



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

BÁRBARA FERNANDES DA SILVA

**Estudo da interação *Plasmodium*-hospedeiro via meta-análise de
dados públicos de sequenciamento duplo de RNA**

**Goiânia
2023**



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Bárbara Fernandes da Silva

3. Título do trabalho

Estudo da interação *Plasmodium*-hospedeiro via meta-análise de dados públicos de sequenciamento duplo de RNA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;

- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Gustavo Araujo Gardinassi, Professor do Magistério Superior**, em 20/07/2023, às 10:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bárbara Fernandes Da Silva, Discente**, em 20/07/2023, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3891405** e o código CRC **833C1C55**.

Referência: Processo nº 23070.033872/2023-21

SEI nº 3891405

BÁRBARA FERNANDES DA SILVA

Estudo da interação *Plasmodium*-hospedeiro via meta-análise de dados públicos de sequenciamento duplo de RNA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública. Área de concentração em Ciências Básicas e Aplicadas em Doenças Infectoparasitárias e Saúde Pública: Parasitologia.

Orientador: Luiz Gustavo Araújo Gardinassi

**Goiânia
2023**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Bárbara Fernandes da
Estudo da interação Plasmodium-hospedeiro via meta-análise de dados públicos de sequenciamento duplo de RNA. [manuscrito] / Bárbara Fernandes da Silva. - 2023.
MMXXIII, 52 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gustavo Araújo Luiz Gustavo Araújo .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2023.
Bibliografia.

Inclui siglas, mapas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, algoritmos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Malária. 2. RNA-seq duplo. 3. integração de dados. 4. imunidade inata. I. Luiz Gustavo Araújo , Luiz Gustavo Araújo , orient. II. Título.

CDU 576.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE BÁRBARA FERNANDES DA SILVA – Aos vinte e nove dia do mês de junho do ano de 2023 (29/06/2023), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **LUIZ GUSTAVO ARAUJO GARDINASSI (IPTSP/UFG)**, **SIMONE GONÇALVES DA FONSECA (IPTSP/UFG)** e **KELY CATARINE MATTEUCCI (FIOCRUZ)**, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “**Estudo da interação *Plasmodium*-hospedeiro via meta-análise de dados públicos de sequenciamento duplo de RNA**”, em nível de MESTRADO, área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PARASITOLOGIA**, de autoria de **BÁRBARA FERNANDES DA SILVA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. **LUIZ GUSTAVO ARAUJO GARDINASSI**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1481/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Prof. Dr. Luiz Gustavo Araujo Gardinassi	<u> Aprovada </u>
Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca	<u> Aprovada </u>
Profa. Dra. Kely Catarine Matteucci	<u> Aprovada </u>

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Habilitada**, (**Habilitada** ou **não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRA EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: PARASITOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 15 h e 55 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOISA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por Luiz Gustavo Araujo Gardinassi, Professor do Magistério Superior, em 29/06/2023, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kely Catarine Matteucci, Usuário Externo**, em 29/06/2023, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Goncalves Da Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3823618** e o código CRC **10AEE2E0**.

Referência: Processo nº 23070.033872/2023-21

SEI nº 3823618

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Bárbara Fernandes da Silva

Orientador (a): Luiz Gustavo Araújo Gardinassi

Membros:

1. Prof. Dr. Luiz Gustavo Araujo Gardinassi

2. Profa. Dra. Kely Catarine Matteucci

3. Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

Data: 29/06/2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço às instituições de fomento, FUNAPE, CNPq e Instituto Serrapilheira, que possibilitaram a execução do projeto, ao meu orientador, professor Dr. Luiz Gustavo Araújo Gardinassi por todos os ensinamentos e pela paciência, aos colegas de laboratório e à minha família.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1 Epidemiologia da Malária	17
1.2 Vetor e Agente Etiológico	19
1.3 Interação <i>Plasmodium</i> -Hospedeiro e a Resposta Imune.....	22
1.4 Transcriptômica aplicada ao estudo da interação <i>Plasmodium</i> -hospedeiro	24
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. MÉTODOS	29
4.1 Busca e seleção de dados de RNAseq-duplo	29
4.2 Alinhamentos nos genomas e normalização dos dados	30
4.3 Módulos transcricionais sanguíneos (BTM) e correlações <i>P. falciparum</i> -humanos... 30	
4.4 Meta-análise das correlações entre BTM e genes de <i>P. falciparum</i>	31
4.5 Meta-análise de transcriptomas de indivíduos com malária e controles saudáveis.. 32	
4.6 Análises estatísticas adicionais e visualização dos dados	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Avaliação dos dados.....	33
5.2 Reduzindo a dimensão de matrizes de expressão gênica de humanos para BTMs 35	
5.3 Identificação das associações entre BTMs e genes de <i>P. falciparum</i>	36
5.4 Redes de interação transcricional unificadas entre parasito-hospedeiro.....	37
5.5 Regulação de BTMs associados a resposta transcricional de <i>P. falciparum</i>	42
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de Risco do Brasil.....	18
Figura 2 – Ciclo Biológico da Malária	21
Figura 3 – Fluxograma de trabalho.....	29
Figura 4 – Número de genes mapeados aos genomas de referência em conjuntos de dados individuais.	34
Figura 5 – Gráfico de Circos.....	35
Figura 6 – Número de BTMs em conjuntos de dados individuais.....	36
Figura 7 – Associações em conjuntos de dados individuais.	36
Figura 8 – Rede de interação transcricional unificada entre <i>P. falciparum</i> e humanos..	37
Figura 9 – Exemplos de BTMs significativos em nível gênico.....	38
Figura 10 – Sub rede de interação transcricional unificada entre <i>P. falciparum</i> e humanos.	39
Figura 11 – Associações positivas entre genes do BTM M68 e o gene RESA de <i>P. falciparum</i>	41
Figura 12 – Associações negativas entre genes do BTM M13 e o gene PF3D7_0804500 de <i>P. falciparum</i>	42
Figura 13 – Regulação de BTMs significativos em pacientes com malária comparados a controles saudáveis.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conjuntos de dados obtidos no repositório público SRA e utilizados no estudo	33
Tabela 2 – Anotações de BTMs e genes de <i>P. falciparum</i> incluídos na sub rede de interação transcricional na figura 10.....	40

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BAM: Arquivos de Alinhamento Binário

BTM: Blood Transcriptions Modules

CDSs: Sensores de DNA Citosólicos

CCR1 e 7: Receptor de Quimicinas C-C

DAMPS: Padrões Moleculares Ligados a Danos

DCs: Células Dendríticas

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

Dual RNAseq: Sequenciamento Duplo de RNA

ENA European Nucleotide Archive

IL: Interleucinas

IFN- γ : Interferon-gama

LGP2: Receptor Laboratório de Genética e Fisiologia 2

MCP-3: Proteína Quimioatraente de Monócitos 3

MDA5: Gene 5 Associado a Diferenciação de Melanoma

MHC-II: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MIP-1 alfa: Proteína 1 Alfa Inflamatória de Macrófago

MPIF -1: Fator Inibitório Progenitor Mielóide-1

NK Natural killer células exterminadoras naturais

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMPS: Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PC1: Componentes Principal 1

PCA: Análise de Componentes Principais

Pf: *Plasmodium falciparum*

PNCM: Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária

PRRs: Receptores de Reconhecimento Padrão

RESA: Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen

RIG1: Retinoic Acid-Inducible Gene 1

RNA: Ácido Ribonucleico

RTS,S/AS01

SMAD2/3

TfH: T follicular helper cell

TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral Beta

TLR: Receptores do Tipo Toll

TNF: Fator de Necrose Tumoral

WHO: World Healthy Organization

RESUMO

Introdução. A malária é uma doença potencialmente fatal causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos por mosquitos *Anopheles*. A infecção causa uma intensa resposta inflamatória, mas os mecanismos moleculares de interação entre hospedeiro e parasita permanecem em grande parte desconhecidos. Embora muitos estudos tenham se dedicado a entender a resposta imune do hospedeiro usando o sequenciamento de RNA de sangue total de pacientes com malária, os avanços tecnológicos permitiram uma avaliação integrativa dos transcriptomas do hospedeiro e do parasita. O acúmulo de diferentes conjuntos de dados em repositórios públicos oferece uma oportunidade de descobrir a interação entre o hospedeiro e o *Plasmodium* por meio da análise integrativa de dados. **Métodos.** Avaliamos dados de RNA-seq de sangue total de 8 conjuntos de dados diferentes de indivíduos com malária causada por infecção com *Plasmodium falciparum* (Pf). Os transcriptomas de humanos foram transformados em Módulos Transcricionais Sanguíneos (BTM). O método de correlação de Spearman foi usado para avaliar associações entre BTMs e genes de Pf. A plataforma de análise PlasmoDB foi usado para avaliar genes de Pf. **Resultados.** Inicialmente, selecionamos correlações ($p < 0.001$) conservadas em 60% dos conjuntos de dados para gerar uma rede de interação transcricional parasito-hospedeiro principal composta, por exemplo, de BTMs relativos a ativação e resposta de células dendríticas e células mieloides, além de diferenciação de leucócitos e células NK. Posteriormente, selecionando correlações conservadas em 75% dos conjuntos de dados, que revelou uma sub rede de interação transcricional parasito-hospedeiro, na qual os BTMs são relativos a monócitos, vias de ativação da imunidade inata, assim como vias de regulação da inflamação. Ainda, a comparação da atividade dos BTMs incluídos nesta sub rede entre indivíduos com malária e controles saudáveis demonstrou a regulação negativa de genes envolvidos com sinalização por SMAD2/3 e alvos transcricionais do receptor de glicocorticoide, enquanto os outros BTMs foram regulados positivamente, incluindo os módulos relativos a monócitos e sinalização por TLR, RIG-I e sensores de DNA citoplasmáticos. **Conclusão.** Em conclusão, nosso estudo identificou diversas associações entre genes de *P. falciparum* e módulos gênicos refletindo células e processos da resposta imune de humanos que podem ser priorizados em estudos experimentais.

Palavras-chaves: Malária, RNA-seq duplo, integração de dados, imunidade inata

ABSTRACT

Introduction. Malaria is a potentially fatal disease caused by *Plasmodium* parasites transmitted by *Anopheles* mosquitoes. Infection causes an intense inflammatory response, but the molecular mechanisms of interaction between host and parasite remain largely unknown. Although many studies have been dedicated to understanding the host immune response using RNA sequencing of whole blood from malaria patients, technological advances have enabled an integrative evaluation of both host and parasite transcriptomes. The accumulation of different datasets in public repositories provides an opportunity to uncover the interaction between host and *Plasmodium* via integrative data analysis.

Methods. We evaluated whole blood RNA-seq data from 8 different datasets of individuals with malaria caused by infection with *Plasmodium falciparum* (Pf). The transcriptomes from humans were transformed to Blood Transcriptional Modules (BTM). Spearman's correlation method was used to evaluate associations between BTMs and Pf genes. PlasmoDB platform was used to evaluate Pf genes. **Results** Initially, we selected correlations ($p < 0.001$) conserved in 60% of the datasets to generate a host-parasite transcriptional network composed, for example, of BTMs related to the activation and response of dendritic cells and myeloid cells, besides of leukocyte differentiation and NK cells. Later, we selected correlations conserved in 75% of the datasets, which revealed a host-parasite transcriptional sub network, in which BTMs are related to monocytes, activation of innate immunity, as well as regulation of inflammation. Moreover, the comparison between the activity of BTMs included in this sub network between individuals with malaria and healthy controls demonstrated the downregulation of genes involved with SMAD2/3 signaling and transcriptional targets of glucocorticoid receptor, while the other BTMs were upregulated, including modules related to monocytes and signaling by TLR, RIG-I and cytosolic DNA sensors.

Conclusion. In conclusion, our study identified diverse associations between genes of *P. falciparum* and gene modules reflecting cells and processes of the human immune response that can be prioritized in experimental assays.

Key words: Malaria, dual RNA-seq, data integration, innate immunity

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

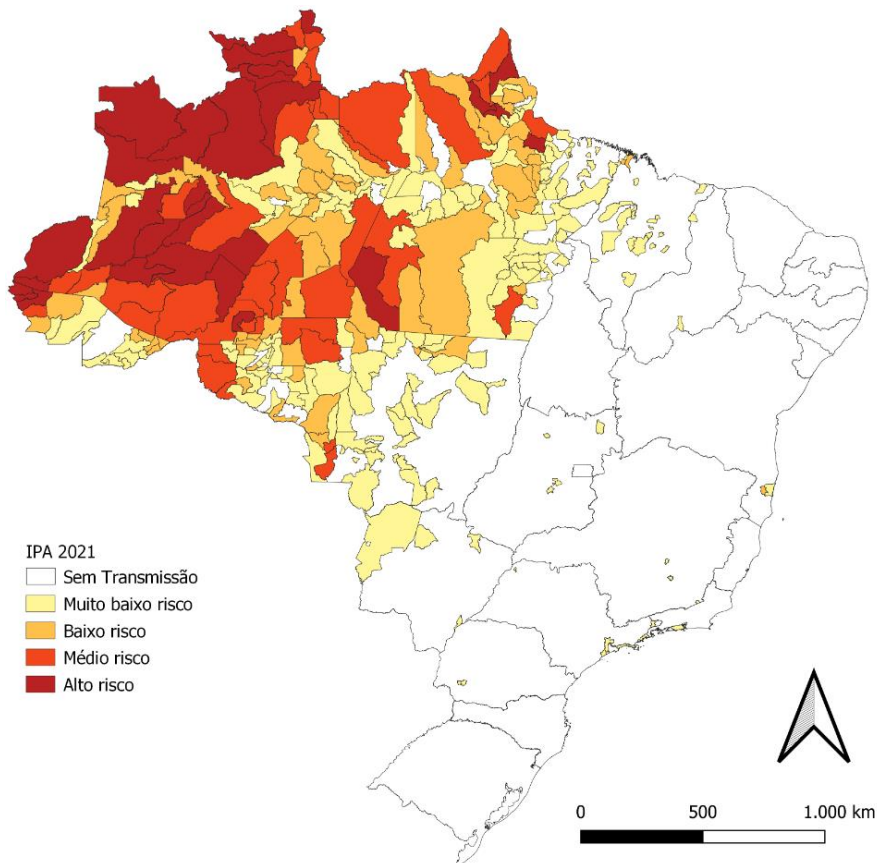
1.1 Epidemiologia da Malária

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, a qual afetou 241 milhões de casos de malária em 2020 de indivíduos, com 627.000 casos fatais, sendo 95% dos casos e 96% dos óbitos registrados na Região Africana da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil, ela foi inicialmente reportada como “febre terçã ou quartã”, após afetar a população indígena Tupinambá em torno do século XVI como consequência do processo de colonização europeia e escravidão de indivíduos provenientes da África (COURA; SUÁREZ-MUTIS; LADEIA-ANDRADE, 2006). Através de análises moleculares foi possível determinar que a malária citada foi causada pelo *Plasmodium falciparum* (YALCINDAG *et al.*, 2012).

Os casos de malária são notados pelos seres humanos desde a antiguidade, há relatos que em meados do século XIV, Hipócrates estabeleceu relação entre casos de febre intermitentes e calafrios com a proximidade do pântano, possibilitando que mais tarde os italianos a nomeassem *aria cattiva* ou *mal’aria* (ar ruim) e os franceses como *paludismo*, em todos os casos a etimologia refere-se a pântanos (BRUCE-CHWATT; WERNSDORFER; MCGREGOR, 1988). Diversas pessoas que marcaram a história sofreram com as febres intermitentes como Santo Agostinho, falecido em 597 a.C. e o poeta italiano, Dante Alighieri, que morreu em 1321 d.C. da mesma causa.

Dados atuais mostram que na América do Sul, a malária ocorre principalmente na região amazônica em países como Venezuela, Peru, Bolívia e Brasil (RECHT *et al.*, 2017). Por se tratar de um país continental com grande território, o Brasil se torna uma área endêmica, que inclui todos os estados da região norte, Maranhão e do Mato Grosso (BRAZIL, SURVEILLANCE., 2010). Os dados do Ministério da Saúde indicam uma queda nos casos de malária no Brasil entre 2010 e 2016. Em 2017 os casos aumentaram expressivamente (aproximadamente 52% em relação à 2016), com 189.515 casos reportados, ao passo que os dados mais recentes apontam que em 2021 foram reportados 139.112 casos autóctones, sendo que a grande maioria (83%) dos casos foi de *P. vivax* e 17% de *P. falciparum* (Brasil, 2022). O mapa de risco publicado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2022) demonstra as áreas de risco da malária no Brasil em 2021 (Figura 1).

Figura 1 – Mapa de Risco do Brasil



Classificação da IPA: Sem transmissão - 0 casos autóctones; Muito baixo risco - IPA <1 caso/1.000 habitantes; Baixo risco - IPA <10 casos/1.000 habitantes; Médio risco - IPA <50 casos/1.000 habitantes; Alto risco - IPA \geq 50 casos/1.000 habitantes.

Data de atualização dos dados: 05 de julho de 2022. Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan.

Fonte: Ministério da Saúde – Governo Brasileiro, 2023. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria-1/mapa-de-risco/mapa-de-risco-2021-site.png/view>

Em relação às mortes por malária, no ano de 2018 houve um aumento significativo no número de casos de malária no Brasil. Neste ano, o número de óbitos aumentou 64,7%, indo de 34 em 2017 para 56 em 2018. No ano seguinte, 2019, houve redução de 33,9%, tendo o Brasil registrado 37 óbitos. Em 2020 ocorreu novo aumento, neste ano foram registrados 51 óbitos, 37,8% de aumento em comparação ao ano anterior. Em 2021, de acordo com dados preliminares, foram registrados 58 óbitos por malária no país, representando 13,7% de aumento em comparação a 2020. A letalidade por malária na região amazônica é baixa (0,04%) enquanto no restante do país a letalidade chegou a ser 23,25 vezes maior em 2021 (Brasil, 2022). O óbito nestas áreas ocorre, na maior parte, em pessoas que vêm infectadas de outros países ou de estados da região amazônica e não recebem o diagnóstico e tratamento oportunos e adequados devido à dificuldade na

suspeição de uma doença relativamente rara nestas áreas e desinformação dos viajantes a respeito dos seus riscos.

O Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) foi instituído pela Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde do Brasil, e foi projetado para trabalhar de forma a reduzir a transmissão e conseqüentemente da sua mortalidade, além de efetuar a manutenção da eliminação nos locais em que essa meta já foi alcançada. Dados da Organização Mundial da Saúde confirmam que nas Américas a infecção por malária é predominantemente marcada por *Plasmodium vivax*, o qual registrou 68% do casos em 2020 (“WHO Guidelines for malaria”, 2021), os registros também indicam que no Brasil o parasito causa infecções frequentes na região amazônica representando 46% das notificações em 2018 (MENDES *et al.*, 2018).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde as mudanças no cenário epidemiológico, após a implantação do PNCM, precisaram de ajustes nas estratégias do Programa, a fim de atender populações vulneráveis e em áreas de difícil acesso, como áreas indígenas, garimpos e de fronteira. Além disso, foi necessário lançar em complemento ao PNCM, em 2015, o Plano de Eliminação da malária por *Plasmodium falciparum* visando a proposta de eliminação da doença até 2035, e acabar com as epidemias de malária até 2030 em consonância com a OMS.

Como publicado pela Organização Mundial da Saúde (2021), nas últimas duas décadas, 11 países foram certificados como livres de malária após apresentaram por três anos consecutivos zero casos de malária. Além disso, a mortalidade e morbidade associadas à malária apresentaram declínio significativo na última década ao redor do mundo, este progresso foi obtido devido à intensificação de medidas de controle, adequação de diagnóstico rápido e estabelecimento de redes para antecipar e mitigar a resistência a drogas antimaláricas.

1.2 Vetor e Agente Etiológico

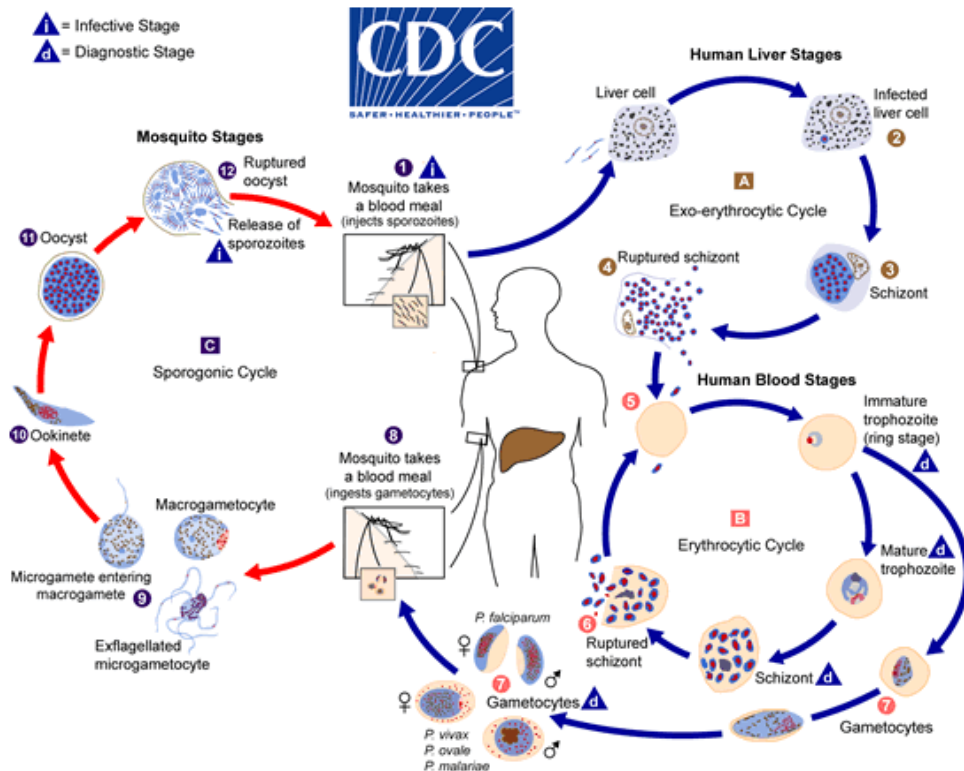
O inseto vetor da malária trata-se de mosquitos do gênero *Anopheles* e sua ampla distribuição no Brasil é facilitada pelo clima tropical. Este gênero compreende aproximadamente 400 espécies, das quais cerca de 60 são encontradas no Brasil (SIQUEIRA *et al.*, 2018). Carlos e colaboradores (2019) verificaram que os estados do Amapá e Amazonas possuem a maior variedade de espécies que mosquitos desse gênero, corroborando com os dados da OMS que estabelecem essa região como a maior ofensora em notificações. Os autores ressaltam ainda que os dados podem estar sujeitos a vieses

de baixa amostragem, assim como a subnotificação. Além disso, a sazonalidade das regiões interfere diretamente no índice de propagação da malária, visto que é maior em períodos chuvosos e sofre um decréscimo do número de casos da doença em períodos de estiagem pois a seca diminui a proliferação do vetor (WYSE; BEVILACQUA; RAFIKOV, 2006). O principal vetor no Brasil é o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* que possui um comportamento antropofílico e endofílico, além de possuir reconhecidamente o hábito de picar no interior (endofagia) e nas proximidades das residências (exofagia) (SIQUEIRA et. al, 2018).

Os agentes etiológicos da malária são espécies do gênero *Plasmodium* e *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* e *P. simium* infectam e causam doença em humanos. No Brasil, as infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* são predominantes e constituem espécies de grande importância para a saúde pública do país e no mundo (CARLOS et al., 2019). Este trabalho abordou a malária causada por *P. falciparum* devido à significância da malária causada por esta espécie, mas principalmente, devido à disponibilidade de dados em bases de acesso público.

A transmissão da malária ocorre através interação entre o inseto vetor (hospedeiro definitivo), parasitos e hospedeiros intermediários, podendo estes serem mamíferos, répteis ou até mesmo aves configurando, portanto, um ciclo heterógeno (Figura 2). Durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito vetor, previamente infectada, esporozoítos de *Plasmodium* são inoculados no hospedeiro humano, as quais atingem a circulação sanguínea e infectam hepatócitos rapidamente, e dão início ao ciclo de maturação em esquizontes (Figura 2). Após replicação assexuada e geração de merozoítos, as células se rompem e os liberam para a corrente sanguínea, possibilitando a invasão dos eritrócitos e a replicação, dando origem a novos merozoítos (REAL et al., 2021). Esta fase sanguínea é responsável pelas manifestações clínicas da malária que causam um quadro clínico variável e inclui calafrios, febre alta em períodos intermitentes, sudorese e dor de cabeça; pode ocorrer também dor muscular, taquicardia, aumento do baço e, por vezes, delírios. O ciclo tem continuidade quando alguns trofozoítos se diferenciam em uma forma sexuada, os gametócitos, que são ingeridos pela fêmea do mosquito durante sua alimentação (USUI; WILLIAMSON, 2021).

Figura 2 – Ciclo Biológico da Malária



Legenda: 1) Os esporozoítos infectam as células do fígado; 2) e amadurecem em esquizontes; 3) que se rompem e liberam os merozoítos; 4) (É importante notar que em *P. vivax* e *P. ovale*, um estágio dormente [hipnozoítos] pode persistir no fígado (se não for tratado) e causar recaídas invadindo a corrente sanguínea semanas ou mesmo anos depois.) Após essa replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica A), os parasitas sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica B). Os merozoítos infectam os glóbulos vermelhos; 5) Os trofozoítos em estágio de anel amadurecem em esquizontes, que se rompem liberando merozoítos; 6) Alguns parasitas se diferenciam em estágios eritrocíticos sexuais (gametócitos); 7) Os parasitas da fase sanguínea são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Os gametócitos, masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos), são ingeridos por um mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo; 8) A multiplicação do parasita no mosquito é conhecida como ciclo esporogônico C. Enquanto no estômago do mosquito, os microgametas penetram nos macrogametas gerando zigotos; 9) Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados (ookinetes); 10) que invadem a parede do intestino médio do mosquito onde se desenvolvem em oocistos; 11) Os oocistos crescem, se rompem e liberam esporozoítos; 12) que seguem para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos 1 em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida da malária. Fonte: CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2020. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>.

As infecções por *P. falciparum* são mais graves e podem induzir o desenvolvimento de malária cerebral, responsável por cerca de 80% dos casos letais da doença, na qual, além da febre e dor de cabeça, também são observados sintomas como ligeira rigidez na nuca, perturbações sensoriais, desorientação, sonolência ou excitação, convulsões, vômitos, e até o coma. O rosetamento, formação na qual um eritrócito

infectado rodeado por outros eritrócitos sequestrados no cérebro causa vasodilatação, excesso de liberação de radicais livres, produção de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), levando a uma resposta inflamatória extrema na região cerebral, a ausência do equilíbrio pode causar edema cerebral e, conseqüentemente, o comprometimento da barreira hematoencefálica (MILNER, 2018).

A eliminação da malária deverá ocorrer após desenvolvimento e administração de vacinas efetivas, as quais, até o momento, têm sido idealizadas com foco em determinar possíveis antígenos expressos por *Plasmodium*, principalmente *P. falciparum*, que podem ser alvos instrumentais para induzir imunidade protetora. No entanto, as variações e polimorfismos antigênicos que surgem nos genes do parasita sob pressão seletiva da resposta imune constituem grandes desafios para seleção e priorização de antígenos vacinais, além de serem fatores de confusão na interpretação de resultados de ensaios clínicos com vacinas em fase de teste (MOORMANN; NIXON; FORCONI, 2019). A única vacina recomendada e licenciada para uso contra a malária causada por *P. falciparum* é a RTS,S/AS01 que é uma vacina direcionada a CSP (Proteína Circunsporozoita) (DOBAÑO, C., UBILLOS, I., JAIROCE, C. ET AL., 2019). Apesar de útil, a RTS,S/AS01 ainda apresenta eficácia muito baixa e há portanto, a necessidade de aprimoramento e desenvolvimento de novas vacinas.

1.3 Interação *Plasmodium*-Hospedeiro e a Resposta Imune

O contato inicial entre o parasito e o hospedeiro acontece na primeira barreira física da imunidade inata: a pele. Quando a fêmea do mosquito *Anopheles* se alimenta do sangue, e inocula os esporozoítos no hospedeiro, os mesmos podem ficar retidos na pele por até 6 horas, gerando diferentes respostas imunes (YAMAUCHI *et al.*, 2007). O aparelho bucal do vetor é responsável por facilitar a migração dos esporozoítos que, ao atingirem a circulação, se dirigem e infectam hepatócitos (YANG *et al.*, 2017).

O dano aos hepatócitos infectados pode resultar na liberação de padrões moleculares ligados a danos (DAMPs- *damage associated molecular patterns*) e padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*), que desencadeiam a ativação da resposta imune inata. DAMPs e PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs-*pattern recognition receptors*), incluindo, por exemplo, TLR2 (glicosilfosfatidilinositol), TLR4 (hemozoína) e TLR9 (hemozoína e DNA) que fazem parte de um conjunto de proteínas transmembrana denominados receptores do tipo Toll (TLRs-toll-like receptors). Os

principais receptores capazes de reconhecer componentes do *Plasmodium* no citoplasma da célula são os genes indutores de ácido retinóico do tipo 1 (RIG 1, do inglês, retinoic acid-inducible gene 1), gene 5 associado a diferenciação de melanoma (MDA5, do inglês, melanoma differentiation associated gene 5) e receptor laboratório de genética e fisiologia 2 (LGP2, do inglês, laboratory of genetics and physiology 2) do tipo RIG-I, capazes de reconhecer ácido ribonucleico (RNA, do inglês, ribonucleic acid) do parasito. O reconhecimento por estes receptores leva a ativação de células hepáticas, assim como de células hematopoiéticas, incluindo células exterminadoras naturais (NKs), macrófagos e células dendríticas (DCs), que iniciam a ativação da resposta imune (KALANTARI *et al.*, 2014; NATAMA *et al.*, 2018). O estágio hepático é assintomático, porém, existe uma resposta imunológica direcionada aos esporozoítos (ZHENG; TAN; XU, 2014). De fato, a ativação de PRR em hepatócitos promove a expressão dependente de IRF3 e IRF7 de IFN tipo I e tipo III (SAKURAGI *et al.*, 2022). Células mieloides, como macrófagos DCs, também exibem aumento da sinalização por IFN-I, o que resulta no recrutamento de células NK e linfócitos citotóxicos (LIEHL *et al.*, 2014). Os antígenos presentes na superfície de hepatócitos passam a ser reconhecidos pelo complexo principal de histocompatibilidade do tipo 1 e apresentados a células T CD8⁺ citotóxicas capazes de eliminar hepatócitos infectados (IMAI *et al.*, 2015).

Durante o período eritrocítico há um novo ciclo de reprodução assexuada que gerará novos merozoítos e gametócitos. O aumento de tamanho e quantidade de parasitos nos eritrócitos infectados tornam estas células rígidas e deformadas e, desta forma, são eliminadas no baço (BUCŞAN; WILLIAMSON, 2020). Entretanto, após o rompimento simultâneo de milhares de eritrócitos infectados no decorrer do ciclo, ocorre a liberação de ligantes de PRRs que induzem a maturação de DCs, as quais migram para o baço. Essa maturação de DCs está associada a um aumento na expressão de moléculas de co-estimulação, como CD80, CD86, CD40, de MHC-II e moléculas de adesão. As DCs ativadas produzem interleucina-12 (IL-12), que ativa células NK e induz a produção de IFN- γ . Em conjunto, a sinalização de IL-12 e IFN- γ são cruciais para a diferenciação de células T auxiliares 1 (Th1, do inglês, T helper 1), assim como linfócitos T foliculares (Tfh, do inglês, T follicular helper cell) polarizados para Th1. Tfh promovem a formação de centros germinativos, hiper mutação somática e troca de classe de anticorpos produzidos por linfócitos B específicos para *Plasmodium* (LIMA-JUNIOR; PRATT-RICCIO, 2016). A grande quantidade de eritrócitos eliminados somada ao sequestro (adesão ao endotélio) que estas células sofrem na tentativa de evadir a resposta imune

pode causar anemia e conseqüentemente a acidose láctica sistêmica devido à redução de oxigênio nos tecidos (POSSEMIERS; VANDERMOSTEN; VAN DEN STEEN, 2021).

O conhecimento acerca dos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro durante a malária foi obtido principalmente via estudos que focaram em um ou poucos componentes do hospedeiro, do vetor ou do patógeno. Estes estudos foram realizados com modelos animais, incluindo camundongos, aves e primatas não-humanos, cada um selecionado devido a algum aspecto, como fácil manuseio ou mesmo a relação evolucionária com humanos (BAIRD, 2009). Embora eles sejam importantes para identificação de mecanismos moleculares atuando na patogênese e proteção contra a malária, estudos utilizando ferramentas em larga escala têm revolucionado o entendimento da relação entre *Plasmodium* e humanos.

1.4 Transcriptômica aplicada ao estudo da interação *Plasmodium*-hospedeiro

Para entender sistemas biológicos de forma holística, a emergente disciplina de biologia de sistemas combina tecnologias de alto rendimento para avaliar o genoma, epigenoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma, lipidoma, microbioma, entre outros níveis de um determinado sistema biológico. Estes dados são então processados, analisados, interpretados e integrados por meio da bioinformática e são usados para construir modelos preditivos das redes de interações dinâmicas entre componentes biológicos de patógenos, hospedeiros e vetores (ADEREM *et al.*, 2011). Após rodadas interativas do desenvolvimento e teste do modelo, as previsões refinadas podem ser utilizadas para descobrir novas características da biologia da interação *Plasmodium*-hospedeiro, além de identificar alvos terapêuticos ou mesmo antígenos vacinais.

Devido à natureza destes dados, eles podem ser reutilizados para responder perguntas além daquelas feitas originalmente, e desta forma a geração e validação de hipóteses *in silico* tem aumentado consideravelmente via o reuso de dados públicos, que teve início em estudos sobre a biologia do câncer (SEGAL *et al.*, 2005). Recentemente, dados públicos de expressão gênica de múltiplos estudos foram reutilizados para inferir módulos transcricionais sanguíneos em humanos (LI *et al.*, 2014); derivar assinaturas de infecção viral (TSALIK *et al.*, 2016), desenvolver assinaturas preditivas que diferenciam origem infecciosa ou não-infecciosa de inflamação (SWEENEY *et al.*, 2015), e para promover o reposicionamento de drogas, ou seja, identificar drogas conhecidas para tratar determinada doença que possam ser utilizadas na terapia de outras doenças (DUDLEY; DESHPANDE; BUTTE, 2011)

O estudo da expressão gênica via transcriptômica é a estratégia mais frequentemente utilizada em estudos ômicos sobre a malária. Por exemplo, estes estudos têm sido fundamentais para revelar a variação da expressão gênica nas transições de estágio e no desenvolvimento do *Plasmodium* durante a infecção (TORO-MORENO *et al.*, 2020). O uso da transcriptômica também revelou diversos processos da resposta imune durante a malária, incluindo ativação por citocinas, regulação da apoptose, Co expressão de receptores do tipo Toll (TLR), assim como ação de interferons do tipo 1; e como estes processos estão associados a fatores parasitológicos e/ou clínicos, como a parasitemia e febre (SMITH; STYCZYNSKI, 2018). Estes estudos têm gerado um grande volume de dados tanto sobre hospedeiros, quanto sobre parasitos, e que estão disponíveis em repositórios públicos.

Mais recentemente o sequenciamento de RNA duplo (dual RNA-seq) foi desenvolvido como um método para acessar o transcriptoma de ambos patógenos e hospedeiros durante a infecção (WESTERMANN; VOGEL, 2018). Esta estratégia já foi utilizada para avaliar por exemplo, infecção bacteriana na pele (GRIESENAUER *et al.*, 2019), ou mesmo leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum* (GOMES *et al.*, 2023). Na malária, o estágio patogênico do parasita ocorre no sangue, onde ocorrem interações importantes entre os parasitos e leucócitos do hospedeiro. Além de ser um condúite para respostas sistêmicas à infecção, o perfil transcricional sanguíneo pode refletir o estado inflamatório e metabólico de leucócitos e parasitos, gerando informações que podem ser acessadas via dual RNA-seq. Utilizando esta estratégia de investigação foi demonstrado que alterações na expressão gênica refletindo de vias da imunidade inata de humanos, como TLR2 e TICAM2, correlacionam com a gravidade da infecção. Ainda, fatores de transcrição como *JUND* e moléculas sinalizadoras como *TNFAIP3* foram fortemente correlacionados com padrões de expressão dos parasitos (YAMAGISHI *et al.*, 2014). Outro estudo descreveu outros processos relacionados às vias de tradução humana e parasitária, mostrando que existe uma forte relação de co regulação entre as espécies e, que conseqüentemente, possibilita compreender de forma mais clara o comportamento da expressão gênica tanto do hospedeiro quanto do parasita (LEE *et al.*, 2018a).

Apesar da importância do conhecimento obtido nestes estudos realizados em coortes individuais, a combinação e integração destes dados apresenta potencial enorme para gerar conhecimento robusto sobre como moléculas do parasito influenciam a resposta do hospedeiro, ou vice-versa. A análise integrada dos dados consiste em uma meta-análise, que é um método objetivo e estatístico para combinar resultados de

diferentes estudos sobre um determinado tema, e que pode resolver conflitos entre os resultados obtidos em estudos individuais. A grande vantagem deste método é que ele produz uma estimativa precisa do tamanho de efeito com poder estatístico consideravelmente aumentado, o que é extremamente importante principalmente quando um estudo isolado possui um número limitado de amostras (LEE *et al.*, 2018b).

Um trabalho recente demonstrou que 63 estudos sobre malária em hospedeiros humanos, primatas não-humanos e camundongos possuem potencial de prover dados tanto do hospedeiro, quanto do parasito, somando um total de 3348 amostras apropriadas para análise via dual RNA-seq (MUKHERJEE; BURGIO; HEITLINGER, 2021). Este estudo também identificou processos da resposta imune bem estudados experimentalmente, cuja estratégia de investigação capturou processos conhecidos interligados entre hospedeiros e parasitas em adição a associações individuais entre proteínas do hospedeiro e parasito. O conjunto central de interações representa as similaridades de interação entre diversas espécies de *Plasmodium* e hospedeiros, que podem ser priorizadas em experimentos laboratoriais.

Embora este último estudo relatado tenha realizado uma meta-análise compreensiva das interações entre diversas espécies de *Plasmodium* e hospedeiros, a interpretação destes dados ainda permanece complexa e novos métodos computacionais de integração dos dados podem auxiliar nesta questão. Ainda, sabe-se que a resposta imune de diferentes espécies de mamíferos pode apresentar diferenças significativas, e ao mesmo tempo é preciso aprofundar no estudo da interação de humanos com *P. falciparum*, que causa a maior parte dos casos graves e óbitos devido à malária. Portanto, identificar processos e vias biológicas ativadas durante a infecção por *P. falciparum* em humanos é de importância crucial para compreender a imunobiologia da malária humana.

2. JUSTIFICATIVA

A maioria dos estudos sobre a patogênese de doenças parasitárias foca apenas no patógeno, no hospedeiro ou no vetor. Porém, durante a interação patógeno-hospedeiro-vetor, ocorrem alterações em diferentes níveis dos sistemas de todos os organismos. Desta forma, o desfecho clínico da infecção por *Plasmodium* é determinado pela interação entre vários componentes biológicos. Essas modificações em diferentes níveis moleculares podem ser identificadas por meio de tecnologias ômicas, determinando possíveis características conservadas ou específicas tanto na resposta do parasito quanto na resposta do hospedeiro.

Os estudos de meta-análises exemplificam como a integração de dados gerados em estudos distintos pode levar a novas perspectivas biológicas, visto que esta estratégia pode servir como um ponto de partida para determinar possíveis delineamentos experimentais futuros. Dados de dual-RNAseq de pacientes com malária causada por *P. falciparum* estão disponíveis em repositório público e a reutilização e integração deles oferece oportunidade ímpar para geração de conhecimento robusto sobre a interação *P. falciparum*-humano.

Embora um estudo prévio já tenha realizado uma meta-análise de RNAseq-duplo focada nas interações entre *Plasmodium*-hospedeiro, este estudo realizou uma avaliação generalista, a qual intersecciona as relações comuns entre hospedeiros e parasitos de espécies distintas. Ainda, a metodologia empregada neste trabalho prévio resultou em uma rede de interação complexa e de difícil interpretação devido a grande quantidade de interações identificadas (que gera grande dimensão nos dados) e ferramentas utilizadas para avaliação dos processos e vias imunológicas. Desta forma, é necessário realizar uma integração de dados mais específica entre humanos e *P. falciparum* com a finalidade de identificar os processos mais significativos desta interação espécie-específica, além de aprimorar a interpretação destas associações com ferramentas dedicadas ao estudo da resposta imune de humanos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi identificar interações entre a resposta transcricional de humanos e *P. falciparum* conservadas em diferentes coortes de pacientes com malária.

3.2 Objetivos específicos

i) compilação, avaliação e seleção de dados de RNAseq-duplo disponíveis em bases de dados pertinentes;

ii) processamento dos dados selecionados para compor a meta-análise;

iii) integração de transcriptomas de *P. falciparum* e humanos em estudos individuais;

iv) meta-análise das redes transcricionais de interação entre *P. falciparum* e hospedeiro;

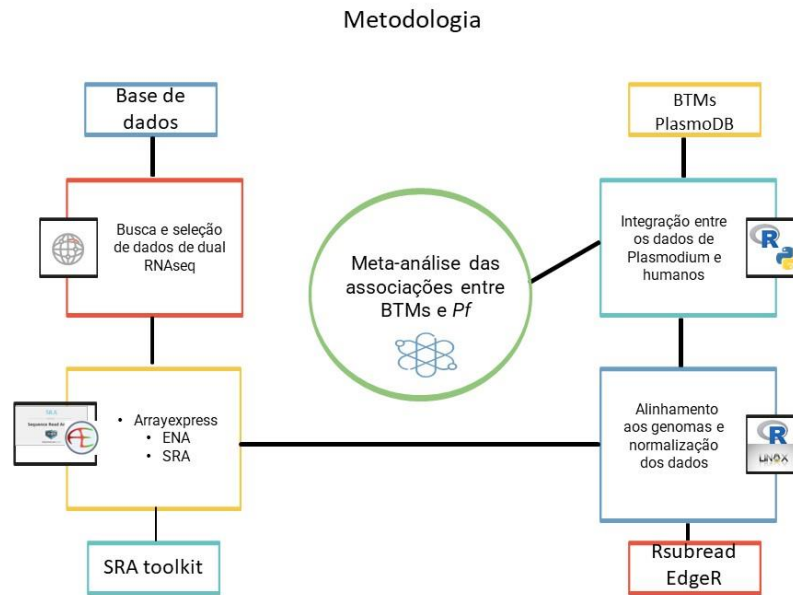
v) construção de uma rede de interação transcricional unificada entre *P. falciparum* e humanos;

vi) análise funcional da rede de interação e interpretação das interações entre *P. falciparum* e humanos.

4. MÉTODOS

Um fluxograma da metodologia de análise está demonstrado na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma de trabalho.



Legenda: Os dados de dual RNA-seq de amostras do sangue de indivíduos com malária causada por *P. falciparum* foram buscados em repositórios públicos (SRA e ENA), selecionados, e baixados. Os 8 conjuntos de dados diferentes foram então alinhados aos genomas de referência e normalizados. Os dados de humanos foram reduzidos a 346 BTMs e posteriormente foram realizadas análises de correlação para identificar associações entre a atividade dos BTMs e a expressão de genes do *P. falciparum*. As correlações individuais em cada conjunto de dados diferentes foram filtradas com um limiar de $p < 0.001$. Listas unificadas de correlações foram obtidas através da identificação de correlações conservadas em ao menos 5 (60%) ou 6 (75%) dos conjuntos de dados. Estas listas foram usadas para construção de redes de interação gênica entre BTMs e genes de *P. falciparum*.

4.1 Busca e seleção de dados de RNAseq-duplo

Buscas por dados de dual RNA-seq de humanos e *P. falciparum* em amostras de sangue de pacientes com malária foram realizadas nas bases de dados NCBI Sequence Read Archive (SRA) e European Nucleotide Archive (ENA). O programa SRA toolkit foi utilizado para adquirir os dados da base SRA através das funções `prefetch` e `fastq-dump` e os dados provenientes do ENA foram baixados manualmente. As *reads* provenientes do sequenciamento de cada amostra foram pré-processadas através do programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) para

controle de qualidade dos dados. O programa fastp foi usado para remoção de adaptadores e de sequências inadequadas ao estudo, devendo manter obrigatoriamente 70% ou mais do conteúdo original (CHEN *et al.*, 2018).

4.2 Alinhamentos nos genomas e normalização dos dados

Para mapeamento e alinhamento das *reads*, os genomas de referência de ambos hospedeiro (GRCh38.p13) e parasito (*P. falciparum* 3D7), foram adquiridos através do buscador genômico Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) e em seguida foram alinhados utilizando o programa Rsubread para R e a função align(), gerando arquivos de alinhamento binário (BAM), que foram utilizados para contagem do número de *reads* com a função featureCounts() do mesmo programa (LIAO; SMYTH; SHI, 2013). A normalização dos dados foi realizada com o pacote edgeR e a anotação foi realizada utilizando o pacote biomaRt para R (LANGFELDER; HORVATH, 2008; ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010).

4.3 Módulos transcricionais sanguíneos (BTM) e correlações *P. falciparum*-humanos

Análise funcionais dos transcriptomas de sangue de humanos podem ser avaliadas de uma maneira não-enviesada com a plataforma de módulos transcricionais sanguíneos (BTMs, do inglês, blood transcriptional modules), uma rede gênica específica de humanos construída pela integração de > 30.000 transcriptomas de amostras de sangue, e composta por sub-redes (módulos transcricionais) que refletem a atividade de células, vias de sinalização, fatores de transcrição, metabolismo, entre outros processos biológicos (LI *et al.*, 2014). Portanto, a expressão de milhares de genes avaliados em cada coorte individual foi reduzida a atividade de 346 BTMs para cada uma das amostras. Para tal, nós utilizamos o pacote tmod na linguagem R (ZYLA *et al.*, 2019), o qual realiza uma análise de componentes principais (PCA, do inglês, principal component analysis) com a expressão dos genes de cada BTM individual. O escore do primeiro componente principal (PC1) resultante do PCA é então utilizado como atividade de cada BTM.

As correlações entre a atividade de cada BTM e a expressão dos genes de *P. falciparum* foram avaliadas utilizando o método de correlação de Spearman, que é um método não paramétrico e indicado para avaliar correlações em dados cuja distribuição pode não ser normal.

4.4 Meta-análise das correlações entre BTM e genes de *P. falciparum*

Para identificar associações robustas entre BTMs e genes de *P. falciparum*, nós iniciamos pela exclusão de correlações cujos valores de significância (p) foram < 0.001 . Isto resultou em listas com diferentes números de correlações entre BTM e genes de *P. falciparum* para cada conjunto de dados individual. Posteriormente, nós identificamos as correlações conservadas entre o maior número de conjunto de dados através de um código próprio descrito a seguir:

```
# Define the column name to check
column_to_check <- "merged"

# List of data frames
data_frames <- list(data1,data2, data3, data4, data5, data6, data7, data8)

# x = the number of datasets to be evaluated

# Function to find the same value in a column across multiple data frames
findSameValueAcrossDataFrames <- function(data_frames, column) {
  values_count <- table(unlist(lapply(data_frames, function(df) df[[column]])))
  same_value <- names(values_count[values_count >= x])

  return(same_value)
}

# Call the function to find the same value
same_value <- findSameValueAcrossDataFrames(data_frames, column_to_check)

# Print the same value
df_same_value <- data.frame(same_value)
```

Nós realizamos duas meta-análises: i) correlações conservadas em ao menos 5 conjuntos de dados, totalizando aproximadamente 60% de presença nos diferentes conjuntos de dados; ii) correlações conservadas em ao menos 6 conjuntos de dados, totalizando 75% de presença. Este método assegura que apenas correlações ocorrendo no maior número de amostras, e, portanto, com maior grau de robustez e reprodutibilidade, sejam retidas para avaliação posterior.

4.5 Meta-análise de transcriptomas de indivíduos com malária e controles saudáveis

Para avaliar a regulação da atividade dos BTMs associados significativamente com a resposta transcricional de *P. falciparum*, nós realizamos uma nova meta-análise, porém agora comparando pacientes com malária e controles saudáveis. Para isso, nós buscamos dados de transcriptoma obtidos via tecnologia de microarranjo de nucleotídeos ou RNA-seq do sangue total, que resultou na identificação de 11 conjuntos de dados diferentes, contendo 477 amostras de indivíduos com malária natural ou experimental causada por *P. falciparum* e controles saudáveis. Os dados de microarranjo foram normalizados através do método de quantis e os dados de RNAseq foram normalizados como descrito acima. Os dados também foram transformados para BTMs como descrito acima. Nós utilizamos o pacote para o R, MetaIntegrator, para realizar a meta-análise compreendendo os 11 conjuntos de dados, o qual inicia calculando o tamanho de efeito para cada conjunto de dados individual utilizando o método de g de Hedges. Posteriormente, os tamanhos de efeito de cada conjunto de dados são integrados em um meta-tamanho de efeito utilizando o método DerSimonian-Laird de modelos de efeitos randômicos e os valores de p foram corrigidos pelo método de falsas descobertas (FDR) pelo método de Benjamini-Hochberg.

4.6 Análises estatísticas adicionais e visualização dos dados

O método de correlação de Spearman também foi utilizado para avaliar a correlação entre genes membros de BTMs e genes de *P. falciparum*. Estes dados de dispersão, assim como gráficos de barra foram gerados com o programa GraphPad Prism v 5.0. As redes de interação entre BTMs e genes de *P. falciparum* foram visualizadas com o programa Cytoscape v 3.9.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação dos dados

Durante o processo de busca dos trabalhos disponíveis nas bases de dados públicas, foram identificados 14 conjuntos de dados com possibilidade de análise de ambos os perfis transcricionais de hospedeiros humanos e *P. falciparum*. Dos 14 conjuntos de dados com este potencial, 8 foram retidos para aquisição e processamento dos dados brutos baseando-se em um limiar de porcentagem de ao menos 25% de cobertura de transcritos alinhados ao genoma de *P. falciparum*, reportado em estudo prévio (MUKHERJEE; BURGIO; HEITLINGER, 2021). Estes dados foram obtidos de pacientes com infecção natural ou voluntários infectados experimentalmente com *P. falciparum*, com número mínimo de 5 amostras de sangue coletadas no momento em que os indivíduos apresentaram sintomas da malária (Tabela 1). Todas as amostras (n = 286) passaram pelo controle de qualidade e foram mapeadas aos genomas de referência humano e do parasito.

Tabela 1 – Conjuntos de dados obtidos no repositório público SRA e utilizados no estudo

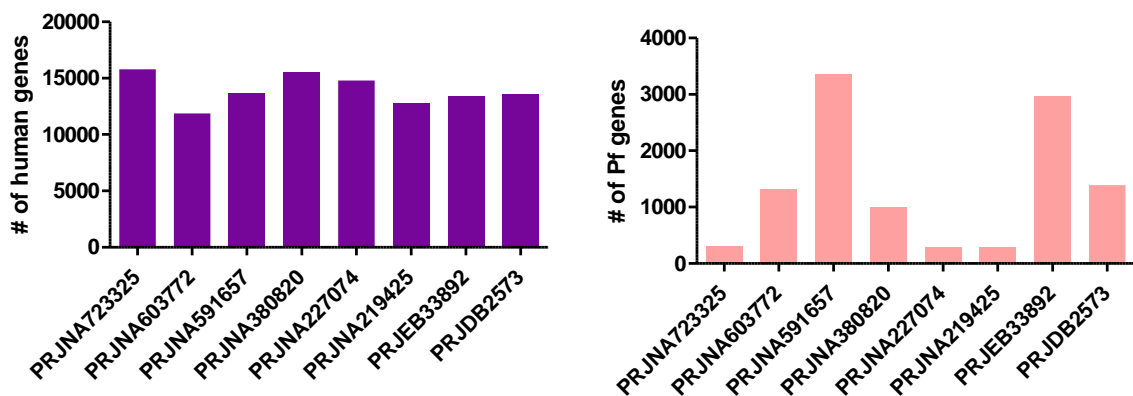
SRA ID	GEO ID	Tipo de infecção	Tipo de amostra	Nº de amostras
PRJNA723325	GSE172450	experimental	Sangue Total	29
PRJNA603772	GSE144476	natural	Sangue Total	52
PRJNA380820	GSE97158	experimental	Sangue Total	20
PRJNA227074	GSE52166	natural	Sangue Total	95
PRJNA219425	GSE50957	experimental	Sangue Total	5
PRJDB2573	DRP000987	natural	Sangue Total	17
PRJNA591657	SRP233153	natural	Sangue Total	15
PRJEB33892	ERP116722	natural	Sangue Total	53

Fonte: Elaborada pelos autores.

Para entender as associações entre os perfis transcricionais entre humanos e *P. falciparum*, iniciamos com o processamento e normalização dos dados. Após filtragem dos genes para cada conjunto de dados individualmente, podemos observar que um número semelhante de genes foi retido para análises posteriores nos conjuntos de dados de humanos, porém, o mapeamento e quantificação dos genes de *P. falciparum* teve grande variação entre os diferentes conjuntos de dados (Figura 4). Isto é esperado, pois

enquanto a resposta transcricional de humanos é gerada a partir do RNA extraído de leucócitos circulantes que são abundantes na circulação periférica, o RNA extraído do parasito é derivado dos eritrócitos infectados. O ciclo do *P. falciparum* é complexo, e sabe-se que apenas parte do ciclo eritrocitário ocorre na circulação periférica, enquanto boa parte dos eritrócitos infectados são sequestrados na vasculatura de órgãos como pulmão, rins e baço. Portanto, a recuperação de RNA parasitário depende do estágio do parasita no hospedeiro, além de fatores técnicos no preparo e sequenciamento das amostras.

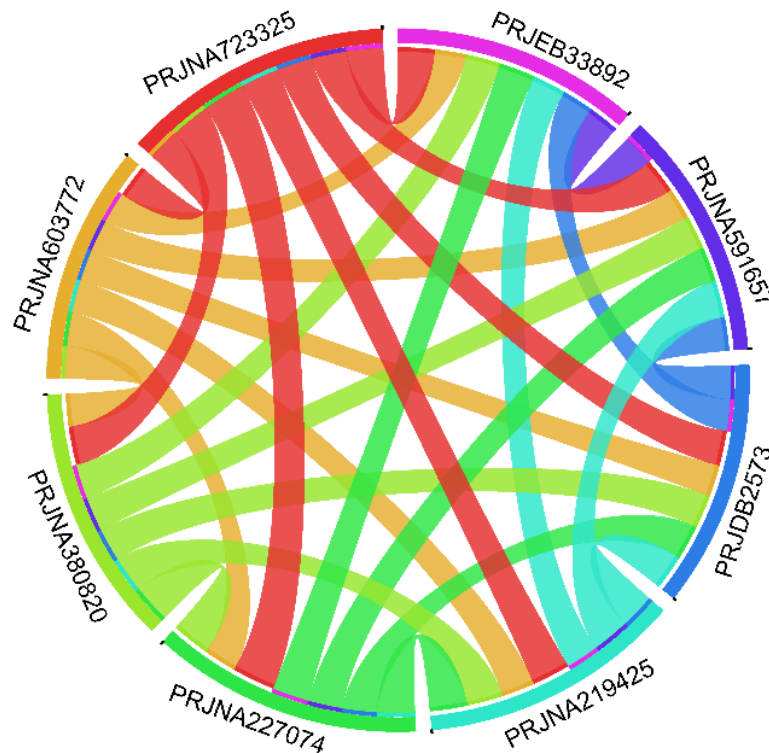
Figura 4 – Número de genes mapeados aos genomas de referência em conjuntos de dados individuais.



Legenda: O número de genes mapeados ao genoma de referência humano (GRCh38.p13) está demonstrado no gráfico à esquerda e o número de genes mapeados ao genoma de referência de *P. falciparum* (*P. falciparum* 3D7) está demonstrado à direita.

Uma análise de sobreposição das listas de genes de humanos revelou 9976 genes comuns a todos os conjuntos de dados e na Figura 5 é possível observar que a sobreposição do número de genes entre dois conjuntos de dados diferentes é muito semelhante entre as diferentes comparações, já que a espessura das fitas no gráfico de circo é quase a mesma nas diferentes comparações.

Figura 5 – Gráfico de Circos

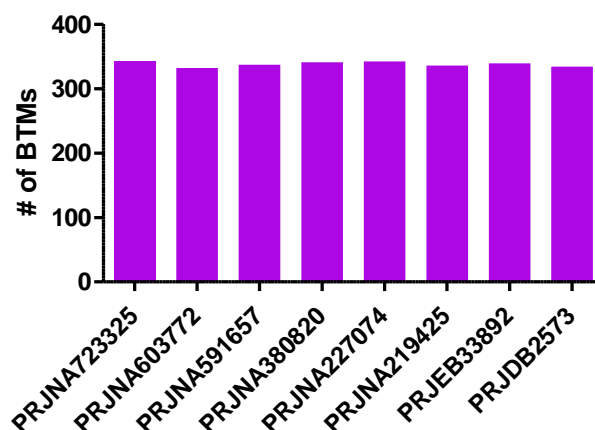


Legenda: A espessura das fitas é proporcional ao número de genes compartilhados entre dois conjuntos de dados diferentes.

5.2 Reduzindo a dimensão de matrizes de expressão gênica de humanos para BTMs

Para avaliar as associações entre as respostas transcricionais do hospedeiro humano e *P. falciparum*, nossa estratégia inicia-se com a redução da dimensão dos dados de forma a obter resultados que forneçam interpretação aprimorada. A redução dessa dimensão de dados consiste em transformar a informação contida na expressão de milhares de genes, ou seja, milhares de variáveis, em um número consideravelmente menor de variáveis, mas que contenham a mesma informação. Para tal, são empregadas estratégias de agrupamento de genes co expressos em módulos transcricionais gerados via integração computacional. Nós utilizamos a ferramenta de módulos transcricionais sanguíneos (BTMs), que foram gerados a partir da integração dos dados de 34.000 transcriptomas sanguíneos (LI *et al.*, 2014). Os BTMs são 346 módulos gênicos (redes de interação gênica) que refletem a atividade de células do sistema imune, incluindo neutrófilos, monócitos, células dendríticas, células NK, linfócitos B, linfócitos T, assim como diversos processos biológicos incluindo sinalização de citocinas, resposta antiviral, metabolismo, divisão celular entre outros. A redução dos dados em conjuntos individuais revelou que todos foram reduzidos a pelo menos 332 BTMs (Figura 6).

Figura 6 – Número de BTMs em conjuntos de dados individuais.

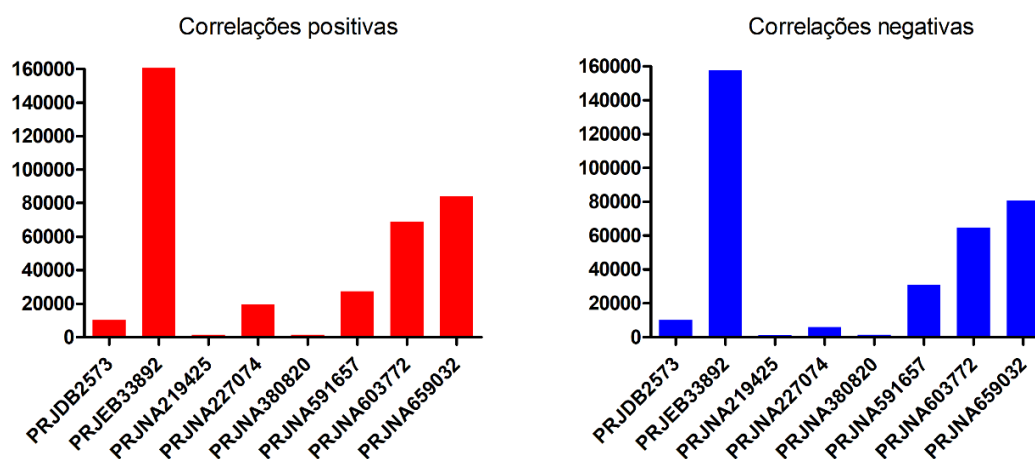


Legenda: Cada barra representa o número de BTMs resultantes para cada conjunto de dados analisados, com o menor número sendo 332 e o maior 346.

5.3 Identificação das associações entre BTMs e genes de *P. falciparum*

Após o processamento dos dados, nós iniciamos as análises para identificar quais genes de *P. falciparum* apresentam expressão correlacionada com a atividade de BTMs representando leucócitos e processos imunes e metabólicos. Através do método de Spearman e um limiar de $p < 0.001$, nós detectamos um mínimo de 1453 e um máximo de 160.762 correlações positivas e um mínimo de 1283 e máximo de 157.884 correlações negativas (Figura 7).

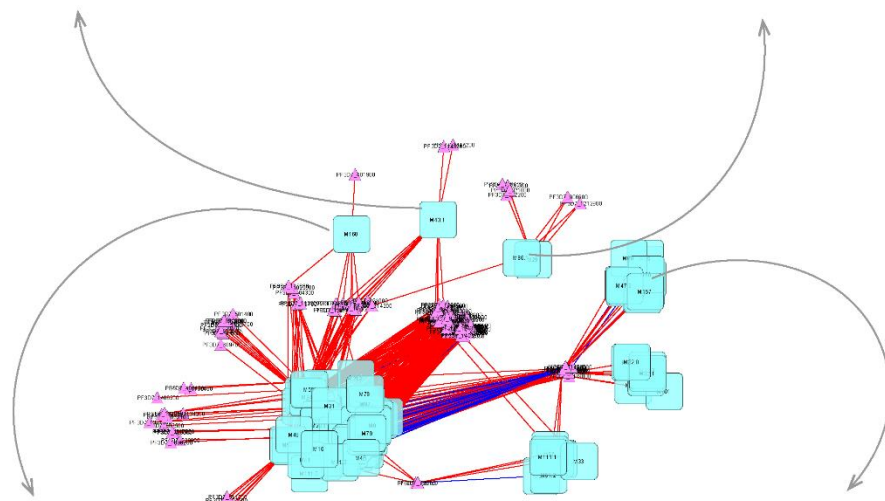
Figura 7 – Associações em conjuntos de dados individuais.



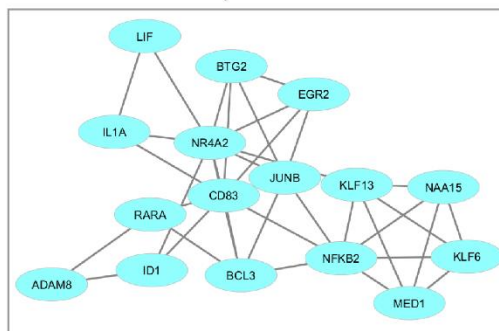
Legenda: Número de correlações entre BTMs e genes de *P. falciparum*. Os gráficos representam o número de correlações significativas ($p < 0.001$) entre a atividade de BTMs e a expressão de genes de *P. falciparum*. O gráfico à direita representa o número de correlações positivas e à esquerda representa o número de correlações negativas.

Figura 9 – Exemplos de BTMs significativos em nível gênico.

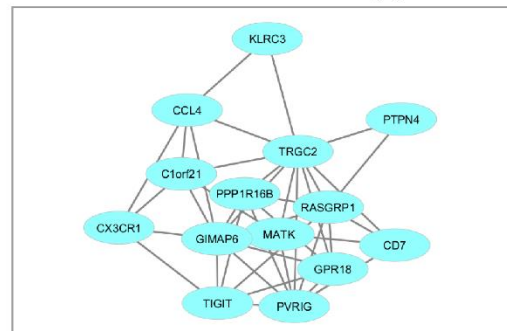
M43.1 - myeloid, dendritic cell activation via NfκB (II) M86.1 - proinflammatory dendritic cell, myeloid cell response



M160 - leukocyte differentiation



M157 - enriched in NK cells (III)

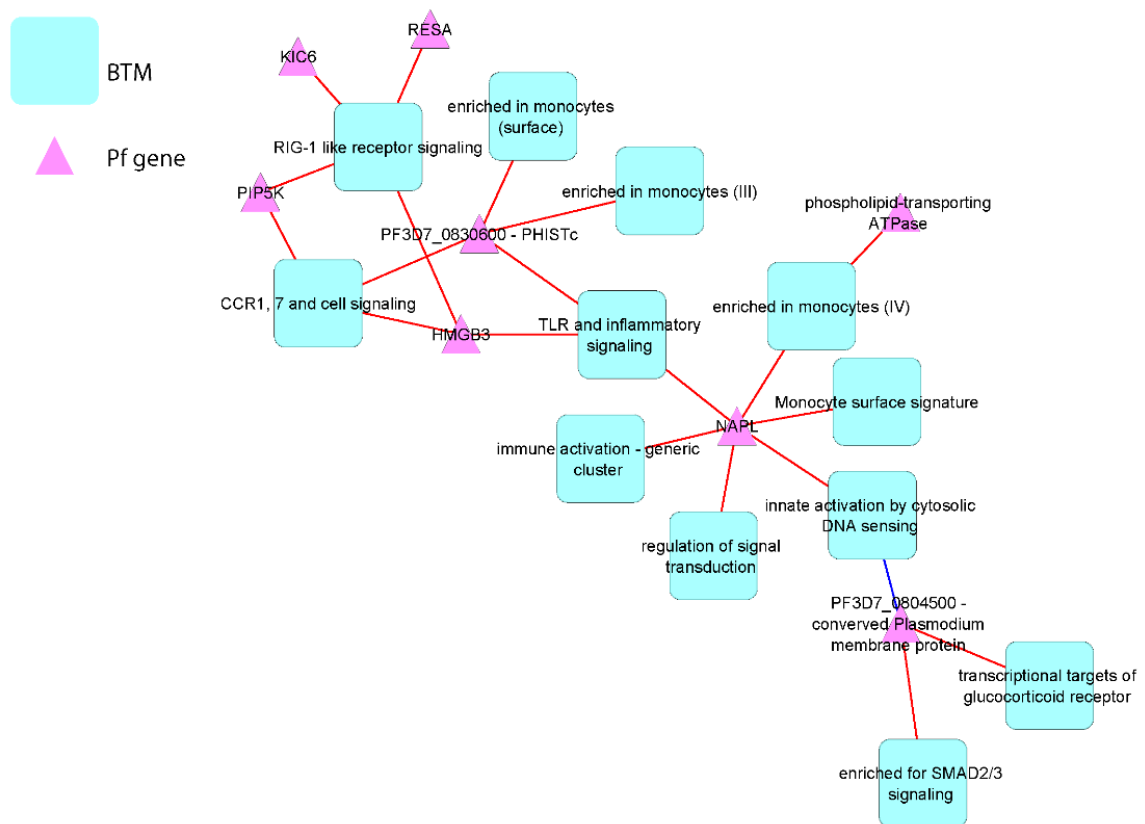


Legenda: É possível ampliar os vértices representando BTMs na rede de interação transcricional unificada, que demonstra redes de interação entre os genes do hospedeiro que refletem a ativação e resposta de células dendríticas e células mieloides (M43.1 e M86.1), assim como diferenciação de leucócitos (M160) e genes enriquecidos em células NK (M157).

Embora nossa rede de interação transcricional unificada pela presença das associações em 60% dos estudos tenha revelado diversas associações positivas e negativas, esta rede ainda apresenta muitas interações entre BTMs e genes de *P. falciparum* e dificulta a priorização de moléculas, por exemplo, para validações

experimentais. Desta forma, identificamos uma sub rede de interações transcricionais unificada selecionando apenas as associações presentes no máximo de conjuntos de dados, que foi de 75% (n = 6), a qual apresenta 20 vértices (12 BTMs e 8 genes de *P. falciparum*) conectados através de 20 associações positivas e 1 associação negativa (Figura 10). A tabela 2 traz informações sobre os nomes dos genes de *P. falciparum*, sua associação com BTMs e regulação da associação. Pode-se observar que o gene NAPL de *P. falciparum* teve o maior número de associações com BTMs refletindo a resposta de monócitos, TLR e sinalização inflamatória, assim como ativação inata por sensores citoplasmáticos de DNA. Este último módulo ainda apresentou a única associação negativa com o gene PF3D7_084500 (proteína de membrana conservada de *Plasmodium*).

Figura 10 – Sub rede de interação transcricional unificada entre *P. falciparum* e humanos.



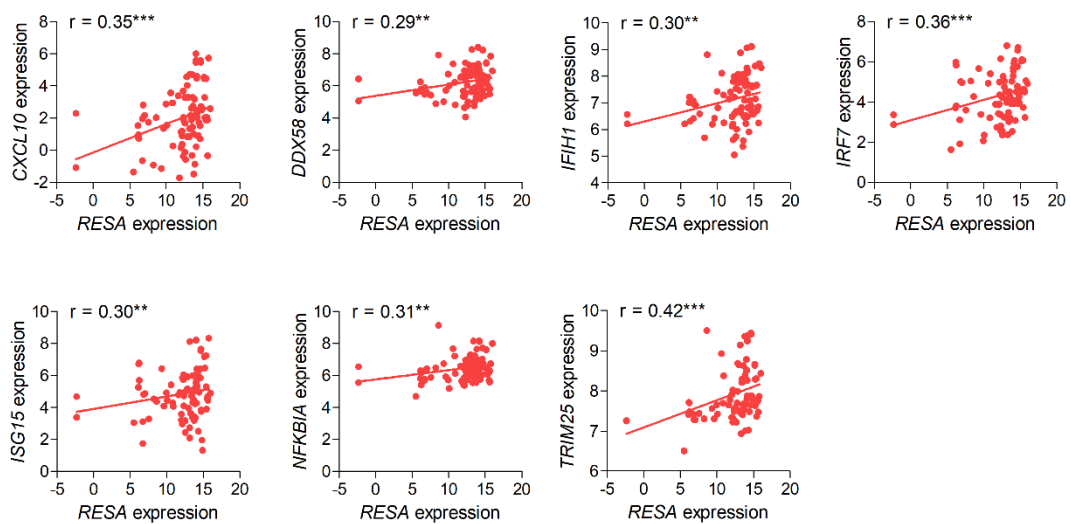
Legenda: Os vértices (nós) retangulares em cor azul piscina representam os BTMs e os triângulos em cor rosa representam os genes de *P. falciparum*. Esta rede apresenta apenas as interações significativas ($p < 0.001$) presentes em ao menos 75% (n = 6) dos conjuntos de dados avaliados. As arestas (conexões) vermelhas representam correlações positivas e arestas azuis representam correlações negativas.

Tabela 2 – Anotações de BTMs e genes de *P. falciparum* incluídos na sub rede de interação transcricional na figura 10

BTM	Anotação do BTM	Nome e símbolo do gene de Pf	Regulação
M68	RIG-1 like receptor signaling	ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA)	POS
M68	RIG-1 like receptor signaling	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K)	POS
M59	CCR1, 7 and cell signaling	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K)	POS
M118.0	enriched in monocytes (IV)	nucleosome assembly protein (NAPL)	POS
S4	Monocyte surface signature	nucleosome assembly protein (NAPL)	POS
M13	innate activation by cytosolic DNA sensing	nucleosome assembly protein (NAPL)	POS
M3	regulation of signal transduction	nucleosome assembly protein (NAPL)	POS
M37.0	immune activation - generic cluster	nucleosome assembly protein (NAPL)	POS
M68	RIG-1 like receptor signaling	high mobility group protein B3 (HMGB3)	POS
M59	CCR1, 7 and cell signaling	high mobility group protein B3 (HMGB3)	POS
M16	TLR and inflammatory signaling	high mobility group protein B3 (HMGB3)	POS
M118.0	enriched in monocytes (IV)	phospholipid-transporting ATPase (PF3D7_1223400)	POS
M68	RIG-1 like receptor signaling	protein KIC6 (KIC6)	POS
M13	innate activation by cytosolic DNA sensing	conserved <i>Plasmodium</i> membrane protein (PF3D7_0804500)	NEG
M74	transcriptional targets of (GR)	conserved <i>Plasmodium</i> membrane protein (PF3D7_0804500)	POS
M97	SMAD2/3 signaling	conserved <i>Plasmodium</i> membrane protein (PF3D7_0804500)	POS
M59	CCR1, 7 and cell signaling	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc) (PF3D7_0830600)	POS
M1118.1	enriched in monocytes (surface)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc) (PF3D7_0830600)	POS
M73	enriched in monocytes (III)	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc) (PF3D7_0830600)	POS
M16	TLR and inflammatory signaling	<i>Plasmodium</i> exported protein (PHISTc) (PF3D7_0830600)	POS

Nós selecionamos o conjunto de dados com o maior número de amostras (PRJNA227074) para avaliar correlações entre genes individuais que compõem BTMs e genes de *P. falciparum*. Nós avaliamos a correlação positiva entre os membros do módulo M68 (RIG-1 like receptor signaling) e o gene *RESA* (ring-infected erythrocyte surface antigen) de *P. falciparum*. De fato, observa-se que a expressão de *RESA* por *P. falciparum* foi significativamente correlacionada com a expressão de diversos genes que compõe o M68, incluindo *CXCL10*, *DDX58*, *IFIH1*, *IRF7*, *ISG15*, *NFKBIA* e *TRIM25* (Figura 11)

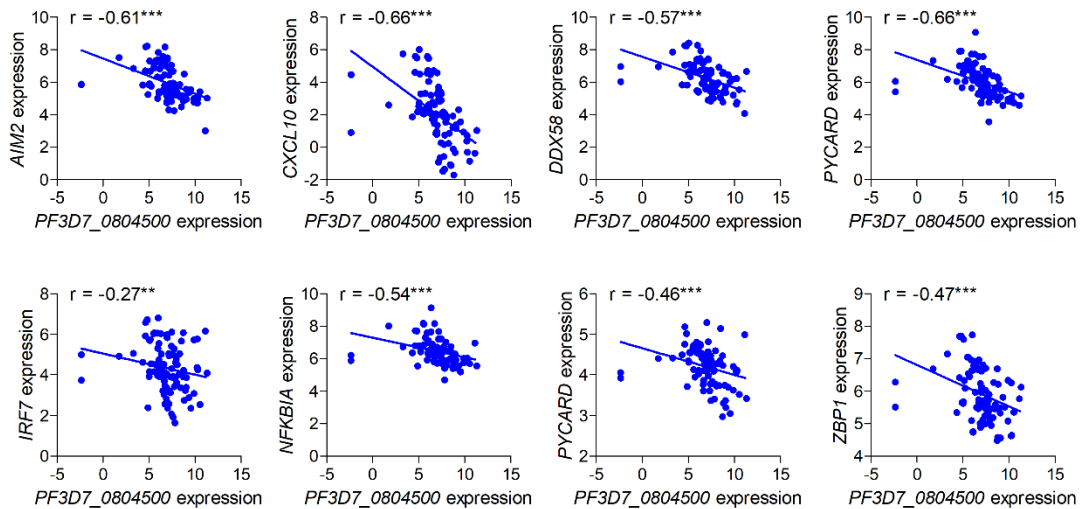
Figura 11 – Associações positivas entre genes do BTM M68 e o gene *RESA* de *P. falciparum*.



Legenda: As análises foram realizadas com o método de correlação de Spearman e r representa o coeficiente da correlação. A significância da correlação é mostrada como: $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$.

Também avaliamos as correlações negativas entre os genes do módulo M13 (innate activation by cytosolic DNA sensing) e o gene *PF3D7_0804500* (conserved *Plasmodium* membrane protein) de *P. falciparum*, cuja função ainda é desconhecida. Observa-se, portanto, que diversos genes que compõe o BTM M13 estão correlacionados negativamente com a expressão de *PF3D7_0804500* (Figura 12).

Figura 12 – Associações negativas entre genes do BTM M13 e o gene PF3D7_0804500 de *P. falciparum*.

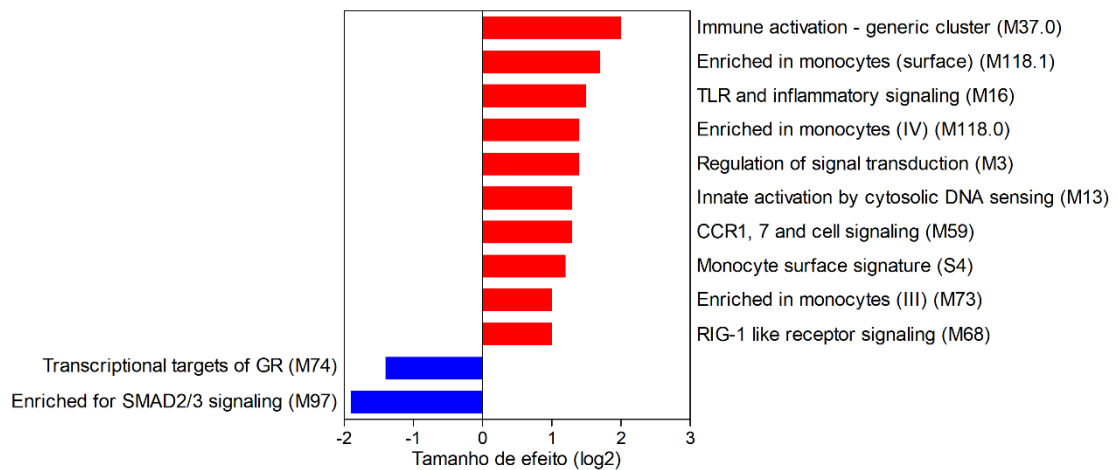


Legenda: As análises foram realizadas com o método de correlação de Spearman e r representa o coeficiente da correlação. A significância da correlação é mostrada como: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5.5 Regulação de BTMs associados a resposta transcricional de *P. falciparum*

Nossas descobertas demonstram que a expressão gênica de leucócitos de pacientes com malária apresenta associações significativas com a expressão gênica de *P. falciparum*, as quais são conservadas em diferentes coortes de pacientes, fornecendo evidências de potenciais interações parasito-hospedeiro desconhecidas até então. Apesar disso, estes dados não fornecem a informação sobre a regulação dos BTMs associados à resposta transcricional de *P. falciparum*. Para entendermos se esses módulos gênicos apresentam de fato papel importante na malária causada por *P. falciparum*, nós realizamos uma nova estratégia de meta-análise. Neste caso, nós buscamos dados de expressão gênica obtida por microarranjo de oligonucleotídeos ou RNA-seq de sangue total de pacientes com malária e controles saudáveis. Nós identificamos 11 conjuntos de dados contendo 477 amostras que foram processadas e transformadas em BTMs, e utilizadas em uma meta-análise com o pacote para R MetaIntegrator. Desta forma, nós identificamos que dentre os BTMs formando a sub rede de integração transcricional entre humanos e *P. falciparum*, todos foram significativos ($FDR < 0.01$), ou seja, estavam diferencialmente expressos quando comparados aos controles saudáveis. Dois dos BTMs foram regulados negativamente, enquanto o restante foi regulado positivamente (Figura 13).

Figura 13 – Regulação de BTMs significativos em pacientes com malária comparados a controles saudáveis.



Legenda: Meta-análise de dados de transcriptoma em coortes contendo pacientes com malária causada por *P. falciparum* comparados a controles saudáveis. Os BTMs em vermelho representam módulos regulados positivamente e azul os módulos regulados negativamente. O tamanho de efeito refere-se à diferença na expressão gênica entre pacientes com malária e controles saudáveis, calculado através do método de g de Hedeges.

Coletivamente, estes dados demonstram que a meta-análise baseada nas associações entre a resposta transcricional de humanos e *P. falciparum* resultou em redes de interação patógeno-hospedeiro que são conservadas e reprodutíveis entre diferentes coortes independentes.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, nós realizamos uma análise integrada de transcriptomas duplos de ambos *P. falciparum* e indivíduos com malária recrutados em coortes distintas. Nós identificamos interações parasito-hospedeiro em nível transcricional que são conservadas na maioria das amostras avaliadas. Estes resultados indicam, portanto, que estas associações não ocorrem ao acaso e sugerem que elas resultam das adaptações moleculares das células imunes do hospedeiro em resposta à infecção por *P. falciparum*, assim como do próprio parasito em resposta a defesa do hospedeiro.

Através de uma análise inicial para selecionar correlações conservadas em 60% dos conjuntos de dados, obtivemos uma rede de interação principal, composta por muitos vértices e arestas. A partir daí, observamos exemplos claros de células e processos do hospedeiro que são ativados durante a infecção por *Plasmodium*. Alguns destes exemplos incluem M43.1 e M86.1, os quais são relativos a células dendríticas e células mieloides, e compostos por genes como *CCL5*, *NFKB2*, *TNIP3*, *ICAM1*, *IL23A* (M43.1) ou *CYTSA*, *IL1B*, *PDE4B*, *ADORA2A*, *CCL20*, *TNF*, *IFNG* (M86.1). Outros exemplos incluem módulos relativos à diferenciação de leucócitos, M160 (*IL1A*, *NR4A2*, *JUNB*, *BCL3*) ou também a células NK, M157 (*KLRC3*, *CCLA*, *PTPN4*, *CX3CR1*, *CD7*). De fato, células dendríticas atuam na ativação da resposta adaptativa contra *Plasmodium*, ao passo que a diferenciação de leucócitos é essencial para promover a resposta contra a infecção. Ainda, células NK possuem papel importante na proteção contra *P. falciparum*, pois promovem citotoxicidade de eritrócitos infectados diretamente, assim como de uma maneira dependente de anticorpo (MAVOUNGOU *et al.*, 2007; ORAGO; FACER, 2008).

De forma a priorizar as interações mais robustas, partimos da premissa de que as interações conservadas em um maior número de conjuntos de dados independentes indicam maior confiança na associação. Utilizando um limiar estatístico mais rigoroso (presença > 75% dos conjuntos de dados), nós identificamos uma sub rede de interação transcricional entre *P. falciparum* e humanos formada por poucos vértices e arestas que podem ser mais bem interpretados em relação ao seu potencial biológico. De maneira geral, observa-se uma rede formada principalmente por módulos associados a imunidade inata, incluindo vias de reconhecimento de padrões, como M68 (sinalização e reconhecimento por receptores do tipo RIG-1), M13 (ativação inata por sensores de

DNA), M16 (sinalização inflamatória por TLR), sinalização celular e quimiotaxia como M59 (sinalização celular por CCR1 e 7), assim como diversos módulos relativos a monócitos. Não ao acaso, monócitos são células cruciais durante a malária que apresentam grande capacidade de reconhecimento de patógenos através de TLR, e sensores de ácidos nucleicos, assim como expressam receptores de quimiocina como CCR1 (DOBBS; CRABTREE; DENT, 2020; KAUFMANN *et al.*, 2001). Ainda, outras vias regulatórias, como M74 (alvos transcripcionais do receptor de glicocorticoide) e M97 (sinalização por SMAD2/3) que podem ser ativadas para regulação de vias inflamatórias em monócitos. Estes dados sugerem que as interações identificadas por nossa estratégia de análise ocorrem principalmente entre células vermelhas infectadas por *P. falciparum* e monócitos.

Detalhando alguns módulos e suas interações, observa-se que M68 é caracterizado pela sinalização e reconhecimento por receptores do tipo RIG-1, os quais pertencem a uma família de receptores de padrões citoplasmáticos importantes na detecção de RNA e indução de interferons do tipo I (IFN-I) e citocinas inflamatórias (KAWAI; AKIRA, 2008). O módulo em questão, apresentou associações significativas com 4 genes do parasito, o primeiro deles é o *PF3D7_0102200*, gene codificante da proteína RESA. Esta proteína é secretada no citoplasma e migra até a membrana do eritrócito infectado, reduzindo a deformidade como forma de evadir a resposta imune do hospedeiro (MILLS *et al.*, 2007). O segundo gene associado ao M68 é o *PF3D7_0110600* (PIP5K), gene codificante de proteínas associadas a sobrevivência do parasita, as quais possuem papel essencial na invasão celular e no tráfico de proteínas para a superfície de eritrócitos infectados, além de atuar no processo de exflagelação (LEBER *et al.*, 2009). Há interação também com gene *PF3D7_1205800* (HMGB3), a qual pertence a uma família de proteínas nucleares com atividade de ligação ao DNA, assim como promovem respostas inflamatórias por macrófagos (KUMAR *et al.*, 2008). Por último, há também interação com o gene *PF3D7_0609700* (KIC6), codificante de proteínas que em conjunto com genes homólogos (como KIC5 e CHD1) está relacionada a processos de reparo de DNA (SIMMONS *et al.*, 2023). Estas duas últimas proteínas de *P. falciparum*, HMGB3 e KIC6

atuam no núcleo das células e poderiam ser carreadores de ácidos nucleicos para o interior de fagócitos, ativando vias como sinalização por receptores do tipo RIG-1.

A expressão de HMGB3 de *P. falciparum* também foi correlacionada positivamente com M16 (sinalização inflamatória por TLR). É interessante que HMGB1 endógeno de células humanas é uma alarmina, que tem papel crítico em sinalizar dano celular através da sinalização de TLR4 e 2, sendo considerado um DAMP (YU *et al.*, 2006). Ainda, existem várias evidências na literatura que HMGB3 funcione ativando TLR como DAMPs em outros organismos não modelos, incluindo *Apostichopus japonicus* (pepinho do mar) (LV *et al.*, 2017) ou mesmo plantas (CHOI *et al.*, 2016). Baseado em nossos dados, assim como esses estudos na literatura, nós formulamos a hipótese de que HMGB3 de *P. falciparum* pode ser um PAMP reconhecido TLRs em monócitos e outras células da imunidade inata.

O BTM M59 engloba genes relacionados a receptores de quimiocinas do CCR1 e CCR7, o primeiro codifica um membro da família de receptores de quimiocinas beta, que se prevê ser uma proteína de sete transmembranas semelhante aos receptores acoplados à proteína G. Os ligantes deste receptor incluem a proteína 1 alfa inflamatória de macrófagos (MIP-1 alfa), regulada na ativação da proteína T normal expressa e secretada (RANTES), proteína quimioatraente de monócitos 3 (MCP-3) e fator inibitório progenitor mielóide-1 (MPL -1) (LI *et al.*, 2022). Já o segundo é expresso em vários tecidos linfoides e ativa os linfócitos B e T, além de controlar a migração de células T de memória para tecidos inflamados, bem como estimular a maturação das células dendríticas (SAKAMOTO *et al.*, 2022). O BTM está associado aos genes já citados anteriormente, PIP5K e HMGB3 referentes à proliferação e invasão celular, e ao gene *PF3D7_0830600* (PHISTc) que apesar de não apresentar função descrita, são altamente expressas durante a esquizogonia e em parasitas em estágio de anel. Moléculas desta família estão localizadas na superfície de eritrócitos infectados e são relacionadas ao tráfico e comunicação intercelular, além da associação com o citoesqueleto hospedeiro (NEVEU; LAVAZEC, 2019). O gene *PF3D7_0830600* (PHISTc) também foi associado ao M16 (sinalização inflamatória por TLR) e outros módulos relacionados a monócitos. Estes dados sugerem que a proteína codificada por este gene também é reconhecida por PRRs

em monócitos, ativando vias inflamatórias como sinalização por TLR, assim como aumentando a sinalização por quimiocinas via receptores como CCR1.

O gene *PF3D7_1203700* (NAPL) do parasito está relacionado à formação de nucleossomos, é responsável por deposição de histonas e formação de cromatina (NAVADGI *et al.*, 2006) e faz múltiplas associações com BTMs humanos. Por exemplo, o BTM M3 está relacionado à regulação da transdução de sinais intracelulares, e na malária aplica-se por ser um dos principais mecanismos de controle do desenvolvimento do parasito, já que o *Plasmodium* é capaz de reconhecer sinais do hospedeiro e modular sua função através de receptores de membrana e maquinaria celular (GARCIA *et al.*, 2008; LEE; YAFFE, 2016). Este gene também foi associado a sinalização por TLR, ativação da imune genérica, regulação da transdução de sinal, assim como monócitos e ativação inata por sensores de DNA.

É intrigante o fato de que o gene *PF3D7_0804500* (proteína conservada de *Plasmodium*), cuja função é desconhecida, apresentou correlações negativas com o M13, que está relacionado à detecção inata de DNA exógeno por sensores de DNA citosólicos (CDSs), os quais desencadeiam a produção de interferons tipo I (IFNs) e a induzem genes responsivos a IFN e quimiocinas pró-inflamatórias (STETSON; MEDZHITOV, 2006). Ainda, este gene apresentou associações positivas com M97, que está relacionado à expressão de SMAD2 e SMAD3, genes os quais estão envolvidos na sinalização por fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) e podem ser reguladores da inflamação em infecções por *Plasmodium* (ADALID-PERALTA *et al.*, 2011). O gene *PF3D7_0804500* também foi associado ao BTM M74, composto por alvos transcricionais de receptores de glicocorticoides que podem estar presentes em vários tipos de células, e nesse contexto pode-se considerar que suprimem eficientemente a indução de citocinas pró-inflamatórias (OGAWA *et al.*, 2006). Em conjunto, estes dados sugerem que *PF3D7_0804500* pode codificar uma molécula imunomoduladora, promovendo respostas regulatórias induzidas por glicocorticoides e TGF- β para reprimir a ativação de vias de imunidade inata induzidas devido ao reconhecimento por sensores de DNA citosólicos.

Nosso estudo inclui diversas limitações que se iniciam pela disponibilidade de dados nos repositórios públicos. Nossa expectativa é de que com o aumento do volume de dados com o tempo, nossos dados apresentados serão validados em outras coortes independentes. Ainda, diferenças críticas no ciclo do parasita entre os pacientes de

diferentes coortes, que são refletidas nos dados de expressão gênica, sugere que existem muitas outras conexões que não foram identificadas e que podem ser importantes. Ainda, a natureza das associações identificadas é estatística e associativa, e não é possível determinar se o que vemos é efeito direto ou indireto das interações entre parasito-hospedeiro, o que nos fornecendo base apenas para formular hipóteses. Nossa expectativa, portanto, é de que as hipóteses de alta qualidade formuladas a partir de análises não-enviesadas sejam base para futuros estudos experimentais sobre a interação *P. falciparum* e humanos.

7. CONCLUSÕES

Neste estudo, realizamos uma meta-análise das associações entre a expressão gênica de indivíduos com malária e a expressão gênica de *P. falciparum* que resultou em uma rede de interação transcricional entre vários genes do parasito e módulos transcricionais sanguíneos que refletem a atividade de células e processos da resposta imune. Ainda, identificamos uma sub rede robusta que sugere associações de *P. falciparum* com monócitos e vias da imunidade inata. Estas interações fornecem embasamento para formulação de hipóteses de alta qualidade que podem ser testadas experimentalmente para identificar, por exemplo, PAMPs de *P. falciparum* que ativam vias da imunidade inata.

8. REFERÊNCIAS

ADALID-PERALTA, L.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; SCIUTTO, E. Mechanisms Underlying the Induction of Regulatory T Cells and Its Relevance in the Adaptive Immune Response in Parasitic Infections. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1412–1426, 2011.

ADEREM, A.; ADKINS, J. N.; ANSONG, C.; GALAGAN, J.; KAISER, S.; KORTH, M. J.; LAW, G. L.; MCDERMOTT, J. G.; PROLL, S. C.; ROSENBERGER, C.; SCHOOLNIK, G.; KATZE, M. G. A Systems Biology Approach to Infectious Disease Research: Innovating the Pathogen-Host Research Paradigm. **mBio**, v. 2, n. 1, p. e00325-10, mar. 2011.

BAIRD, J. K. Malaria Zoonoses. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 5, p. 269–277, set. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde.

BRUCE-CHWATT, L. J.; WERNSDORFER, W. H.; MCGREGOR, I. A. History of malaria from prehistory to eradication. Em: 1988, [...]. 1988.

BUCŞAN, A. N.; WILLIAMSON, K. C. Setting the Stage: The Initial Immune Response to Blood-Stage Parasites. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 88–103, dez. 2020.

CARLOS, B. C.; RONA, L. D. P.; CHRISTOPHIDES, G. K.; SOUZA-NETO, J. A. A Comprehensive Analysis of Malaria Transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, 2 jan. 2019.

CHEN, S.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; GU, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, 1 set. 2018.

CHOI, H. W.; MANOHAR, M.; MANOSALVA, P.; TIAN, M.; MOREAU, M.; KLESSIG, D. F. Activation of Plant Innate Immunity by Extracellular High Mobility Group Box 3 and Its Inhibition by Salicylic Acid. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. e1005518, 23 mar. 2016.

COURA, J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A New Challenge for Malaria Control in Brazil: Asymptomatic *Plasmodium* Infection - a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 229–237, maio 2006.

DOBAÑO, C., UBILLOS, I., JAIROCE, C. ET AL. RTS,S/AS01E immunization increases antibody responses to vaccine-unrelated *Plasmodium falciparum* antigens associated with protection against clinical malaria in African children: a case-control study. v. 157, n. 17, p. 19, 14 ago. 2019.

DOBBS, K. R.; CRABTREE, J. N.; DENT, A. E. Innate Immunity to Malaria—The Role of Monocytes. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 8–24, jan. 2020.

- DUDLEY, J. T.; DESHPANDE, T.; BUTTE, A. J. Exploiting Drug-Disease Relationships for Computational Drug Repositioning. **Briefings in Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 303–311, 1 jul. 2011.
- GARCIA, C. R. S.; DE AZEVEDO, M. F.; WUNDERLICH, G.; BUDU, A.; YOUNG, J. A.; BANNISTER, L. *Plasmodium* in the Postgenomic Era: New Insights into the Molecular Cell Biology of Malaria Parasites. *Em: International Review of Cell and Molecular Biology*. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 85–156.
- GOMES, E.; ROGERIO, L. A.; TAKAMIYA, N. T.; TORRES, C.; DA SILVA, J. S.; ALMEIDA, R. P.; MARUYAMA, S. R. Dataset of Dual RNA-Seq Mapping in Visceral Leishmaniasis: Inquiry on Parasite Transcripts in Human Blood Transcriptome upon *Leishmania Infantum* Infection. **Data in Brief**, v. 46, p. 108811, fev. 2023.
- GRIESENAUER, B.; TRAN, T. M.; FORTNEY, K. R.; JANOWICZ, D. M.; JOHNSON, P.; GAO, H.; BARNES, S.; WILSON, L. S.; LIU, Y.; SPINOLA, S. M. Determination of an Interaction Network between an Extracellular Bacterial Pathogen and the Human Host. **mBio**, v. 10, n. 3, p. e01193-19, 25 jun. 2019.
- IMAI, T.; ISHIDA, H.; SUZUE, K.; TANIGUCHI, T.; OKADA, H.; SHIMOKAWA, C.; HISAEDA, H. Cytotoxic Activities of CD8⁺ T Cells Collaborate with Macrophages to Protect against Blood-Stage Murine Malaria. **eLife**, v. 4, p. e04232, 11 mar. 2015.
- KALANTARI, P.; DEOLIVEIRA, R. B.; CHAN, J.; CORBETT, Y.; RATHINAM, V.; STUTZ, A.; LATZ, E.; GAZZINELLI, R. T.; GOLENBOCK, D. T.; FITZGERALD, K. A. Dual Engagement of the NLRP3 and AIM2 Inflammasomes by *Plasmodium*-Derived Hemozoin and DNA during Malaria. **Cell Reports**, v. 6, n. 1, p. 196–210, jan. 2014.
- KAUFMANN, A.; SALENTIN, R.; GEMSA, D.; SPRENGER, H. Increase of CCR1 and CCR5 Expression and Enhanced Functional Response to MIP-1 α during Differentiation of Human Monocytes to Macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 2, p. 248–252, 1 fev. 2001.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, n. 1, p. 1–20, nov. 2008.
- KUMAR, K.; SINGAL, A.; RIZVI, M. M. A.; CHAUHAN, V. S. High Mobility Group Box (HMGB) Proteins of *Plasmodium Falciparum*: DNA Binding Proteins with pro-Inflammatory Activity. **Parasitology International**, v. 57, n. 2, p. 150–157, jun. 2008.
- LANGFELDER, P.; HORVATH, S. WGCNA: An R Package for Weighted Correlation Network Analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 559, dez. 2008.
- LEBER, W.; SKIPPEN, A.; FIVELMAN, Q. L.; BOWYER, P. W.; COCKCROFT, S.; BAKER, D. A. A Unique Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Is Activated by ADP-Ribosylation Factor in *Plasmodium Falciparum*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 6, p. 645–653, maio 2009.
- LEE, H. J.; GEORGIADOU, A.; OTTO, T. D.; LEVIN, M.; COIN, L. J.; CONWAY, D. J.; CUNNINGTON, A. J. Transcriptomic Studies of Malaria: A Paradigm for Investigation of Systemic Host-Pathogen Interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 2, p. e00071-17, jun. 2018a.

LEE, H. J.; GEORGIADOU, A.; WALTHER, M.; NWAKANMA, D.; STEWART, L. B.; LEVIN, M.; OTTO, T. D.; CONWAY, D. J.; COIN, L. J.; CUNNINGTON, A. J. Integrated Pathogen Load and Dual Transcriptome Analysis of Systemic Host-Pathogen Interactions in Severe Malaria. **SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE**, p. 16, 2018b.

LEE, M. J.; YAFFE, M. B. Protein Regulation in Signal Transduction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 6, p. a005918, jun. 2016.

LI, J.; XUE, L.; WANG, J.; MENG, A.; QIAO, J.; LI, M.; WANG, X.; MENG, L.; NING, J.; GAO, X.; LI, W.; MA, C.; WEI, L. Activation of the Chemokine Receptor CCR1 and Preferential Recruitment of Gai Suppress RSV Replication: Implications for Developing Novel Respiratory Syncytial Virus Treatment Strategies. **Journal of Virology**, v. 96, n. 22, p. e01309-22, 23 nov. 2022.

LI, S.; ROUPHAEL, N.; DURAISINGHAM, S.; ROMERO-STEINER, S.; PRESNELL, S.; DAVIS, C.; SCHMIDT, D. S.; JOHNSON, S. E.; MILTON, A.; RAJAM, G.; KASTURI, S.; CARLONE, G. M.; QUINN, C.; CHAUSSABEL, D.; PALUCKA, A. K.; MULLIGAN, M. J.; AHMED, R.; STEPHENS, D. S.; NAKAYA, H. I.; PULENDRAN, B. Molecular Signatures of Antibody Responses Derived from a Systems Biology Study of Five Human Vaccines. **Nature Immunology**, v. 15, n. 2, p. 195–204, fev. 2014.

LIEHL, P.; ZUZARTE-LUÍS, V.; CHAN, J.; ZILLINGER, T.; BAPTISTA, F.; CARAPAU, D.; KONERT, M.; HANSON, K. K.; CARRET, C.; LASSNIG, C.; MÜLLER, M.; KALINKE, U.; SAEED, M.; CHORA, A. F.; GOLENBOCK, D. T.; STROBL, B.; PRUDÊNCIO, M.; COELHO, L. P.; KAPPE, S. H.; SUPERTI-FURGA, G.; PICHLMAIR, A.; VIGÁRIO, A. M.; RICE, C. M.; FITZGERALD, K. A.; BARCHET, W.; MOTA, M. M. Host-Cell Sensors for *Plasmodium* Activate Innate Immunity against Liver-Stage Infection. **Nature Medicine**, v. 20, n. 1, p. 47–53, jan. 2014.

LIMA-JUNIOR, J. da C.; PRATT-RICCIO, L. R. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on *Plasmodium Vivax* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 27 jan. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00013/abstract>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

LV, Z.; ZHANG, Z.; WEI, Z.; LI, C.; SHAO, Y.; ZHANG, W.; ZHAO, X.; XIONG, J. HMGB3 Modulates ROS Production via Activating TLR Cascade in *Apostichopus Japonicus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 77, p. 128–137, dez. 2017.

MAVOUNGOU, E.; HELD, J.; MEWONO, L.; KREMSNER, P. G. A Duffy Binding-Like Domain Is Involved in the NKp30-Mediated Recognition of *Plasmodium Falciparum* –Parasitized Erythrocytes by Natural Killer Cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 10, p. 1521–1531, 15 maio 2007.

MENDES, A. M.; LEITE, M. S.; LANGDON, E. J.; GRISOTTI, M. O desafio da atenção primária na saúde indígena no Brasil. **Revista Panamericana de Salud**

Pública, v. 42, 2018. Disponível em:

<<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49563>>. Acesso em: 17 abr. 2023.

MILLS, J. P.; DIEZ-SILVA, M.; QUINN, D. J.; DAO, M.; LANG, M. J.; TAN, K. S. W.; LIM, C. T.; MILON, G.; DAVID, P. H.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BONNEFOY, S.; SURESH, S. Effect of Plasmodial RESA Protein on Deformability of Human Red Blood Cells Harboring *Plasmodium Falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9213–9217, 29 maio 2007.

MILNER, D. A. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. a025569, jan. 2018.

MOORMANN, A. M.; NIXON, C. E.; FORCONI, C. S. Immune Effector Mechanisms in Malaria: An Update Focusing on Human Immunity. **Parasite Immunology**, v. 41, n. 8, ago. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pim.12628>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

MUKHERJEE, P.; BURGIO, G.; HEITLINGER, E. Dual RNA Sequencing Meta-Analysis in *Plasmodium* Infection Identifies Host-Parasite Interactions. **mSystems**, v. 6, n. 2, p. e00182-21, 27 abr. 2021.

NATAMA, H. M.; MONCUNILL, G.; ROVIRA-VALLBONA, E.; SANZ, H.; SORGHO, H.; AGUILAR, R.; COULIBALY-TRAORÉ, M.; SOMÉ, M. A.; SCOTT, S.; VALÉA, I.; MENS, P. F.; SCHALLIG, H. D. F. H.; KESTENS, L.; TINTO, H.; DOBAÑO, C.; ROSANAS-URGELL, A. Modulation of Innate Immune Responses at Birth by Prenatal Malaria Exposure and Association with Malaria Risk during the First Year of Life. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, p. 198, dez. 2018.

NAVADGI, V. M.; CHANDRA, B. R.; MISHRA, P. C.; SHARMA, A. The Two *Plasmodium Falciparum* Nucleosome Assembly Proteins Play Distinct Roles in Histone Transport and Chromatin Assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 16978–16984, jun. 2006.

NEVEU, G.; LAVAZEC, C. Erythrocyte Membrane Makeover by *Plasmodium Falciparum* Gametocytes. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2652, 8 nov. 2019.

OGAWA, S.; LOZACH, J.; BENNER, C.; PASCUAL, G.; WESTIN, S.; HOFFMANN, A.; SUBRAMANIAM, S.; ROSENFELD, M. G.; GLASS, C. K. Molecular Determinants of Crosstalk between Nuclear Receptors and Toll-like Receptors Mediating Counter-Regulation of Inflammatory Responses. 2006.

ORAGO, A. S. S.; FACER, C. A. Cytotoxicity of Human Natural Killer (NK) Cell Subsets for *Plasmodium Falciparum* Erythrocytic Schizonts: Stimulation by Cytokines and Inhibition by Neomycin. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 86, n. 1, p. 22–29, 28 jun. 2008.

POSSEMIERS, H.; VANDERMOSTEN, L.; VAN DEN STEEN, P. E. Etiology of Lactic Acidosis in Malaria. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1009122, 7 jan. 2021.

REAL, E.; HOWICK, V. M.; DAHALAN, F. A.; WITMER, K.; CUDINI, J.; ANDRADI-BROWN, C.; BLIGHT, J.; DAVIDSON, M. S.; DOGGA, S. K.; REID, A. J.; BAUM, J.; LAWNICZAK, M. K. N. A Single-Cell Atlas of *Plasmodium Falciparum*

Transmission through the Mosquito. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 3196, dez. 2021.

RECHT, J.; SIQUEIRA, A. M.; MONTEIRO, W. M.; HERRERA, S. M.; HERRERA, S.; LACERDA, M. V. G. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current Challenges in Malaria Control and Elimination. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 273, dez. 2017.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.

SAKAMOTO, Y.; ISHIDA, T.; MASAKI, A.; MURASE, T.; OHTSUKA, E.; TAKESHITA, M.; MUTO, R.; IWASAKI, H.; ITO, A.; KUSUMOTO, S.; NAKANO, N.; TOKUNAGA, M.; YONEKURA, K.; TASHIRO, Y.; IIDA, S.; UTSUNOMIYA, A.; UEDA, R.; INAGAKI, H. CCR7 alterations associated with inferior outcome of adult T-cell leukemia/lymphoma under mogamulizumab treatment. **Hematological Oncology**, v. 40, n. 5, p. 876–884, 2022.

SAKURAGI, S.; LIAO, H.; YAJIMA, K.; FUJIWARA, S.; NAKAMURA, H. Rubella Virus Triggers Type I Interferon Antiviral Response in Cultured Human Neural Cells: Involvement in the Control of Viral Gene Expression and Infectious Progeny Production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9799, 29 ago. 2022.

SEGAL, E.; FRIEDMAN, N.; KAMINSKI, N.; REGEV, A.; KOLLER, D. From Signatures to Models: Understanding Cancer Using Microarrays. **Nature Genetics**, v. 37, n. S6, p. S38–S45, jun. 2005.

SIMMONS, C. F.; GIBBONS, J.; ZHANG, M.; OBERSTALLER, J.; PIRES, C. V.; CASANDRA, D.; WANG, C.; SEYFANG, A.; OTTO, T. D.; RAYNER, J. C.; ADAMS, J. H. Protein KIC5 Is a Novel Regulator of Artemisinin Stress Response in the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 399, 9 jan. 2023.

SIQUEIRA, A.; MARCHESINI, P.; TORRES, R. M.; RODOVALHO, S.; CHAVES, T. Malária na atenção básica. [s.d.]

SMITH, M. L.; STYCZYNSKI, M. P. Systems Biology-Based Investigation of Host–*Plasmodium* Interactions. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 7, p. 617–632, jul. 2018.

STETSON, D. B.; MEDZHITOV, R. Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 93–103, jan. 2006.

SWEENEY, T. E.; SHIDHAM, A.; WONG, H. R.; KHATRI, P. A Comprehensive Time-Course–Based Multicohort Analysis of Sepsis and Sterile Inflammation Reveals a Robust Diagnostic Gene Set. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 287, 13 maio 2015. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aaa5993>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

- TORO-MORENO, M.; SYLVESTER, K.; SRIVASTAVA, T.; POSFAI, D.; DERBYSHIRE, E. R. RNA-Seq Analysis Illuminates the Early Stages of *Plasmodium* Liver Infection. **mBio**, v. 11, n. 1, p. e03234-19, 25 fev. 2020.
- TSALIK, E. L.; HENAO, R.; NICHOLS, M.; BURKE, T.; KO, E. R.; MCCLAIN, M. T.; HUDSON, L. L.; MAZUR, A.; FREEMAN, D. H.; VELDMAN, T.; LANGLEY, R. J.; QUACKENBUSH, E. B.; GLICKMAN, S. W.; CAIRNS, C. B.; JAEHNE, A. K.; RIVERS, E. P.; OTERO, R. M.; ZAAS, A. K.; KINGSMORE, S. F.; LUCAS, J.; FOWLER, V. G.; CARIN, L.; GINSBURG, G. S.; WOODS, C. W. Host Gene Expression Classifiers Diagnose Acute Respiratory Illness Etiology. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 322, 20 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aad6873>>. Acesso em: 15 abr. 2022.
- USUI, M.; WILLIAMSON, K. C. Stressed Out About *Plasmodium Falciparum* Gametocytogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 790067, 2 dez. 2021.
- WESTERMANN, A. J.; VOGEL, J. Host-Pathogen Transcriptomics by Dual RNA-Seq. *Em: ARLUISON, V.; VALVERDE, C. Bacterial Regulatory RNA. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2018. p. 59–75.*
- WHO Guidelines for malaria.** World Health Organization, 13 jul. 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidance framework for testing genetically modified mosquitoes.** Geneva: World Health Organization, 2021.
- WYSE, A. P. P.; BEVILACQUA, L.; RAFIKOV, M. Modelo Matemático Sazonal para Malária. **TEMA - Tendências em Matemática Aplicada e Computacional**, v. 7, n. 2, p. 391–400, 29 ago. 2006.
- YALCINDAG, E.; ELGUERO, E.; ARNATHAU, C.; DURAND, P.; AKIANA, J.; ANDERSON, T. J.; AUBOUY, A.; BALLOUX, F.; BESNARD, P.; BOGREAU, H.; CARNEVALE, P.; D’ALESSANDRO, U.; FONTENILLE, D.; GAMBOA, D.; JOMBART, T.; LE MIRE, J.; LEROY, E.; MAESTRE, A.; MAYXAY, M.; MÉNARD, D.; MUSSET, L.; NEWTON, P. N.; NKOGHÉ, D.; NOYA, O.; OLLOMO, B.; ROGIER, C.; VERON, V.; WIDE, A.; ZAKERI, S.; CARME, B.; LEGRAND, E.; CHEVILLON, C.; AYALA, F. J.; RENAUD, F.; PRUGNOLLE, F. Multiple Independent Introductions of *Plasmodium Falciparum* in South America. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 511–516, 10 jan. 2012.
- YAMAGISHI, J.; NATORI, A.; TOLBA, M. E. M.; MONGAN, A. E.; SUGIMOTO, C.; KATAYAMA, T.; KAWASHIMA, S.; MAKALOWSKI, W.; MAEDA, R.; ESHITA, Y.; TUDA, J.; SUZUKI, Y. Interactive Transcriptome Analysis of Malaria Patients and Infecting *Plasmodium Falciparum*. **Genome Research**, v. 24, n. 9, p. 1433–1444, set. 2014.
- YAMAUCHI, L. M.; COPPI, A.; SNOUNOU, G.; SINNIS, P. *Plasmodium* Sporozoites Trickle out of the Injection Site. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215–1222, maio 2007.

YANG, A. S. P.; O'NEILL, M. T.; JENNISON, C.; LOPATICKI, S.; ALLISON, C. C.; ARMISTEAD, J. S.; ERICKSON, S. M.; ROGERS, K. L.; ELLISDON, A. M.; WHISSTOCK, J. C.; TWEEDDELL, R. E.; DINGLASAN, R. R.; DOUGLAS, D. N.; KNETEMAN, N. M.; BODDEY, J. A. Cell Traversal Activity Is Important for *Plasmodium Falciparum* Liver Infection in Humanized Mice. **Cell Reports**, v. 18, n. 13, p. 3105–3116, mar. 2017.

YU, M.; WANG, H.; DING, A.; GOLENBOCK, D. T.; LATZ, E.; CZURA, C. J.; FENTON, M. J.; TRACEY, K. J.; YANG, H. HMGB1 SIGNALS THROUGH TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR) 4 AND TLR2. **Shock**, v. 26, n. 2, p. 174–179, ago. 2006.

ZHENG, H.; TAN, Z.; XU, W. Immune Evasion Strategies of Pre-Erythrocytic Malaria Parasites. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

ZYLA, J.; MARCZYK, M.; DOMASZEWSKA, T.; KAUFMANN, S. H. E.; POLANSKA, J.; WEINER, J. Gene Set Enrichment for Reproducible Science: Comparison of CERNO and Eight Other Algorithms. **Bioinformatics**, v. 35, n. 24, p. 5146–5154, 15 dez. 2019.