAP2. Os domínios AP2 foram descobertos originalmente em plantas, contendo aproximadamente 60 aminoácidos de comprimento e importante função na regulação da resposta a estresse ambiental (Silva *et al.*, 2008).

Em *P. falciparum* 27 membros da família ApiAP2 foram identificados e nos parasitas de roedores, *P. berghei* e *P. yoelii* 26 membros, no entanto, a maioria permanece sem função definida. Desde sua descoberta, diversos estudos buscam elucidar as funções específicas destes fatores de transcrição no genoma do parasita, que podem ser possíveis alvos para novos antimaláricos, devido à ausência ApiAP2 em humanos (Silva *et al.*, 2008).

A partir deste contexto o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura das principais pesquisas que contribuíram para a elucidação da função dos supostos fatores de transcrição ApiAP2 presentes em *Plasmodium spp.*

2 A MALÁRIA

Causadora de grande impacto mundial, a malária é uma das principais doenças de regiões tropicais e subtropicais, em especial na região africana, que concentrou 95% dos casos registrados no ano de 2020 (WHO, 2021). Devido aos avanços em direção à erradicação da malária e aos esforços quanto a prevenção da doença, estima-se que 1.5 bilhões de casos e 7.6 milhões de mortes foram evitadas entre os anos de 2000 e 2019, porém, muito ainda há que se melhorar, em 2020, devido a pandemia do COVID-19, o número de casos e mortes aumentaram significativamente, resultado da falha nos serviços de diagnóstico, tratamento e prevenção (WHO, 2021).

Em áreas endêmicas, a população mais vulnerável são pessoas com imunidade reduzida ou nenhuma imunidade à doença, como mulheres grávidas que devido a gravidez tem a imunidade fragilizada e crianças menores que cinco anos que ainda não desenvolveram imunidade protetora à malária. (CDC, 2021). Já em áreas de baixa transmissão, as crianças e os adultos são igualmente acometidos (Daiana Miotto et al., 2012)

No continente americano, 80% dos casos de malária ocorrem no Brasil, Venezuela e Colômbia (Agência Brasil, 2020). Em território brasileiro, 99% dos casos autóctones são registrados na Região Amazônica (Fiocruz, 2019) e estão associadas às espécies *P. vivax* e *P. falciparum*, correspondendo a 89,3% e 10,7% dos casos registrados em 2019, respectivamente (SIVEP, 2020).

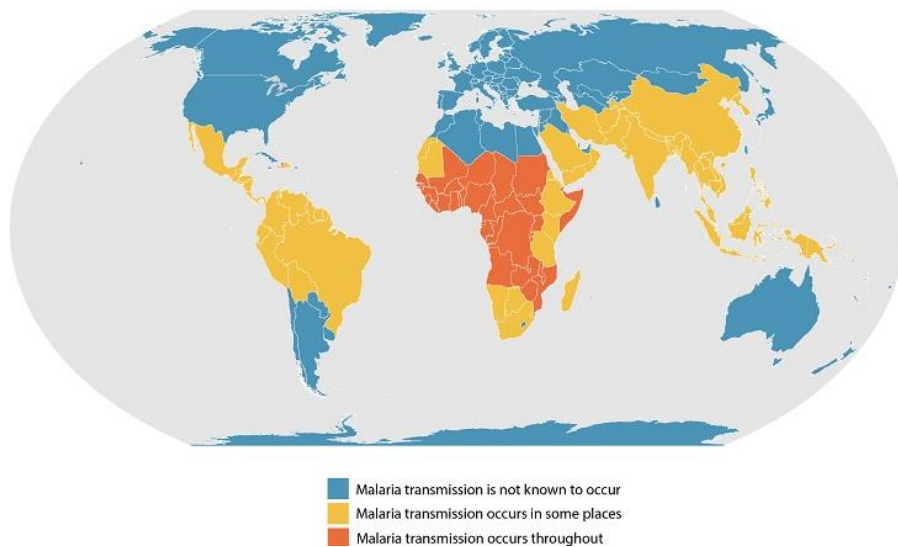


FIGURA 01. Transmissão de malária. Países de coloração azul não apresentam dados de ocorrência da doença, países de coloração amarela apresentam transmissão em apenas algumas regiões e países de coloração vermelha apresentam transmissão em todo seu território. Fonte: CDC, 2020.

3 O CICLO DA MALÁRIA

Durante a hematofagia, a fêmea do mosquito ao picar um indivíduo transmite ao hospedeiro vertebrado (intermediário) a forma infectante do parasita, denominada de esporozoíto. O esporozoíto migra no fluxo sanguíneo até o fígado e invade os hepatócitos, que entre o 6º e 14º dia após a invasão, liberam os merozoítos que então invadem hemácias. Em casos de infecção com *P. vivax* e *P. ovale*, o parasita apresenta também um estágio denominado de hipnozoíto, que pode permanecer dormente nos hepatócitos e causar recaídas após um episódio inicial de malária, caso não tratado.

A invasão do eritrócito ocorre em uma série de diferentes passos, começando pelo contato inicial, seguido pela reorientação do merozoíto e fixação apical que leva então a formação de uma junção móvel que progride até a internalização do parasita (Wright and Rayner 2014;) sob a formação de um vacúolo parasitóforo. Após o processo de esquizogônia, que produz entre 8 e 32 merozoítos novos, ocorre a lise da hemácia infectada e invasão de outros eritrócitos. Eventualmente alguns desses merozoítos são destinados a se diferenciarem em gametócitos, forma infectante para o vetor. O desenvolvimento de gametócitos ocorre de forma distinta entre as espécies de plasmódio,

ocorrendo em 48 horas em *P. berghei* e *P. yoelii* e de forma mais complexa em *P. falciparum*, passando por cinco estágios morfológicamente distintos com uma duração de 12 dias.

A transmissão para o mosquito ocorre quando este, durante o repasse sanguíneo entra em contato com sangue infectado, sugando os gametócitos maduros. Desencadeado por mudanças de temperatura e de ácido xanturênico (Billker et al., 1998), os gametócitos se diferenciam em gametas feminino e masculino, que após a fecundação dos gametas, há a formação dos zigotos, também chamados de oocinetos. Os oocinetos invadem as células do epitélio intestinal do mosquito e se desenvolvem em oocistos, que quando maduros são capazes de liberar milhares de novos esporozoítos, os quais migram para as glândulas salivares do mosquito e por meio de um novo repasto sanguíneo são transmitidas ao hospedeiro intermediário, o ser humano.

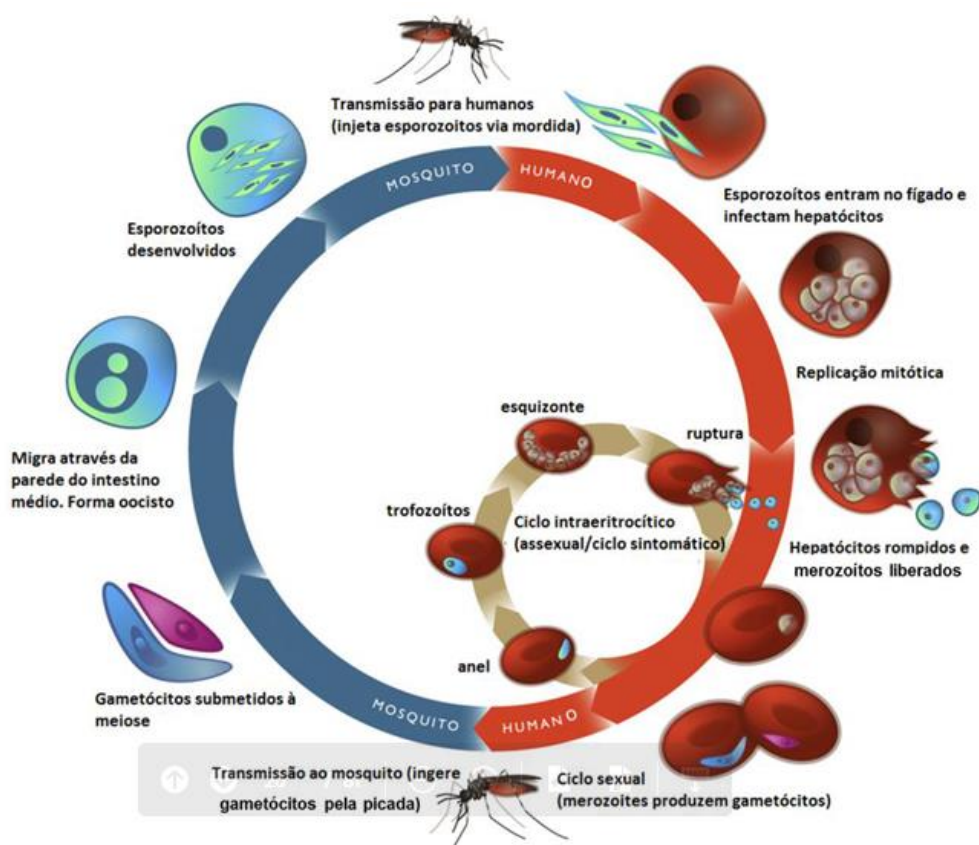


Figura 02. Ciclo de vida *Plasmodium* spp. Adaptado de Klein (2013).

4 A FAMÍLIA ApiAP2

No caso de *P. falciparum*, a expressão de genes parece ser estritamente regulada, isto é, em cada ponto de desenvolvimento por exemplo do ciclo eritrocítico grupos de genes são transcricionalmente ativos ou inativos, com exceção de alguns genes de antígenos variantes. Entretanto, inicialmente poucos fatores de transcrição canônicos foram identificados no genoma do parasita (Callebaut et al., 2005; Coulson et al., 2004).

Em 2005, Balaji et al., descreveram a família de fatores de transcrição ApiAP2 no filo Apicomplexa. Estes domínios apresentam homologia com a família de fatores de transcrição encontrada em plantas, denominada AP2/ERF, que possui 60 aminoácidos de tamanho e dependendo do arranjo no genoma como em tandem ou em módulo simples estão relacionadas a diferentes funções, no desenvolvimento ou na resposta a estresse ambiental, respectivamente (Riechmann & Meyerowitz, 1998).

Por analogia à importância dos AP2 encontrados em plantas e pela expressão diferencial destes domínios nos estágios de sangue em plasmódio, os autores acreditavam que as ApiAP2 poderiam ser funcionais como fatores de transcrição de genes específicos e estarem envolvidos na regulação do desenvolvimento (Balaji et al., 2005).

Cada proteína ApiAP2 apresenta de um a quatro domínios AP2 em sua composição, podendo haver, em algumas proteínas, a associação de outros motivos de ligação ao DNA, como AT-Hook (Balaji et al., 2005), domínios dedo de zinco, atividade de Acil-CoA-N-aciltransferase e a repetição de pentapeptídeos (Jeninga et al., 2019).

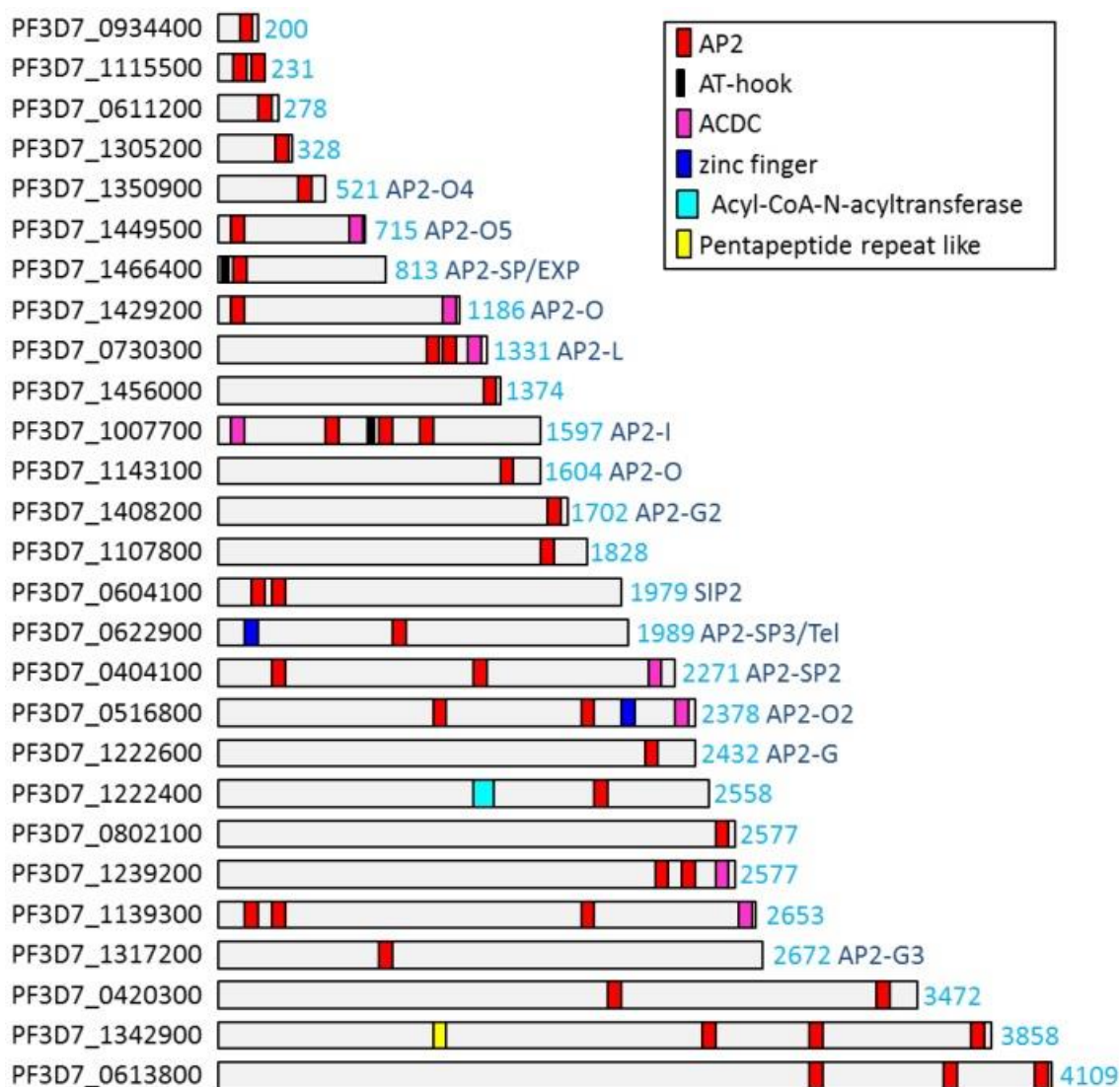


FIGURA 03. Proteínas contendo domínios ApiAP2 em *P. falciparum* organizadas por tamanho com domínios ApiAP2 marcados em vermelho, domínio-coincidente AP2 encontrado principalmente na porção C-terminal marcado em rosa, domínios *AT-Hook* marcados em preto, domínios Acil-CoA-N-acyltransferase marcado em azul e domínios de repetições de pentapeptídeos marcados em amarelo. Adaptado de Jeninga et al., 2019.

A regulação da expressão gênica realizada por fatores de transcrição específicos é realizada pela interação do domínio de ligação ao DNA presente na proteína, no caso os domínios AP2, com os domínios presentes nas regiões regulatórias dos genes-alvo. Em comparação com os domínios AP2 vegetais que se ligam à caixa canônica GCC, os ApiAP2 possuem afinidade por diferentes sequências e domínios AP2 de uma mesma proteína podem interagir com motivos de DNA distintos (Campbell et al., 2010).

Para compreender os mecanismos de controle regulatórios da expressão genica, Campbell et al (2010) realizaram o mapeamento do genoma de *P. falciparum* a fim de identificar os motivos de ligações destes fatores de transcrição no parasita, realizando assim a predição dos seus genes alvo e possível função relacionada. Aparentemente, fatores ApiAP2 formam uma rede de interação, que além de regular seus genes alvo também podem se autorregular.

Considerando que muitos dos fatores ApiAP2 são essenciais para a sobrevivência do parasita (M. Zhang et al., 2018), provavelmente pelo seu papel na regulação da transcrição, o conhecimento de tais complexos pode auxiliar na descoberta de novos candidatos a alvos de antimaláricos, uma vez que não são encontradas proteínas homólogas de ApiAP2 em mamíferos (Painter et al., 2011)

5 ApiAP2 E O CICLO DE DESENVOLVIMENTO DE *Plasmodium spp.*

5.1 Estágio assexual

Para acessar a função de 26 fatores ApiAP2 em parasitas *P. berghei* e *P. yoelii* foram preparadas linhagens de *knockout* em cada um dos genes que os codificam. Muitos fatores não são deletáveis e linhagens *knockout* apresentaram fenótipo letal, identificando-os assim como essenciais para o desenvolvimento na fase sanguínea (Modrzynska et al., 2017; C. Zhang et al., 2017).

O início da fase assexuada ocorre a partir da deposição dos esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro intermediário por meio da picada de um mosquito infectado. O desenvolvimento de esporozoítos dentro do mosquito parece ser orquestrado por AP2-sp (PBANKA_132980), que é expresso a partir do oocisto tardio ao esporozoíto presente na glândula salivar dos Anofelinos e sua deleção bloqueia a formação deste estágio móvel (Painter et al., 2011). O gene ortólogo em *P. falciparum*, codifica uma proteína de 813 aminoácidos que possui um motivo *AT-Hook* e uma única região AP2 de 60 aminoácidos na porção C-Terminal (de Silva et al., 2008) (vide Figura 03).

AP2-sp identificada em *P. berghei* e PfAP2-exp (Pf3D7_066400) identificada em *P. falciparum* compartilham 82% de identidade no domínio de ligação ao DNA e reconhecem motivos que se iniciam com TGCATG, comum em porções próximas aos genes específicos de esporozoítos já conhecidos (Yuda et al., 2010). Curiosamente, os

mesmos *motifs* foram encontrados também em regiões *upstream* de determinados membros de subfamílias (“UpsB e UpsC”) de genes variantes *var*, sugerindo que esses genes seriam controlados por PfAP2-exp (Campbell et al., 2010).

Apesar da similaridade entre os dois domínios, ApiAP2-sp foi passível de interrupção em *P. berghei* (mas com efeito inibitório no crescimento), revelando não ser essencial para a fase intraeritrocítica (Modrzynska et al., 2017), porém em *P. falciparum* o *knockout* de ApiAP2-exp em parasitas assexuados da fase sanguínea gerou fenótipos letais (Martins et al., 2017). Martins e colaboradores desenvolveram proteínas AP2-exp truncadas que continham domínios de ligação AP2 ao DNA na porção N-terminal e seus mutantes apresentaram regulação positiva dos membros das famílias de antígenos variantes RIFINs e STEVORs, além de alteração morfológica nos *knobs* presentes na superfície do glóbulo vermelho, indicando um papel importante para a porção C-terminal de AP2-exp (Martins et al., 2017).

Além de ApiAP2-sp foram identificados também ApiAP2-sp2 (PY17X_1003200/PBANKA_1001800) e ApiAP2-sp3 (PY17X_1123200/PBANKA_1121800) durante os ensaios de *knockout* em *P. berghei* e *P. yoelii*, na qual a interrupção afetou na capacidade de produção de esporozoítos viáveis. Os autores acreditam que ApiAP2-sp2 é essencial para o desenvolvimento inicial do esporozoítos ainda dentro do mosquito e ApiAP2-sp3 é essencial para garantir a maturação completa dos mesmos. (Modrzynska et al., 2017; C. Zhang et al., 2017). Não há dados sobre genes ortólogos em *P. falciparum*.

Na corrente sanguínea os esporozoítos migram para o fígado do hospedeiro vertebrado, onde invadem os hepatócitos se transformando em esquizontes do fígado e após múltiplas divisões nucleares, liberam merozoítos maduros. Previsto para reconhecer motivos AATTTCC, ApiAP2-L (PBANKA_021440, ortólogo de PF3D7_0730300) codifica uma proteína de 1272 aminoácidos que possui dois domínios AP2 e, até o momento, é o único fator de transcrição com função relacionadas a este estágio (Iwanaga et al., 2012).

Iwanaga e colaboradores (2012) relataram a presença da proteína no núcleo de trofozoítos durante a fase de desenvolvimento de sangue e, nos mosquitos, foram visualizadas em esporozoítos do oocisto e na glândula salivar do vetor, porém os sinais deixaram de serem visualizados de forma repentina com a formação do esquizonte maduro no fígado. Ensaios de *knockout* de AP2-L revelaram que os mutantes apresentam crescimento intraeritrocítico, desenvolvimento de todos estágios no vetor e capacidade de invasão dos hepatócitos normais, entretanto, houve atraso na permeabilidade e parada do

desenvolvimento dos parasitas após 36 horas de invasão, revelando seu efeito na capacidade de infecção do fígado (Iwanaga et al., 2012).

Nas espécies de *P. vivax* e *P. cynomolgi*, ambas produtoras de hipnozoítos que permanecem dormentes no fígado do hospedeiro, foi identificada a atuação de um outro fator de transcrição ApiAP2 que teve sua ação relacionada a essa capacidade de quiescência. AP2-Q (PCYB_102390 e PVP01_1016100)(Gural et al., 2018; Voorberg-van der Wel et al., 2017). Coerente com essa observação, *P. falciparum* não possui ortólogo deste gene no cromossomo 10, apesar dos genes adjacentes serem sintênicos.

Após a liberação dos merozoítos maduros na corrente sanguínea, estes invadem os eritrócitos a fim de se multiplicarem, fase regida pelo fator de transcrição AP2-I. Essa proteína apresenta um domínio AT-Hook, um domínio ACDC, um sinal de localização nuclear e três domínios AP2 distintos, na qual cada um reconhece diferentes motivos de DNA (Santos et al., 2017; Campbell et al., 2010). Ensaios de *knockout* individual dos três domínios AP2 revelou que apenas o terceiro, que reconhece o motivo GTGCA (Campbell et al., 2010), é necessário para a manutenção da função específica, posto que foi o único a gerar fenótipo letal quando interrompido (Santos et al., 2017).

AP2-I, foi detectada nos núcleos de trofozoítos e esquizontes, porém não detectável em formas recém invadidas (estágio de anel), apresenta 177 regiões de ligações no genoma de *P. falciparum* (Santos et al., 2017) na qual constam sete regiões 5' (promotores) de genes ApiAP2, incluindo seu próprio, sugerindo uma capacidade de auto regulação. Os picos de expressão de AP2-I se sobrepõem a 65% das regiões ligadas por PfBP1 (proteína bromo domínio), que apresenta regulação positiva de genes relacionados a invasão (Josling et al., 2015), o que demonstra a associação de AP2-I à genes de invasão e pode indicar a existência de um complexo de interação que medeia a expressão destes genes (Santos et al., 2017).

Diferente das proteínas AP2 citadas acima que apresentam função principal de fatores de transcrição que regem a regulação gênica, três proteínas ApiAP2 demonstraram possuir papéis diferentes, porém igualmente importantes para o genoma do parasita. PfSIP2 (PF3D7_0604100), possui 230kDa de tamanho, dois domínios AP2 arranjados em tandem e possui ortólogo em todas espécies de *Plasmodium* sequenciadas até o momento. A deleção de seu primeiro domínio é refratária, expondo que o mesmo é o único necessário para a ligação ao DNA e que possui papel fundamental para a esquizogônia, fase em que é produzida e liberada uma proteína N-terminal de 60 kDa (Flueck et al., 2010). Esta proteína de 60kDa de PfSIP2 é incapaz de se ligar ao seu

domínio de ligação previsto (GTGCA), se associando apenas aos motivos SPE2 (Campbell et al., 2010), localizados *upstream* de genes *var* subteloméricos do tipo UpsB,

De todos 777 sítios alvos para PfsIP2-N, 94% correspondem a duas regiões distintas da heterocromatina subtelomérica, uma correspondendo a sequências em tandem localizadas *upstream* de genes *var* subteloméricos e outra associados a 2/3 de elementos repetitivos dentro de regiões de teloméricas (TAREs), resultados que sugerem um papel multifuncional para essa proteína e seu potencial papel de formação de heterocromatina (Flueck et al., 2010).

PfAP2-Tel, codificada por PF3D7_0622900, apresenta 237 kDa de tamanho e contém um único domínio AP2 de 46 aminoácidos, que apesar de ser menor do que o tamanho médio dos demais, garante a ligação direta da proteína às repetições teloméricas (Sierra-Miranda et al., 2017). Sua expressão ocorre durante o ciclo sanguíneo com picos de enriquecimento em todos 28 telômeros de *P. falciparum*. e também em importantes famílias de genes variante como PfEMP1 (codificada por *var*), *rifin*, *stevor* e *Pfmc-2TM* (Sierra-Miranda et al., 2017) também de localização subteloméricas, o que mostra que PfAP2-Tel pode ter função relacionada a manutenção da extremidade cromossômica.

Juntamente a PfsIP2 e PfAP2-Tel, PfAP2-HC também possui função principal relacionada a heterocromatina e a biologia final do cromossomo. Carrington e colaboradores (2021) (Carrington et al., 2021) investigaram o padrão de expressão de PfAP2-HC a fim de entender sua função no genoma do parasita, os resultados demonstraram que a proteína foi detectável em trofozoítos e em esquizontes antes de sua maturação, não se mostrou enriquecida nos motivos alvos previstos CACACA (Campbell et al., 2010) e que seu domínio AP2 é dispensável para a ligação ao DNA. Porém para se ligar à heterocromatina PfAP2-HC é dependente de PfHP1, que assim como a trimetilação da histona 3 lisina 9 (H3K9me3), está intimamente relacionada as porções de cromatina condensada (Pérez-Toledo et al., 2009).

5.2 Diferenciação sexual

As formas ingeridas pelo mosquito vetor e que garantem a transmissão do parasita são os gametas femininos e masculinos, originários da diferenciação das células assexuadas. O comprometimento sexual, etapa anterior a diferenciação, ocorre ainda na esquizogônia e possui como regulador chave um fator de transcrição essencial para o

desenvolvimento do parasita, ApiAP2-G. (Sinha et al., 2014; Zhang et al., 2017). PF3D7_1222600 (ortólogo PBANKA_143750/ PY17X_1440000) codifica uma proteína de 2330 aminoácidos que contém um único domínio de ligação AP2 ao DNA, de 55 aa, e a análise de expressão identificou a presença da mesma em células sexualmente comprometidas ainda em estágio de sangue, com abundância antes do aparecimento dos gametócitos e estando presente até fase I de desenvolvimento destes (Josling et al., 2020; Sinha et al., 2014; van Biljon et al., 2019).

Apesar de ser expresso no estágio de sangue, ApiAP2-G não é detectável em estágios de esquizontes em *P. berghei* e *P. yoelii*, enquanto sua expressão é contínua nesta fase em *P. falciparum*, o que pode indicar que o desenvolvimento sexual pode divergir entre essas espécies (C. Zhang et al., 2017). Por estar associado a estruturas de silenciamento epigenéticos durante a fase assexuada PfAP2-G é encontrado em estado heterocromático na maioria dos parasitas, regulação que aparenta ser realizada por ligações de H3K9me3, PfHda2 (histona desacetilase 2) e associações de PfHP1, já em células comprometidas essas ligações são removidas por mecanismos envolvendo a proteína GDV1 (desenvolvimento de gametócitos 1) (Brancucci et al., 2014; Filarsky et al., 2018; Kafsack et al., 2014)

O motivo de ligação (Gx)GTACNC é reconhecido por ApiAP2 (Campbell et al., 2010) e por meio da predição de seus genes alvo foi visualizado que este motivo está presente oito vezes a 2,1kb a 3,6kb *upstream* de seu próprio promotor, o que indica uma capacidade de auto regulação por meio de ciclo de feedback positivo (Kafsack et al., 2014). Muitos genes ligados por PfAP2-G também são alvos do fator de transcrição PfAP2-I e experimento de imunoprecipitação mostraram que estes podem interagir diretamente nos promotores, mecanismo importante que aumenta a especificidade da regulação genica (Josling et al., 2020). De forma inesperada, promotores de genes variantes UpsB, que codificam proteínas de citoadesão também foram alvos de PfAP2-G.

Outro fator de transcrição identificado em *Plasmodium spp.* apresenta funções importantes durante a gametogênese, AP2-G2 (PF3D7_1408200/ PBANKA_1034300) é observado desde formas anel sexualmente comprometidos até o desenvolvimento em gametócitos masculinos e femininos maduros. Ensaios de *knockout* revelaram que mesmo quando seu gene é interrompido o compromisso sexual não foi afetado, porém os parasitas

não foram capazes de se desenvolverem completamente em suas formas sexuais e houve bloqueio de transmissão para o vetor (Modrzynska et al., 2017; Yuda et al., 2015; C. Zhang et al., 2017). Desta forma AP2-G2 é aparentemente necessário *downstream* a AP2-G na cascata de proteínas ApiAP2 envolvidas na gametogênese (Sinha et al., 2014).

Análises de ChIP-seq revelou que o motivo de ligação de AP2-G2, GTTG(T/C), foi identificado em 1500 gene na qual grande parte relacionada com a proliferação no estágio de sangue (Yuda et al., 2015). Na ausência deste fator de transcrição nenhum gene-alvo foi regulado negativamente, sugerindo que ele induz a repressão transcricional de genes de estágio assexuado em gametócitos iniciais e contribui para sua maturação e desenvolvimento.

PfAP2-G2 compartilha 80% de seus sítios de ligação com marcas de silenciamento epigenético H3K36me3, indicando que pode haver uma colaboração entre os mesmos (Singh et al., 2021). Xu e colaboradores (2021) identificaram que a deleção de PfAP2-G2 desenvolveu papel repressor na expressão de *PfMDV-1*, que é importante para a maturação em gametócitos e houve redução especialmente da quantidade de gametócitos masculinos. No mesmo estudo foi identificado que *PfAP2-G* pode sofrer regulação durante a fase assexuada de AP2-G2, entretanto não foi possível elucidar se o efeito é direto ou indireto.

Em ensaios com *P. yoelii* foi identificada a presença um terceiro fator AP2 também relacionado a gametócitos na qual sua deleção resulta na redução significativa de gametócitos, oocistos e esporozoítos. AP2-G3 (PY17X_1417400/ PBANKA_1415700) foi refratário a *knockout* em *P. berghei*, mas com a utilização de tecnologia CRISPR/Cas9 foi bem sucedido em *P. yoelii*, o que gerou uma redução do número de estágios sexuais e sugeriu que sua atuação pode ter como alvo AP2-G. Por apresentar forte expressão citoplasmática em estágios assexuados, AP2-G3 pode possivelmente detectar sinais ambientais que sirvam como chave para a regulação de AP2-G no núcleo (Jeninga et al., 2019; C. Zhang et al., 2017).

PfAP2-G4 (Pf3D7_1222400) aparenta atuar como ponto de verificação de compromisso sexual na gametogênese, sendo transcrito em trofozoítos, estágio importante por ser determinante para a diferenciação do parasita (Jeninga et al., 2019; Poran et al., 2017). PfAP2-G5, identificado por Shang et al., 2021, foi considerado como indispensável para essa de desenvolvimento de gametócitos posto que ao se ligar à região

reguladora de PfAP2-G inibe sua ativação e de seus genes alvo, evitando o início do comprometimento sexual. A remoção de PfAP2-G5 resulta na indução de níveis de AP2-G que por consequência interrompe a reprodução assexuada, mas os parasitas são incapazes de desenvolver gametócitos maduros. Se ligando a regiões *upstream* de 517 genes, a atuação de AP2-G5 pode estar envolvida em diferentes processos fisiológicos além da gametogênese, como remodelação da interação parasita hospedeiro, patogênese, dentre outros (Shang et al., 2021).

5.3 Esporogônia

Dentro de mosquitos *Anopheles spp.*, seu hospedeiro definitivo, os gametócitos do protozoário se fecundam para a formação do zigoto que se desenvolve em oocinetos, fase móvel do parasita que invade as células epiteliais do intestino médio, formando oocistos que, quando maduro liberam novos esporozoítos prontos para reiniciarem o ciclo infectando um novo hospedeiro vertebrado. Assim como nas demais fases, essas alterações estão relacionadas com a atuação dos fatores de transcrições AP2.

O primeiro membro desta família a ser relacionado com a produção normal de oocinetos foi a proteína produzida por PBANKA_0905900 (ortólogo de PF11_0442), AP2-O. Apresentando 541 genes como possíveis alvos, muitos relacionados à morfogênese e invasão do intestino médio por oocinetos e por possuir sequência de ligação ao DNA amplamente conservada entre os ortólogos, esses dados sugerem grande importância da proteína para o desenvolvimento do parasita. (Painter et al., 2011).

As tentativas de interrupção do gene que codifica AP2-O foram falhas, indicando que sua função é essencial para o estágio intraeritrocítico, porém ensaios de *knockdown*, que apenas diminuíram significativa e temporariamente seus níveis de expressão, foram eficazes e os mutantes gerados foram capazes de manter crescimento assexuado permitindo a investigação da atuação da proteína (Cubillos et al., 2021).

O motivo de reconhecimento da proteína, TAGCTA (Campbell et al., 2010) além de ser relacionado a genes de invasão no vetor é também encontrado em regiões *upstream* de genes relacionados a formação de proteínas peliculares associadas ao anel apical (ARA1), genes relacionados ao sistema oxirredução, que é essencial ao combate do

estresse oxidativo e foi enriquecido também em regiões reguladoras de genes variantes *var* (Yuda et al., 2009).

A investigação da relação de AP2-O com genes *var* em *Plasmodium falciparum* revelou que ao ser depletado a memória transcricional dessa família de genes variantes é apagada e a quantidade de células aderidas aos receptores CD36 expressas em células CHO foi significativamente menor, resultados que demonstram a relação importante de AP2-O com a memória epigenética de genes *var* ativos e sua possível influência na citoaderência de células infectadas por parasitas dessa espécie (Cubillos et al., 2021).

Outros quatro fatores AP2 foram identificados com relação a esporogônia. O *knockout* de AP2-O2 (PBANKA_12311600), que é expresso durante toda a fase de sangue e também durante a diferenciação sexual até o estágio de oocistos, resultou em diferentes resultados em *P. berghei* e *P. yoelii*, gerando oocinetos deformados e oocinetos normais, respectivamente. AP2-O3 aparenta atuar como um repressor de transcrição em gametócitos femininos, posto que sua interrupção gerou a formação de gametas inférteis. (Modrzynska et al., 2017; C. Zhang et al., 2017). Li et al. (2021) confirmaram que a ausência de atuação de AP2-O3 em *P. falciparum* teve efeito positivo em genes masculinos que eram reprimidos em gametócitos feminino, na qual estes genes eram relacionados com reparo e replicação de DNA, biogênese de axonema e montagem de flagelos, além de também ter resultado na interrupção da formação de oocinetos maduros (Li et al., 2021).

Relatado em *P. yoelii*, AP2-O4 (PY17X_1369400) é expresso durante toda fase sexual e seu bloqueio interrompeu o desenvolvimento de oocistos e esporozoítos, mas não teve efeito no número de gametócitos ou na motilidade do oocinetos (Modrzynska et al., 2017; C. Zhang et al., 2017). Por fim, AP2-O5 (PY17X_1417000) é essencial para a motilidade do oocineto e para o desenvolvimento do oocisto e quando interrompido por *knockout* afetou significativamente as funções das fases descritas acima (C. Zhang et al., 2017).

6 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido com os preceitos do estudo exploratório, sendo acessados como fontes artigos científicos obtidos nas bases de dados dos sites WHO,

NCBI, ELSEVIER, PLOS PATHOGENS, PUBMED e NATURE. Foram utilizados múltiplos artigos internacionais disponíveis online e completos, citados abaixo.

A coleta de dados seguiu a premissa de delineamento teórico conceitual dos textos utilizados, sendo realizada leitura exploratória e seletiva de todo material selecionado, seguido pelo registro das informações extraídas das fontes.

Com finalidade de delinear e ordenar as informações, foi realizada leitura analítica do material para possibilitar a discussão dos dados obtidos do referencial teórico relativo à temática abordada no estudo.

7 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As recentes descobertas que abordam as possíveis funções dos ApiAP2 em *Plasmodium spp.* auxiliam no avanço da compreensão do seu papel no ciclo de vida do parasita, porém ainda assim, muitas incógnitas permanecem. Apesar da grande similaridade dos domínios AP2-sp e seu ortólogo PfAP2-exp, estes reagem de formas distintas às tentativas de *knockout*, na qual o primeiro não foi detectado e não aparenta ser essencial para a fase intraeritrocítica e em contraste, PfAP2-exp é expresso nesta fase (principalmente em anel) e sua interrupção acarreta em mutantes com fenótipos letais (Martins et al., 2017; Yuda et al., 2010). De forma semelhante, a expressão pontual e induzida por falta de liso-fosfatidil-colina de AP2-G em *P. falciparum* (Brancucci et al., 2017) se difere de seus ortólogos presentes em *P. yoelii* e *P. berghei* em que sua expressão é ausente durante a fase de esquizonte (Kafsack et al., 2014; Zhang et al., 2017). Essas diferenças de estágios de expressão são interessantes pois expõem que compartilhar alto grau de identidade não garante que os domínios AP2 desempenham o mesmo papel em espécies ortólogas.

A recente descoberta de AP2-Q, exclusivo de *P. vivax*, *P. cynomolgi* e *P. ovale*, como um possível biomarcador de quiescência o torna um candidato atraente para investigações detalhadas de sua atuação no ciclo de vida destas espécies. Devido a capacidade de permanecer inativo durante semanas no fígado do hospedeiro causando depois recaídas de infecção, juntamente ao limitado conhecimento de sua biologia devido ao baixo perfil antigênico e metabólico e pela dificuldade de cultivo *in vitro* de esporozoítos de *P. vivax* em culturas primárias de hepatócitos humanos, os hipnozoítos

são um grande obstáculo para qualquer tentativa de erradicação da malária, portanto AP2-Q pode ser um alvo farmacêutico ideal para o desenvolvimento de drogas específicas para fases latentes (Cubi et al., 2017; Gural et al., 2018).

Há muitas décadas parasitas apicomplexos causam milhares de mortes na população humana. A identificação de 26 fatores de transcrição específicos ApiAP2 em *Plasmodium spp.*, 60 em *Toxoplasma gondii* e 10 em *Cryptosporidiedium spp.* (Jeninga et al., 2019) é de grande importância para a compreensão da biologia desses parasitas. Embora também anotados em outras espécies pertencentes ao filo apicomplexa, como em *Babesia spp.*, *Theileiria spp.*, e *Eimeria spp.*, poucos estudos relacionados a caracterização detalhada da atuação de ApiAP2 foram conduzidos nestes parasitas. É esperado que com a identificação de novos domínios em espécies apicomplexas, estes possuam funções tanto divergentes, como similares com os fatores já relatados em *Plasmodium* e com isso possam auxiliar no desenvolvimento de futuras estratégias com funcionalidade convergentes em diversos parasitas apicomplexas (Alzan et al., 2016).

8 CONCLUSÃO

A partir dos estudos apresentados, fica claro a importância das proteínas ApiAP2 em apicomplexos, especialmente aqui relatado sua atuação como repressores e ativadores nas diferenciações gênicas e morfológicas em *Plasmodium spp.* A utilização de diferentes metodologias e técnicas corroboraram na compreensão das funções dos domínios AP2, a exemplo, AP2-G3 foi refratário em *P. berghei* à técnica de *knockout* utilizada por Modrynska e colaboradores (2017), porém em *P. yoelii* PyAP2-G3 foi passível de interrupção por utilização de CRISPR/Cas9, o que permitiu obter conhecimento de sua possível atuação no genoma. Técnicas de *knockdown* temporários também são importantes metodologias que permitem a realização de estudos com genes refratários à deleção, como no caso de Ap2-O, se tornando uma opção a ser utilizada nos estudos dos demais genes que, devido a esse viés, ainda não tem função elucidada.

Compreender os fatores que orquestram a regulação de genes essenciais para o desenvolvimento assexuado e para a diferenciação sexual em *Plasmodium spp.* é necessário para projetar melhores medidas de controle da malária. Além disso, devido a crescente resistência do parasita às drogas mais utilizadas de combate à doença, a confirmação da

importância da atuação dos fatores AP2 nesses mecanismos os tornam atrativos alvos para novos medicamentos antimaláricos, posto que a ausência de ortólogos de ApiAP2 em humanos torna seguro seu combate no corpo do hospedeiro vertebrado.

REFERÊNCIAS

- Alzan, H. F., Knowles, D. P., & Suarez, C. E. (2016). Comparative Bioinformatics Analysis of Transcription Factor Genes Indicates Conservation of Key Regulatory Domains among *Babesia bovis*, *Babesia microti*, and *Theileria equi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004983>
- Balaji, S., Babu, M. M., Iyer, L. M., & Aravind, L. (2005). Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Research*, *33*(13), 3994. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI709>
- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., Rogers, M., Sinden, R. E., & Morris, H. R. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* *1998* 392:6673, 392(6673), 289–292. <https://doi.org/10.1038/32667>
- Brancucci, N. M. B., Bertschi, N. L., Zhu, L., Niederwieser, I., Chin, W. H., Wampfler, R., Freymond, C., Rottmann, M., Felger, I., Bozdech, Z., & Voss, T. S. (2014). Heterochromatin protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. *Cell Host & Microbe*, *16*(2), 165–176. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2014.07.004>
- Brancucci, N. M. B., Gerdt, J. P., Wang, C., Jiang, H. Y., Clardy, J., Marti, M., de Niz, M., Philip, N., Adapa, S. R., Zhang, M., Hitz, E., Niederwieser, I., Boltryk, S. D., Laffitte, M.-C., Clark, M. A., Grü, C., Ravel, D., Soares, A. B., Demas, A., ... Jiang, R. H. Y. (2017). Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, *171*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.020>
- Callebaut, I., Prat, K., Meurice, E., Mornon, J. P., & Tomavo, S. (2005). Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: Conserved features and differences relative to other eukaryotes. *BMC Genomics*, *6*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-100/TABLES/2>

- Campbell, T. L., de Silva, E. K., Olszewski, K. L., Elemento, O., & Llinás, M. (2010a). Identification and Genome-Wide Prediction of DNA Binding Specificities for the ApiAP2 Family of Regulators from the Malaria Parasite. *PLoS Pathogens*, *6*(10), e1001165. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1001165>
- Carrington, E., Cooijmans, R. H. M., Keller, D., Toenhake, C. G., Bártfai, R., & Voss, T. S. (2021). The ApiAP2 factor PfAP2-HC is an integral component of heterochromatin in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *iScience*, *24*(5). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.102444>
- Coulson, R. M. R., Hall, N., & Ouzounis, C. A. (2004). Comparative genomics of transcriptional control in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Research*, *14*(8), 1548–1554. <https://doi.org/10.1101/GR.2218604>
- Cubi, R., Vembar, S. S., Biton, A., Franetich, J. F., Bordessoulles, M., Sossau, D., Zanghi, G., Bosson-Vanga, H., Benard, M., Moreno, A., Dereuddre-Bosquet, N., le Grand, R., Scherf, A., & Mazier, D. (2017). Laser capture microdissection enables transcriptomic analysis of dividing and quiescent liver stages of *Plasmodium* relapsing species. *Cellular Microbiology*, *19*(8). <https://doi.org/10.1111/CMI.12735>
- Cubillos, E. F. G., Prata, I. O., Fotoran, W. L., Ranford-Cartwright, L., & Wunderlich, G. (2021). The Transcription Factor PfAP2-O Influences Virulence Gene Transcription and Sexual Development in *Plasmodium falciparum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 400. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.669088/BIBTEX>
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2021). Disponível em: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html
- Daiana Miotto, L., Carla Faccin Galhardi, L., & Karine Amarante, M. (2012). *Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária Parasitological and immunological aspects of malaria Endereço para Correspondência. 1.*
- de Silva, E. K., Gehrke, A. R., Olszewski, K., León, I., Chahal, J. S., Bulyk, M. L., & Llinás, M. (2008). Specific DNA-binding by Apicomplexan AP2 transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(24), 8393–8398. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0801993105>
- Filarsky, M., Frasncka, S. A., Niederwieser, I., Brancucci, N. M. B., Carrington, E., Carrió, E., Moes, S., Jenoe, P., Bártfai, R., & Voss, T. S. (2018). GDV1 induces sexual commitment of malaria parasites by antagonizing HP1-dependent gene silencing. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6381), 1259–1263. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN6042>
- Flueck, C., Bartfai, R., Niederwieser, I., Witmer, K., Alako, B. T. F., Moes, S., Bozdech, Z., Jenoe, P., Stunnenberg, H. G., & Voss, T. S. (2010). A Major Role for the

Plasmodium falciparum ApiAP2 Protein PfSIP2 in Chromosome End Biology. *PLoS Pathogens*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000784>

Gandra, Alana. Malária; casos no Brasil estão em queda, afirma infectologista. Agência Brasil. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2021-04/malaria-casos-no-brasil-estao-em-queda-afirma-infectologista>. Acesso em 7 de Dez de 2021.

Gural, N., Mancio-Silva, L., Miller, A. B., Galstian, A., Butty, V. L., Levine, S. S., Patrapuvich, R., Desai, S. P., Mikolajczak, S. A., Kappe, S. H. I., Fleming, H. E., March, S., Sattabongkot, J., & Bhatia, S. N. (2018). In Vitro Culture, Drug Sensitivity, and Transcriptome of *Plasmodium Vivax* Hypnozoites. *Cell Host & Microbe*, 23(3), 395-406.e4. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2018.01.002>

Iwanaga, S., Kaneko, I., Kato, T., & Yuda, M. (2012). Identification of an AP2-family Protein That Is Critical for Malaria Liver Stage Development. *PLoS ONE*, 7(11), 47557. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047557>

Jeninga, M. D., Quinn, J. E., & Petter, M. (2019). ApiAP2 Transcription Factors in Apicomplexan Parasites. *Pathogens*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8020047>

Josling, G. A., Petter, M., Oehring, S. C., Gupta, A. P., Dietz, O., Wilson, D. W., Schubert, T., Längst, G., Gilson, P. R., Crabb, B. S., Moes, S., Jenoe, P., Lim, S. W., Brown, G. v., Bozdech, Z., Voss, T. S., & Duffy, M. F. (2015). A *Plasmodium Falciparum* Bromodomain Protein Regulates Invasion Gene Expression. *Cell Host & Microbe*, 17(6), 741–751. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2015.05.009>

Josling, G. A., Russell, T. J., Venezia, J., Orchard, L., van Biljon, R., Painter, H. J., & Llinás, M. (2020). Dissecting the role of PfAP2-G in malaria gametocytogenesis. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15026-0>

Kafsack, B. F. C., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., Williams, A. E., Drought, L. G., Kwiatkowski, D. P., Baker, D. A., Cortés, A., & Llinás, M. (2014a). A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in human malaria parasites. *Nature*, 507(7491), 248. <https://doi.org/10.1038/NATURE12920>

Li, Z., Cui, H., Guan, J., Liu, C., Yang, Z., & Yuan, J. (2021). *Plasmodium* transcription repressor AP2-O3 regulates sex-specific identity of gene expression in female gametocytes. *EMBO Reports*, 22(5). <https://doi.org/10.15252/EMBR.202051660>

Martins, R. M., Macpherson, C. R., Claes, A., Scheidig-Benatar, C., Sakamoto, H., Yam, X. Y., Preiser, P., Goel, S., Wahlgren, M., Sismeiro, O., Coppée, J. Y., & Scherf, A. (2017). An ApiAP2 member regulates expression of clonally variant genes of the

- human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12578-y>
- Menard, D., & Dondorp, A. (2017). Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(7), 1–24. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025619>
- Modrzynska, K., Pfander, C., Chappell, L., Yu, L., Suarez, C., Dundas, K., Gomes, A. R., Goulding, D., Rayner, J. C., Choudhary, J., & Billker, O. (2017). A Knockout Screen of ApiAP2 Genes Reveals Networks of Interacting Transcriptional Regulators Controlling the Plasmodium Life Cycle. *Cell Host & Microbe*, 21(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2016.12.003>
- Painter, H. J., Campbell, T. L., & Llinás, M. (2011). The Apicomplexan AP2 family: Integral factors regulating Plasmodium development. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 176(1), 1. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2010.11.014>
- Pérez-Toledo, K., Rojas-Meza, A. P., Mancio-Silva, L., Hernández-Cuevas, N. A., Delgadillo, D. M., Vargas, M., Martínez-Calvillo, S., Scherf, A., & Hernandez-Rivas, R. (2009). Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 binds to trimethylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of var genes. *Nucleic Acids Research*, 37(8), 2596. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP115>
- Poran, A., Nötzel, C., Aly, O., Mencia-Trinchant, N., Harris, C. T., Guzman, M. L., Hassane, D. C., Elemento, O., & Kafsack, B. F. C. (2017). Single-cell RNA-seq reveals a signature of sexual commitment in malaria parasites. *Nature*, 551(7678), 95. <https://doi.org/10.1038/NATURE24280>
- Riechmann, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry*, 379(6), 633–646. <https://doi.org/10.1515/BCHM.1998.379.6.633/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Santos, J. M., Josling, G., Ross, P., Joshi, P., Orchard, L., Campbell, T., Schieler, A., Cristea, I. M., & Llinás, M. (2017). Red blood cell invasion by the malaria parasite is coordinated by the PfAP2-I transcription factor. *Cell Host & Microbe*, 21(6), 731. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2017.05.006>
- Shang, X., Shen, S., Tang, J., He, X., Zhao, Y., Wang, C., He, X., Guo, G., Liu, M., Wang, L., Zhu, Q., Yang, G., Jiang, C., Zhang, M., Yu, X., Han, J., Culleton, R., Jiang, L., Cao, J., ... Zhang, Q. (2021). A cascade of transcriptional repression determines sexual commitment and development in Plasmodium falciparum. *Nucleic Acids Research*, 49(16), 9264. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB683>
- Sierra-Miranda, M., Vembar, S. S., Delgadillo, D. M., Ávila-López, P. A., Herrera-Solorio, A. M., Lozano Amado, D., Vargas, M., & Hernandez-Rivas, R. (2017).

- PfAP2Tel, harbouring a non-canonical DNA-binding AP2 domain, binds to *Plasmodium falciparum* telomeres. *Cellular Microbiology*, 19(9). <https://doi.org/10.1111/CMI.12742>
- Silva, E. K. de, Gehrke, A. R., Olszewski, K., León, I., Chahal, J. S., Bulyk, M. L., & Llinás, M. (2008). Specific DNA-binding by Apicomplexan AP2 transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(24), 8393. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0801993105>
- Singh, S., Santos, J. M., Orchard, L. M., Yamada, N., van Biljon, R., Painter, H. J., Mahony, S., & Llinás, M. (2021). The PfAP2-G2 transcription factor is a critical regulator of gametocyte maturation. *Molecular Microbiology*, 115(5), 1005. <https://doi.org/10.1111/MMI.14676>
- Sinha, A., Hughes, K. R., Modrzynska, K. K., Otto, T. D., Pfander, C., Dickens, N. J., Religa, A. A., Bushell, E., Graham, A. L., Cameron, R., Kafsack, B. F. C., Williams, A. E., Llinás, M., Berriman, M., Billker, O., & Waters, A. P. (2014). A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature*, 507(7491), 253–257. <https://doi.org/10.1038/NATURE12970>
- van Biljon, R., van Wyk, R., Painter, H. J., Orchard, L., Reader, J., Niemand, J., Llinás, M., & Birkholtz, L. M. (2019). Hierarchical transcriptional control regulates *Plasmodium falciparum* sexual differentiation. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-019-6322-9>
- Voorberg-van der Wel, A., Roma, G., Gupta, D. K., Schuierer, S., Nigsch, F., Carbone, W., Zeeman, A.-M., Lee, B. H., Hofman, S. O., Faber, B. W., Knehr, J., Pasini, E., Kinzel, B., Bifani, P., Bonamy, G. M. C., Bouwmeester, T., Kocken, C. H. M., & Diagana, T. T. (2017). A comparative transcriptomic analysis of replicating and dormant liver stages of the relapsing malaria parasite *Plasmodium cynomolgi*. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.29605>
- World Health Organization. World Malaria Report 2021 (Internet). Disponible em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>
- Wright GJ, Rayner JC. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion: combining function with immune evasion. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1003943. Published 2014 Mar 20. doi:10.1371/journal.ppat.1003943
- Yuda, M., Iwanaga, S., Kaneko, I., & Kato, T. (2015). Global transcriptional repression: An initial and essential step for *Plasmodium* sexual development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), 12824–12829. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1504389112/-/DCSUPPLEMENTAL>

- Yuda, M., Iwanaga, S., Shigenobu, S., Kato, T., & Kaneko, I. (2010). Transcription factor AP2-Sp and its target genes in malarial sporozoites. *Molecular Microbiology*, *75*(4), 854–863. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2009.07005.X>
- Yuda, M., Iwanaga, S., Shigenobu, S., Mair, G. R., Janse, C. J., Waters, A. P., Kato, T., & Kaneko, I. (2009). Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. *Molecular Microbiology*, *71*(6), 1402–1414. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2009.06609.X>
- Zhang, C., Li, Z., Cui, H., Jiang, Y., Yang, Z., Wang, X., Gao, H., Liu, C., Zhang, S., Su, X. Z., & Yuana, J. (2017). Systematic CRISPR-Cas9-mediated modifications of plasmodium yoelii ApiAP2 genes reveal functional insights into parasite development. *MBio*, *8*(6). https://doi.org/10.1128/MBIO.01986-17/SUPPL_FILE/MBO006173628S1.DOCX
- Zhang, M., Wang, C., Otto, T. D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S. R., Udenze, K., Bronner, I. F., Casandra, D., Mayho, M., Brown, J., Li, S., Swanson, J., Rayner, J. C., Jiang, R. H. Y., & Adams, J. H. (2018). Uncovering the essential genome of the human malaria parasite Plasmodium falciparum by saturation mutagenesis. *Science (New York, N.Y.)*, *360*(6388). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAP7847>