



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

Módulo: 03	Aula: Aula 07	Data do Webinar: 20/08
Título: Genoma de Apicomplexa		
Ministrante: Gerhard Wunderlich		

Qualquer informação adicional, podem me contactar sob gwunder@usp.br.

1 - Dr. Wunderlich, obrigada pela excelente aula. No processo mitótico você comentou que o apicomplexa não apresenta condensação de cromatina e segregação de cromossomos, você sabe dizer se existe outros mecanismos que garantam que esses organismos tenham uma divisão cromossomal uniforme? Em outro organismos, como trypanosomatídeos, também ocorre isso?

Nome do Aluno: Marina Batista

A não-condensação ocorre em vários organismos. Em *Trypanosoma cruzi* também não há condensação de cromossomos, mas este tem outro modo de mitose (fissão binária) enquanto Plasmodium e também Toxoplasma possuem o modo de schizogonia, onde primeiramente o DNA é replicado e depois são formados os novos núcleos e ocorre a distribuição. Como isso funciona em detalhe em nível molecular, ainda é desconhecido. Há um paper que descreve a descoberta de origins of replication (FEBS J. 2017 Aug;284(16):2674-2695. doi: 10.1111/febs.14150. Epub 2017 Jul 27.) e tem muitos estudos que abordam a replicação rápida em gametócitos macho evoluindo para gametas flagelados.

2 - Dr. Wunderlich, devido ao uso demasiado de cloroquina você acha que isso terá alguma implicação futura no tratamento de malária?

Nome do Aluno: Marina Batista

De fato já teve. Não temos mais cepas de *P. falciparum* na Amazônia suscetíveis a Clq pelo extenso uso nos anos 70 (mistura até na água potável) e pelo ainda uso contra *P. vivax* onde ainda está funcionando suficientemente.

3 - Em Apicomplexa muitas espécies exibem um padrão no qual genes específicos existem como famílias multigênicas e esses genes são aprimorados em regiões sub teloméricas. O que há de tão especial na biologia dessas regiões cromossômicas que as torna suscetíveis a duplicações de genes?

Nome do Aluno: Romário Lopes Boy



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

No caso de *Plasmodium falciparum* e *vivax* temos um acúmulo de genes variantes e famílias delas nas regiões teloméricas o que pelo modo de agrupamento de fins teloméricas próximo a membrana nuclear em bouquets facilita a recombinação/troca ectópica de telômeros. O complexo e as enzimas que promovem esta troca do meu conhecimento são ainda desconhecidos, mas Helicases e e outras enzimas de conserto de DNA (RAD51) devem ter um papel.

4 - Sucessivas reinfecções de eritrócitos contribuem para maior variação antigênica em *Plasmodium falciparum*. Como e quais moléculas presentes na superfície dos eritrócitos contribuem para esse fato?

Nome do Aluno: Luciana Ângelo de Souza

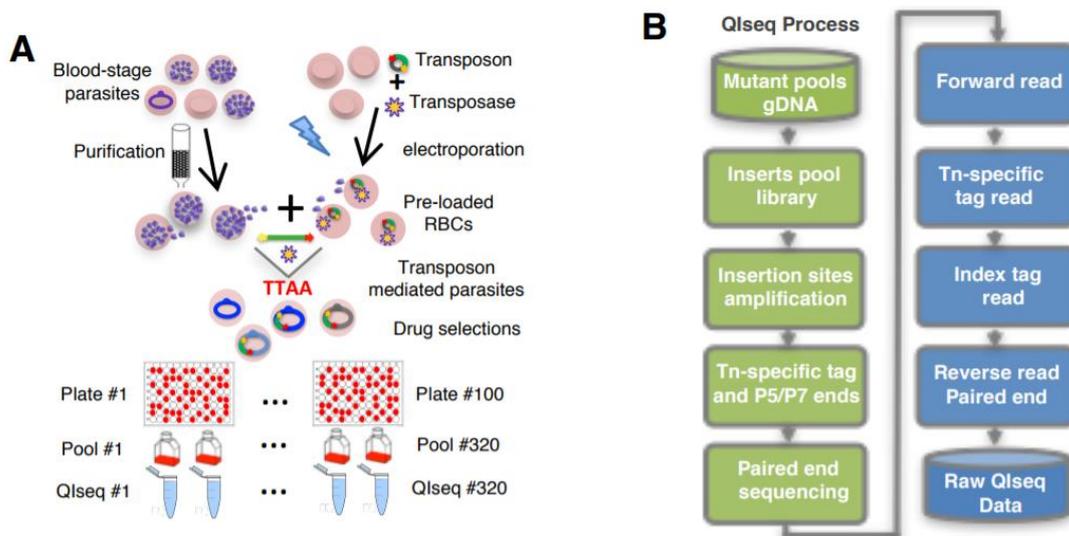
Acredito que a pergunta deve ser reformulada em: Sucessivas reinfecções de eritrócitos leva a uma expressão diversificada de antígenos da superfície da hemácia. As mais importantes moléculas claramente são as PfEMP1s que são adesinas e as RIFINs que interagem com receptores de linfócitos, manipulando a resposta imunológica.

5 - Boa tarde, gostaria de saber mais sobre o método piggyback mencionado pelo professor Gerhard Wunderlich. Muito obrigada!

Nome do Aluno: Hanna Victoria Queiroz da Matta

Por favor acesse em plataformas de procura o método piggyback. Coloque aqui a imagem do paper de Zhang et al. da Science/Supplementary Figure S1.

PERGUNTAS e RESPOSTAS



6 - Muito obrigado por sua aula prof. Gerhard. Tenho algumas curiosidades sobre o que foi explanado. 1- *T.gondii* apresenta um grande número de cepas no Brasil. Há algum indício que aponte a causa dessa variabilidade ou como pode ter começado? 2- Em relação à *P. falciparum*, a presença dos LCR no genes teria alguma função adaptativa ou seria resquício evolutivo? 3- Ainda so *P. falciparum*, o ativa a maquinaria responsável pela variabilidade dos PIR genes?

Nome do Aluno: Thiago Souza Onofre

1. Por favor consulte nas resposta da Andrea Avial sobre o polimorfismo de genomas de *Toxoplasma* aqui na America do Sul 2. Sobre o por que dos LCRs existem diversas teorias por que o parasita os possui, mas obviamente é difícil comprovar origem. Devido ao alto teor de AT do genoma e o fato de LCRs também muitas vezes serem AT ricos, resulta uma bias de determinados aminoacidos nestes LCRs, e o tamanho de LCRs pode facilmente mudar quando ocorre "strand slippage" durante a replicação e cutros fragmentos de DNA são deletados ou inseridos. 3. O que ativa a maquinaria que cria a grande variação de PIR genes está desconhecido, talvez tenha a ver com o que falei acima dos bouquets de telomeros que se formam em trofozoitas e gametócitos, já que PIR genes são muitas vezes subtelomericos.



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

7 - Na América do Sul, não há dominância clara de nenhum genótipo do *Toxoplasma gondii*, embora alguns tenham frequências relativamente mais altas. Quais genótipos do *T. gondii* são mais prevalentes no Brasil?

Nome do Aluno: Priscilla Vilela dos Santos

Vide resposta da Andrea Avila.

8 - Você disse em aula que na mitose de *T. gondii*, não há condensação aparente da cromatina. Haveria mais quebra no DNA em resposta a isso, ou haveria alguma maquinaria de reparo ou de regulação para manter de certa forma a integridade desse material genético? A mitose destes parasitos retém o núcleo como uma forma de minimizar os possíveis danos no DNA?

Nome do Aluno: Cristiele Saborito da Silva

Respondi algo parecido acima. O que mantém a estabilidade genômica tem a ver com as enzimas comuns de conserto de DNA com RAD51.

9 - O número de cepas de toxoplasma é um estudo abrangente feito no mundo todo ou esse dado de ter maior variedade no Brasil pode ser um viés de maior caracterização no Brasil? Essas cepas são detectadas apenas em indivíduos com a doença - toxoplasmose - ativa ou também na alta porcentagem de indivíduos portadores assintomáticos?

- Se tiver como compartilhar novamente o estudo genômico com gráfico violino poderia explicar a leitura desse gráfico? não entendi muito bem

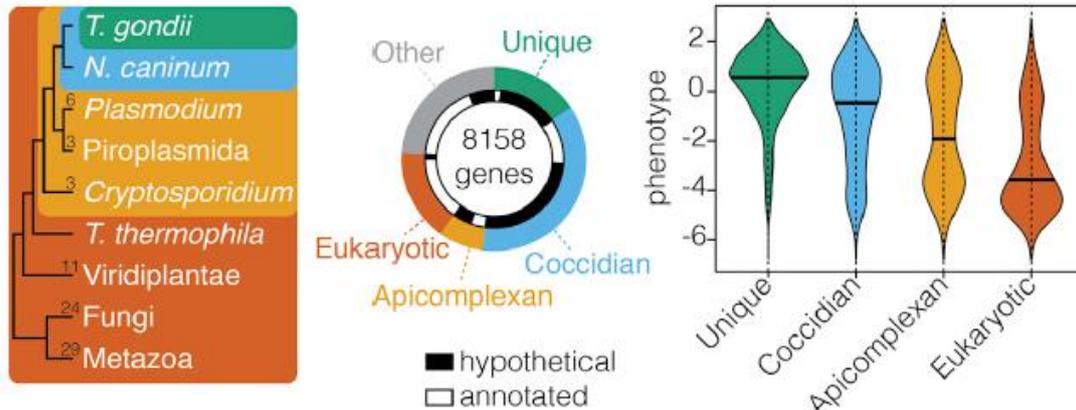
- Os 14 cromossomos de *Plasmodium* não são condensados e nem segregados durante a mitose? Como é então o mecanismo de divisão celular e como é mantida a ploidia desses organismos?

- Quais as implicações da composição 60-80% AT do genoma de *Plasmodium*?

Nome do Aluno: Juliane Cristina Ribeiro Fernandes

Primeira pergunta vide a resposta da Andrea Avila. O gráfico violino do paper de Sidik mostra a distribuição de genes específicos em diversas categorias de conservação entre espécies e sua importância para sobrevivência. O menor o número do índice de interferir no crescimento do parasita com gene mutado, maior importância de tal gene para sobrevivência.

PERGUNTAS e RESPOSTAS



A partir do gráfico fica claro que os genes essenciais são na maioria conservados em todos os eucariotas enquanto muito poucos genes específicos de *Toxoplasma* (em verde) são essenciais (na escala de -4 para -6 do gráfico fenótipo).

A respeito de como o parasita mantém a ploidia, é um desconhecido. Minha hipótese é que cada cromossomo deve ter um marcador/sítio único que o define e assim permite ser devidamente replicado e distribuído. Não está excluído que ocorrem muitos acidentes onde na separação dos cromossomos parasitas sem todos os cromossomos ocorrem que depois não vão para frente. Talvez este ponto seja um aspecto interessante em desenvolver medidas contra o parasita, perturbando este processo bem diferente da mitose “normal”.

Os 60-80% AT claramente colocam um bias na composição de proteomas. Deve ter menos presença de prolina e outros aminoácidos preferencialmente codificados por ao menos 2 GCs no codon. Além disso, isso deve ter uma influência na estabilidade do genoma.

10 - Prof. Gerhard, como se dá o controle do switch que ocorre durante os níveis de transcrição no processo de reinfeção de novas células sanguíneas por *Plasmodium*?

Nome do Aluno: Saulo Almeida de Menezes

Este processo é muito complexo. Tem a ver com modificadores de cromatina, pequenos ncRNA e outras enzimas. O que controla a velocidade de switching (importante para sempre estar a frente da reação do sistema imunológico) ainda é desconhecido. Tem vários reviews muito bons que abordam o tema.



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

11 - Porque somente no felino ocorre a reprodução sexuada em *T. gondii*? Existe algo específico nesses vertebrados que permite o parasito diferenciar entre outros vertebrados?

Existe em felinos uma falta da enzima delta 6-desaturase o que causa um excesso de ácido linoleico. Em camundongos, a supressão desta enzima plus alimentação com muito ácido linoleico permitiu o desenvolvimento de formas sexuadas tb em camundongos! O interessante é que no *Plasmodium falciparum*, a ativação do desenvolvimento para gametócito também é regulado por ácidos graxos, de fato por lyso-fosfatidilcolina.

DOI: [10.1371/journal.pbio.3000364](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000364)

Nome do Aluno: André Luiz Zaidan Martins

12 - Dr. Gerhard, você disse que o *T. gondii* não possui grande plasticidade genética, mas mesmo assim apresentam grande variedade de cepas. Essa variedade de cepas poderia ser explicada pela epigenética devido ao fato das variações no organismo do hospedeiro durante o período de latência do parasito?

Nome do Aluno: Tatiana Prata Menezes

Não tenho uma resposta para esta pergunta, talvez a Andrea Avila tenha! Só hipótese, acredito que a variedade de cepas não se origina em processos epigenéticos em bradicistos, mas na hora da recombinação genética nos gatos/felinos.

13 - Professor, há algum estudo que demonstra a diferença genômica e transcriptômica entre as diferentes cepas de *T.gondii*? Além disso, quais os fatores de transcrição que estão relacionados com a virulência da cepa?

Nome do Aluno: Marcos Roberto Dias Campos

Não tenho certeza. Claramente tem diferenças na expressão de genes em cepas virulentas versus non-virulentas. Um foco é claramente a expressão de proteínas ROP16 e 18 porque modulam a capacidade da célula de desencadear uma resposta adequada (*Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Dec 4;9:413.).

14 - Professor, parabéns pela aula. Foi excelente!

1-Gostaria de entender melhor o que significa a regulação gênica Hardwired em *Toxoplasma* e *Plasmodium*



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

2-Por que não há segregação dos cromossomos durante a mitose em Plasmodium?

3-Existe relação da % de A-T no genoma de Plasmodium com a quantidade de genes codificados e com a estabilidade do DNA? Qual seria a implicação fisiológica para o parasita?

4-Genes de virulência são encontrados em regiões sub teloméricas. Seria viável usar inibidores de telomerase específicos para Plasmodium que ao encurtar as extremidades evitariam a resistência aos fármacos ou inibiriam o parasita?

Nome do Aluno: Jade Cabestre Venancio Brochi

Hardwired significa que a transcrição segue uma cadência definida de quando no ciclo sanguíneo por exemplo os genes são ativados e transcritos e depois silenciados novamente. Isso é regulado por modificação de cromatina e fatores associados.

Há segregação de cromossomos, mas não há condensação. O parasita está transcrevendo ativamente genes o tempo todo durante as fases proliferativas, talvez isso evolutivamente torna condensação de cromossomos desvantajoso (ocorre em muitos outros protozoários também).

A respeito da %AT, vide acima.

A respeito de inibir a telomerase, sem duvida poderia influenciar a quantidade e viabilidade de genes de virulência contidos lá e com isso decrescer a virulência. Meu medo é que o processo do encurtamento dos telômeros é demorado demais para ser contemplado um alvo interessante contra plasmódios.

15 - Ótima aula professor! Gostaria de saber mais sobre o uso de genes essenciais do Toxoplasma gondii como alvo de terapias farmacológicas. Há algum estudo específico, além do trabalho de Sidik já citado, que o senhor recomendaria sobre o assunto?

Nome do Aluno: Paloma de Carvalho Vieira Siqueira

Não sei dizer quais alvos de fato estão sendo aproveitados do estudo de Sidik. Sei que no caso do antígeno conservado também em Plasmodium que participa na invasão tanto de merozoítas de Plasmodium quanto de tachizoítas "CLAMP" não teve nenhum estudo publicado que visa este antígeno como drug target ou mesmo alvo de vacinas.

16 - Prezado professor Gerhard. Acho muito intrigante a porcentagem extremamente baixa de GC encontrada em P. falciparum. Com relação a isso tenho duas perguntas: (i) Existem hipóteses ou teorias sobre quais forças evolutivas atuaram(e atuam) ao longo da evolução



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

dessa espécie para que houvesse uma redução tão drástica do conteúdo de GC no genoma?
(ii) Essa tendência se repete também nos genomas do apicoplasto e da mitocôndria de *P. falciparum*?

A porcentagem de GC de genomas de apicoplasto e de mitocôndria de *P. falciparum* é diferente, enquanto o genoma do apicoplasto é mais AT rico ainda (14.2% GC) o da mitocôndria é mais rico em GC (31%). Tem algumas teorias sobre o porquê do baixa teor de GC.

Além disso, gostaria que, se possível, comentasse um pouco sobre os genomas de mitocôndrias e apicoplastos. Em especial, é sabido que os genomas mitocondriais de muitos dos apicomplexa (não sei se todos são) são lineares. Quais as implicações dessa estrutura linear sobre a replicação do genoma dessas organelas? Ocorre um mecanismo replicativo totalmente diferente do que é conhecido em outros eucariotos?

Tanto o genoma do apicoplasto quanto da mitocôndria são genomas circulares! Tem artigos interessantes da Jessica Kissinger que abordam o codon usage/tRNAs do apicoplasto que é diferente do genoma do Plasmodium.

Agradeço pela atenção,

Nome do Aluno: José Luciano Nepomuceno da Silva

17 - Como se dá o processo de transcrição de genes do Plasmodium (como o gene da telomerase), que possuem seus domínios tão espaçados pelas LCRs?

Nome do Aluno: Thales Corrêa de Lima

Não há nada diferente do meu conhecimento que difere na transcrição de genes “espaçados por LCRs comparados com genes “normais”.

18 - Prezado Professor, qual a função das LCRs para a expressão gênica do Plasmodium falciparum? Obrigada!

Nome do Aluno: Héllida Marina Costa Silva

Não acredito que os LCRs tem uma influência na expressão gênica (transcrição/tradução diferente).

19 - Agradeço pela excelente aula. Foi comentado que é difícil conter os fenótipos resistentes de *P. falciparum*, isso se dá pela recombinação do genoma desses organismos?



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

Nome do Aluno: Aline Marzano Miranda

O culpado é a rápida proliferação e frequente recombinação/disseminação por mosquitos e o mal uso de antimaláricos (mal-dosados, remédios fake). No início do surgimento de falhas no tratamento com Artemisinina no sudeste asiático houve um programa da Bill&Melinda Gates Foundation para só conter a expansão daqueles parasitas, e mesmo assim não deu muito certo.

20 - Ainda não se sabe muito sobre a regulação gênica em Plasmodium, a técnica de CRISPR/CAS9 poderia ajudar a solucionar esse problema?

Nome do Aluno: Marina Flóro e Silva

Como falei na sessão Q&A, muitos grupos usam CRISPR/Cas9 para introduzir mutações/deleções/inserções no genoma de Plasmodium e o uso de deadCas9 acoplado a modificadores de cromatina (deacetilases/metiltransferases) pode revelar mecanismos de ativação/inativação. A mesma deadCas9 pode bloquear transcrição de genes por associar firmemente em exatos trechos de DNA, permitindo mapping de sequencia cruciais por exemplo. As opções são muitas!

21 - Boa tarde! Obrigada pela a aula. Minha pergunta é: o que já se sabe sobre a evolução do mecanismo de invasão alternativo que Plasmodium vivax desenvolveu para que possa invadir eritrócitos humanos Duffy negativo?

Nome do Aluno: Aline Maria Vasconcelos Queiroz

Boa pergunta! Não tenho certeza quando de fato ocorreu a também invasão de hemácias/reticulócitos Duffy(-). Que ela existe é fato. Não sei se o parasita invade tão bem pela outra via quanto via o ftor Duffy, vale a pena consultar a literatura recente. Em termos experimentais, isso é difícil de elucidar pela falta de cultivo in vitro de *P. vivax*!

22 - Que tipo de esforços tem sido ou podem ser feitos, para superar a dificuldade de estudar geneticamente a transição para a forma assexuada de T. gondii nos felinos?

Nome do Aluno: PAULINE MARTINS DA CUNHA

Com a descoberta da enzima que falta no intestino de felinos que leva a um acumulo de ácido linoleico (que leva a formação de gametócitos) a inversa transição de formas assexuadas para sexuadas pode ser estudado em camundongo. A transição para forma assexuada em felinos



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

obviamente poderia ser estudado também nos camundongos parando a superdosagem de ácido linoléico.

23 - Há alguns trabalhos que mostram que *T. gondii* manipula alguns comportamentos de rato infectados, fazendo com que estes sejam mais suscetível a predação por gatos. Há conhecimento sobre possíveis genes deste parasito que estejam envolvidos nesse fenômeno de manipulação? Obrigada!

Nome do Aluno: Tábata Rodrigues Costa

Interpreto que isso é do campo da neurociência. Não sei se já existem dados, achei este paper que talvez tenha mais infos: Brain Behav Immun. 2019 Aug;80:88-108.

24 - A SaCas9 recombinante é usada para CRISPR em apicomplexas?

Nome do Aluno: Ana Maria Murta Santi

Que eu saiba em *Plasmodium* apenas plasmídeos codificando a Cas9 são usados, mas não a enzima recombinante. Em *Toxoplasma* deve ter esforços para usar, já que o processo de transfecção é mais eficiente (por outro lado já tem linhagem que expressa Cas9).

25 - Boa tarde. Existe algum gene conservado em Apicomplexa que poderia ser considerado de alto sucesso evolutivo por auxiliar na prevalência dos parasitos no decorrer dos séculos?

Nome do Aluno: Tâmara Carolina Gomes Ribeiro

Deve ter muitos! Naquele estudo do genoma de *Toxoplasma* (paper Sidik, aqueles gráficos violino) eles estão presentes/identificados.

26 - Seria possível que cada isolado de *T. gondii* tenha diferenças na virulência baseado na importância de seus genes? Se sim, poderiam se tornar um alvo terapêutico?

Nome do Aluno: Micheli Ferla

Esta pergunta é difícil de responder. Um alvo terapêutico idealmente é algo que todas as cepas virulentas tem.

27 - Os protozoários do filo apicomplexa apresentam transcrição gênica em grandes unidades policistronicas e variação no número de cópias de genes de maneira similar aos tripanossomatídeos?

Nome do Aluno: Luana Aparecida Rogerio



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

Não. A transcrição é estritamente monocistrônica. Vide BMC Genomics. 2020 Jun 8;21(1):395.

28 - Sobre o Plasmodium falciparum possuir um dos mais ricos genomas com AT, cerca de 80% , gostaria de saber se há relação com a sua patogenicidade. Se sim, no que isso implicaria para o hospedeiro humano?

Nome do Aluno: Iasmin Ferraz Silva

Vide acima. Não vejo um direto nexos com virulência e %AT.

29 - Parabéns professor pela palestra. Minha pergunta é orientada para quais genes você pensa que poderiam ser mais interessantes para estudar se o objetivo é avaliar a diversidade genética do Plasmodium em uma determinada região geográfica.

Nome do Aluno: Wilfredo Humberto Sosa Ochoa

Tem que considerar de qual resolução você precisa. Obviamente num universo ideal, você usaria o genoma inteiro. Se você usa um número de diferentes loci sob pressão imunológica pode introduzir um bias. O jeito é mapear um número suficiente de marcadores neutros com determinada taxa de polimorfismo. Antigamente a gente usava um set de 12 microsatelites para *P. falciparum*. Para *P. vivax* que é mais polimórfico neste quesito, menos marcadores podem resolver.

30 - A transcrição em Apicomplexa apresenta alguma peculiaridade, como nos tripanossomatídeos?

Nome do Aluno: Elizabeth Magiolo Coser

Esta pergunta é muito abrangente!. Vide acima transcrição “hardwired” versus “transcrição de genes variantes”. No Plasmodium existe em menos grau também o controle pós-transcricional da expressão. Não há trans-splicing.

31 - Embora ainda haja muitas dúvidas sobre as razões para tamanha variação polimórfica dos genes de T.gondii na América do Sul, já existem estudos acerca? Quais são as evidências mais prováveis discutidas até o momento?

Nome do Aluno: Priscilla da Costa Martins

Vide resposta da Andrea Avila.

32 - Com relação a distribuição geográfica, os genótipos mais virulentos de T.gondii são encontrados na América do Sul visto o grande polimorfismo?

Nome do Aluno: Priscilla da Costa Martins



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

Vide resposta da Andrea Avila.

33 - Gostaria de saber se o Dr. Gerhard poderia falar um pouco sobre os fatores que levam a variação antigênica no Plasmodium. Obrigada

Nome do Aluno: Erika Moutinho Costa

São estes modificadores de cromatina, ncRNAs, provavelmente fatores de transcrição do tipo AP2 e outros fatores ainda desconhecidos. Recomendo este review: Annu Rev Microbiol. 2017 Sep 8;71:625-641.

34 - 1) Professor, você em sua apresentação comentou que a manipulação com Toxoplasma é relativamente simples. Por quê a grande parte dos genes exclusivos para a espécie ainda apresenta função desconhecida?

2) Geneticamente, o que torna a espécie de P. falciparum como a mais letal? Os genes estão encontrados na maior parte nas regiões teloméricas?

3) Após varias passagens "repiques" de cultivo in vitro, o Plasmodium pode perder a capacidade de virulência? Ou inativar o gene de forma que não é mais expresso?

Nome do Aluno: Paulo Otávio Lourenço Moreira

1. Se um gene é essencial, o knockout dele não leva a um fenótipo viável. Para cada gene deste tipo seria ótimo fazer um genótipo onde i) o gene fica controlável na sua expressão, ii) com uma etiqueta para biotinar que está por perto ou permitir imunoprecipitação de fatores complexados à proteína em questão seguido de mass spec. Isso é um trabalhão.
2. Os genes de virulência como PfEMP1 claramente são os maiores fatores, porque eles levam ao sequestro de hemácias infectadas em vasos profundos onde depois ocorre ativação vascular, recrutamento de linfócitos e inflamação que no final leva a um dano no tecido onde ocorre. Todos os telomeros possuem genes *var* que codificam PfEMP1, mas tem *var* em clusters internos também.
3. O parasita pode deixar de expressar genes *var* mas uma vez de volta no hospedeiro linhagens com expressao deste genes são rapidamente selecionadas.

35 - Prezado Professor Gerhard, obrigado pela excelente aula. Duas questões pra discutir na live:

1- Quais os mecanismos que previnem a inserção das sequencias gênicas em K13, sendo que possui o sitio de reconhecimento TTAT ?



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

Ou a sequência gênica é de fato efetivamente inserida e posteriormente o parasita consegue reparar o dano eliminando-a?

Com 62% de genes que não foram mutáveis, dito mecanismo de “prevenção da inserção de sequências” parecesse muito eficiente.

2- Em relação à relevante diversidade genética de *Toxoplasma gondii* na América do Sul, existem estudos sugerindo dito continente como a origem ancestral (filogenética) desse parasita? Existem estudos de co-evolução de *T. gondii* e felinos?

Muito obrigado

Nome do Aluno: Herakles García

De fato, é impossível mutar o K13, ele é um fator essencial. Desta maneira não é possível criar linhagens com K13 deletados/mutados. Quando uma inserção ocorre, o parasita morre em seguida.

Não sei dizer se alguém já estudou a co-evolução de *Toxoplasma* e felinos, seria interessante! Entretanto penso que o “relógio de evolução” corre muito mais rápido para *Toxoplasma* que para felinos, podendo inviabilizar rastrear uma possível coevolução. Provavelmente é muito importante selecionar com cuidado o locus a ser utilizado do *Toxoplasma* para avaliar coevolução.

36 - Gostaria primeiramente de agradecer pela aula do Prof. Gerhard. Para o *Plasmodium falciparum*, seria possível induzir SNPs no loci do fator de transcrição AP2-G? Para que possivelmente, a variação da família multigênica dos genes VAR sejam interrompidas? Desta forma, provavelmente a transição entre as formas dos trofozoítos para os gametócitos não replicativos seriam interrompidas.

Nome do Aluno: Pedro Henrique Gallo Francisco

Então, se deleta o AP2-G o parasita não forma mais gametócitos. Este tipo de parasita não pode ser transmitido para mosquitos. Já a respeito da variação antigênica, talvez consigamos modificar fatores responsáveis para transcrição de genes var levando a um switching mais lento ou rápido.

37 - O quê significa e quais as consequências da repercussão da genética em um microorganismo considerado clonal?

Nome do Aluno: Débora Faria Silva



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

Um MO clonal evoluiu de um único antecessor, portanto –salvo mutações – sucessores em principio são idênticos em termos genéticos, mas talvez não em termos epigenéticos.

38 - Existe algum tipo de função/vantagem descrita ou suposta para a presença das LCRs (low complexity regions) nas proteínas de Plasmodium?

Nome do Aluno: Leonardo Cortazzo da Silva

Que eu saiba há teorias. Vide acima.

39 - Durante a live, o Prof. Gerhard afirma que o Toxoplasma é provavelmente o parasita de maior sucesso no mundo animal. Por quê? Existe alguma razão principal que faz o Toxoplasma ser tão bem sucedido?

Nome do Aluno: Leonardo Cortazzo da Silva

Considero ele o parasita com mais sucesso porque invade tantos hospedeiros/células diferentes e é tão facilmente transmitido mas muito difícil para ser tratado/eliminado pelo menos do hospedeiro humano.

40 - Prof. Gerhard, quantos genótipos de Plasmodium falciparum foram descobertos, até hoje?

Assim como ocorre em outros protozoários, estes genótipos estão associados a populações de parasitos mais ou menos patogênicas e virulentas?

Nome do Aluno: THIAGO KURY MORENO DE SOUZA

O número de genótipos verdadeiramente diferentes deve ser quase ilimitado dado a rápida recombinação de seus genes variantes. Tem milhares de genomas sequenciados já (mas não anotados). Ainda está em aberto se há mesmo cepas menos virulentas porque sempre temos que olhar para a população/as pessoas infectadas também e sua imunidade pré-existente ou não. Há uma percepção que na Amazônia *P. falciparum* mata menos que na África. Isso pode ser pelo fato de termos menos polimorfismo mesmo no genes variantes e resultante disso uma imunidade mais rapidamente adquirida que na África.

41 - Qual seria um possível benefício para o parasita em relação a expressão de genes distintos de acordo com a forma evolutiva durante o ciclo celular?

Nome do Aluno: Deyzi Caroline da Silva Barbosa

Acredito que a adaptação a expressão “on time” de genes como ocorre em *Plasmodium* é a maneira mais econômica de expressão de genes. O ambiente no ser humano ou no mosquito é



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

relativamente constante e não requer (fora dos genes variantes e da indução de gametócitos, claro) mudanças súbitas ou disposição à mudanças subitas.

42 - O toxoplasma possui capacidade de invadir e infectar todos os tipos celulares?

Nome do Aluno: Deyzi Caroline da Silva Barbosa

Todos os tipos não, mas muitos!

43 - O apicoplasto nos parasitos teria apenas a função de sintetizar isoprenoides? Durante a evolução de alguns parasitos eles foram perdendo essa organela porque funcionaria apenas como maquinaria para síntese de isoprenoides?

Nome do Aluno: Arielly Rodrigues Ribeiro Barreto

As vias bioquímicas do apicoplasto foram transferidas para o genoma (ou não perdidas do genoma se já estavam presentes), assim a perda do apicoplasto em *Cryptosporidium* poderia ocorrer. Agora, se você cura o plasmodio do seu apicoplasto por tratamento com tetraciclina e suplementação de isoprenoides (isopentenil/dimetilalil pirofosfato), ele ainda é vivo, indicando que a única função essencial seria essa. Entretanto, o parasita deste tipo não está "bem" e provavelmente pelo homeostase do parasita o apicoplasto e seu interplay com o parasita é mais que apenas fornecer IPP/DMAPP.

44 - Apesar dos alvos ("targets") dos medicamentos serem os genes comuns aos apicomplexos e/ou os genes únicos de Toxoplasma, há algum gene que pode ser utilizado como alvo ("target") dos medicamentos dentro dos genes comuns ao coccideos, que afete diretamente o fenótipo do protozoário?

Nome do Aluno: Marcus Sávio Araujo Garcia

Os remedios que vão contra o metabolismo de dihidrofolato já funcionam em teoria contra os dois (pirimetamina). Deve ter mais alvos para qual deve ser possível desenvolver inibidores específicos, mas isso é um longo processo!

45 - Primeiramente gostaria de agradecer ao professor Gerhard pela excelente aula! Gostaria de saber se a transcrição de apicomplexa segue a mesma linha da transcrição em tripanossomatídeos (maioria policistrônica), ou se tem sua maioria monocistrônica... Desde já, agradeço.

Nome do Aluno: Adriana Neuman Albuquerque Lins Moura de Brito

Monocistrônico, vide acima tb.



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

46 - Existe alguma explicação do porque o Toxoplasma é mais suscetível a transfecções (por eletroporação, por exemplo) enquanto que o Plasmodium é mais resistente a essas técnicas de produção de geneticamente modificados?

Nome do Aluno: Rodolfo Bento Balbinot

Se eu soubesse, eu ia aplicar no Plasmodium. O processo de transfecção dos dois parasitas é diferente, em Plasmodium a gente tem que passar a membrana da hemácia, do vacuolo parasitóforo, membrana plasmática do parasita. Já no Toxoplasma, é possível transfectar formas extracelulares, o que é mais eficiente.

47 - Sabendo que o Toxoplasma possui uma abundância de genótipos diferentes que se caracteriza pela presença de várias cepas na América do Sul, esse polimorfismo genético seria um fator que dificulta os estudos genômicos para determinação de possíveis targets? Uma target identificado em determinada cepa de T.gondii pode não ser um target para outra cepa?

Nome do Aluno: Beatriz Cabral Abreu Grijó

Seria importante estudar possíveis alvos a respeito dos seus polimorfismos em cepas do mundo. Vislumbro um alvo que é específico para apicomplexa/Toxoplasma e que nem existe em humanos. Um suposto inibidor teria que ser suficiente abrangente para ser eficaz contra as variantes existentes no mundo.

48 - De que forma os estudos envolvendo transcriptômica poderiam cercar a diferença clonal em Plasmodium?

Nome do Aluno: Júlio César Santana de Andrade

Se entendo correto, teríamos que analisar transcriptomas de cepas de Plasmodium no mesmo horário do ciclo sanguíneo (ou de formas evolutivas no mosquito) em comparação com seu genoma, para depois deduzir se diferenças genômicas provocam diferenças no transcriptoma.

49 - Professor, mesmo com a grande diversidade genética do toxoplasma encontrada na América do Sul, elas ainda se enquadram na divisão de cepas I, II e III? Qual ocorre mais no Brasil?

Nome do Aluno: Arieli Bernardo Portugal

Transfiro a pergunta para Andrea Avila!

50 - Prezado Prof. Wunderlich,



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

Gostaria de saber se o maior número de cepas/grupos de *T. gondii* na América do Sul poderia estar relacionado com uma maior biodiversidade de hospedeiros na região se comparada com a de outros locais?

Nome do Aluno: Anna Carolina Paganini Guañabens

Isso é perfeitamente possível, embora tenho certeza que na África temos muitos felinos diferentes também dos quais os *Toxoplasma* talvez não tenham sido recuperados/caracterizados.

51 - Primeiro, eu parabeno pela ótima aula. No início da aula foi falado sobre 3 grandes genótipos de *Toxoplasma* e que o tipo I tem maior virulência. Gostaria de saber se tem genes que estão associados com essa virulência e se está ausente nos outros dois tipos. E poderia considerá-lo essencial?

Nome do Aluno: Maria Paula Gonçalves Borsodi

Não tenho certeza qual fator torna cepas 2 e 3 menos virulentos que a 1. Talvez sejam as proteínas ROP16 e ROP18 que modulam a resposta da célula infectada. Confira também respostas da Andrea Avila.

52 - Gostaria que fosse falado mais sobre a família multigênica.

Nome do Aluno: Maria Paula Gonçalves Borsodi

Famílias multigenicas e sua regulação é uma tema muito interessante e seriam paginas para escrever! Por favor confira estes artigos: Annu Rev Microbiol. 2017 Sep 8;71:625-641., PLoS Comput Biol. 2010 Sep 16;6(9):e1000933.

53 - Sabemos que é possível utilizar o approach de análise comparativa de sequência de bases, para estudar a ancestralidade dos Apicomplexa. Desta forma, seria possível descobrir um pouco mais a fundo, qual o possível ancestral em comum dos apicomplexos? Sabe-se hoje que possivelmente, foi um organismo fotossintético, por conta da presença do apicoplasto que sintetiza alguns isoprenóides, compostos de origem vegetal; mas esta conclusão sobre o ancestral em comum é bastante generalizada.

Nome do Aluno: Pedro Henrique Gallo Francisco

Concordo com seu ponto. Acredito ser talvez possível modelar um ancestral comum por computação. O apicomplexa anterior provavelmente era de vida livre ainda.

54 - Dr. Wunderlich, quais são os avanços genômicos quanto aos fatores genéticos humanos relacionados a susceptibilidade à malária?



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

Nome do Aluno: Ariane Jane da Silva Gama

Tem vários grandes estudos que tentam elucidar qual “trait” do genoma humano confere mais resistência ou susceptibilidade a Malaria. Temos por exemplo as Talassemias, os polimorfismos de hemoglobina (S e C), o genótipo heterozigoto de deficiência de glicose 6P desidrogenase e alguns genes associados a resposta imune. Uma mutação interessante ocorreu muito tempo atrás que possivelmente ocorreu em função da malária e que tornou a hemácia humana por um tempo inviável para invasão por Plasmodios de grandes primatas (Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 6;102(36):12819-24.)

55 - Quais mecanismos traducionais e pós-traducionais podem estar envolvidos nas regiões non-coding que levem a alteração nas formas gametocíticas em P.falciparum?

Nome do Aluno: Maíra Catherine Pereira Turiel Silva

Muito boa pergunta e não tem nada na literatura, embora “alteração nas formas gametocíticas” talvez não seja adequadamente formulado. Existem alguns transcritos de gametócitos que são regulados por mecanismos pós-transcripcionais (vão para P-bodies). Como temos muitos ncRNA e asRNAs ainda está em aberto o que elas fazem para contribuir para gametocitogênese.

----- *PERGUNTAS ENVIADAS NA LIVE* -----

1 - Para Gerhard Wunderlich : Boa tarde! Por favor, não tenho experiência com Plasmodium e tenho uma dúvida sobre clonagem e recombinação. Tive dificuldades para fazer clonagem de genes à partir de DNA genômico ou mesmo DNA sintético com codon optimization. As sequências do começo e fim dos genes estavam corretas, mas faltava um pedaço no meio! E isso ocorreu para diferentes construções de um mesmo gene e também para genes diferentes. Você já observou esse problema de recombinação nas clonagens? Estaria relacionado com as low-complexity regions (LCRs) e o genoma muito rico em AT de Plasmodium? Obrigada!"

Nome do Aluno: Priscila Zonzini Ramos

No caso recomendo sempre usar enzima de proofreading para amplificar genes. A gente as vezes amplifica loci, clona o amplicon e temos 9 de 10 clones com mutação. Com proofreading, isso melhora. Várias enzimas de (Pfu etc) PCR funcionam bem.



CURSO ONLINE

TÓPICOS DA PROTOZOOLOGIA CONTEMPORÂNEA

PERGUNTAS e RESPOSTAS

2 - Para Gerhard Wunderlic: A Cas9 associada ao CRISPR poderia funcionar como um marcador biológico?

Nome do Aluno: Laís Ribeiro

Acredito que sim, usando deadCas9 associado com GFP você pode marcar loci.

3- Para Gerhard Wunderlich, Boa tarde! Não tenho experiência com T.gondii, mas gostaria de saber se existe uma relação entre patogenicidade/virulência e o tamanho do genoma de T.gondii. Em sua aula houve uma diferença entre T.gondii GT1 e RH no número de gens codificadores.

Nome do Aluno: Luciana Da Fonseca Medeiros

Acredito que a Andrea consegue responder melhor!

4- Boa tarde, Professores! O que já se sabe sobre a evolução do mecanismo de invasão alternativo que Plasmodium vivax desenvolveu para que possa invadir eritrócitos humanos Duffy negativo?

Nome do Aluno: Aline Maria Vasconcelos Queiroz

Olá, tem um paper que elucidou o ligante/receptor para invasão do Duffy negativo.

Aqui tem um paper sobre a via alternativa da invasão de P. vivax: Science. 2018 Jan 5