

**Maria de Fátima Carvalho Nogueira**

**Estudos de biologia da multiresistência a antimaláricos em  
*Plasmodium falciparum*: transportadores ABC e genes de  
resposta ao stress oxidativo**

**Universidade Nova de Lisboa**

**Lisboa  
2007**

**Maria de Fátima Carvalho Nogueira**

**Assistente de Investigação do Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
(UEI Malária)  
Universidade Nova de Lisboa**

**Estudos de biologia da multiresistência a antimaláricos em  
*Plasmodium falciparum*: transportadores ABC e genes de  
resposta ao stress oxidativo**

**Dissertação para obtenção do grau de Doutor  
Ramo das Ciências Biomédicas  
Especialidade Parasitologia**

**Universidade Nova de Lisboa**

**Lisboa  
2007**

À minha família, amigos e às populações de  
Angola, São Tomé e Príncipe e Tailândia



## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais LA (IHMT) e foi financiado pelos projectos "Busca de novos marcadores de resistência a antimaláricos" (PRAXIS/P/SAU/14070/98) e "RESMALSHIP – Development of a malaria resistance DNA chip as a public health tool for management of *Plasmodium falciparum* malaria drug resistance" (QLK2-CT-2002-01503). Para que a sua realização fosse possível, além das referidas entidades, foi fundamental poder contar com o apoio e colaboração de diversas pessoas, às quais quero aqui expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Virgílio do Rosário, Director da UEI Malária e membro do CMDT LA, Professor Catedrático do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela orientação deste trabalho bem como pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstrou no estabelecimento de colaborações com outras instituições de forma a tornar possível a realização de algumas fases deste trabalho.

Ao Doutor José Pedro Gil (agora no Instituto Karolinska, Suécia) pela ajuda técnica e científica, a qual foi fundamental para o início do presente trabalho de doutoramento.

À Doutora Dinora Lopes, pelo apoio pessoal, colaboração em especial no trabalho em equipa realizado na República Democrática de São Tomé e Príncipe e República de Angola e pela leitura e correcções deste documento.

Ao Professor Dr. Luís Bernardino e à Dra. Carla Benchimol do Hospital Pediátrico David Bernardino de Luanda e a toda a equipa do serviço de urgências daquele hospital, pelo apoio e disponibilidade demonstrados para o desenvolvimento das actividades na República de Angola.

Ao Professor Doutor Luís Varandas da UEI Clínica de Doenças Tropicais/CMDT-LA/IHMT, quem muito contribuiu para o desenvolvimento do trabalho de equipa realizado no Hospital Pediátrico David Bernardino de Luanda.

À Dra. Conceição Ferreira e aos técnicos do Centro Nacional de Endemias da República Democrática de São Tomé e Príncipe, todo o apoio dado durante o período de colheitas.

À Professora Doutora Sosdri Thaithong e Dra. Kanchana Rungsahirunrat, Universidade de Chulalongkorn, Bangkok, Tailândia, pelo envio de isolados de *P. falciparum* utilizados neste estudo.

Ao Professor Doutor José Bautista, Catedrático da Universidade Complutense de Madrid, pelo apoio científico e técnico e pela possibilidade de realizar parte deste trabalho no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular IV, da mesma Universidade.

Ao Professor Doutor Hans-Peter Beck pela oportunidade que me deu de realizar no seu laboratório parte deste trabalho no Molecular Parasitology and Molecular Epidemiology Department do Swiss Tropical Institute em Basileia.

Ao Professor Doutor Celso Cunha e Professor Doutor Pedro Cravo, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela disponibilidade enquanto elementos da comissão tutorial. Em especial ao Professor Doutor Celso Cunha pela ajuda técnica e científica.

À UEI de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses na pessoa da Professora Doutora Olga Matos pela disponibilização de equipamento fotográfico e de microscopia.

À Mestre Catarina Alves, pelo apoio pessoal, pela inestimável ajuda no processamento (PCR) de alguns isolados de *P. falciparum* e pela leitura e correções deste documento.

À equipa do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular IV, da Universidade Complutense de Madrid, em especial à Amália pelas produtivas discussões, ao António, ao Rafa, à Marta, à Maria (por me dispensar os seus tempos de PCR), à Azar e em especial à Susana pela paciência e disponibilidade com que sempre me ajudou no laboratório.

Ao Mattias, à Cornélia e à Diana, colegas do laboratório Molecular Parasitology and Molecular Epidemiology Department do Swiss Tropical Institute em Basileia, pelo apoio científico e pessoal.

Às amigas Luísa Lobo, Susana Ramos, Isabel Ferreira e Paula Figueiredo pelo apoio a nível de trabalho e amizade sempre demonstrado.

E a toda a equipa do CMDT LA, em especial à D. Encarnação Horta pelo excelente apoio técnico e à Celeste Figueiredo, pela antecipação e disponibilidade para me ajudar a resolver os problemas burocráticos insolúveis.

Ao meu Pai e Mãe, por me terem mandado procurar o significado das palavras no dicionário em vez de simplesmente mo dizerem. À Mila, Zeca, Xana, Manel, Lino, Miguel, Maria, Afonso e Zé quero agradecer a amizade, o apoio e o encorajamento nos bons e maus momentos.

A partir do conjunto de resultados, apresentados nesta dissertação, foram efectuadas apresentações em congressos e foram publicados ou estão em preparação os seguintes artigos científicos:

### **Artigos científicos**

Nogueira F, Gil, JP., do Rosário, VE. (2006) Efflux pumps of antimalarial-resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antibiotiques*. 8: 85 – 92.

Ferreira ID, Nogueira F, Borges ST, do Rosario VE, Cravo P. (2004) Is the expression of genes encoding enzymes of glutathione (GSH) metabolism involved in chloroquine resistance in *Plasmodium chabaudi* parasites? *Molecular & Biochemical Parasitology*. 136:43-50.

Lopes D, Nogueira F, Gil JP, Ferreira C, do Rosario VE, Cravo P. (2002) *pfprt* and *pfmdr1* mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe, West Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 96:831-4.

Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F, Seugorn A, Gil JP, do Rosario VE, Cravo P. (2002) Molecular characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria Journal*. 1:12 (doi:10.1186/1475-2875-1-12).

Nogueira F., Diez A., Radfar A., Pérez-Benavente S., do Rosario V.E. and Bautista J.M.. Dynamic transcriptional response to chloroquine in the antioxidant defense system across the intraerythrocytic cycle of sensitive and resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **em preparação**

### **Apresentações Oraís**

Nogueira, F., Lopes, D. *Métodos Laboratoriais de Avaliação da Susceptibilidade aos Antimaláricos. I Seminário de Terapêutica da Malária nos dos Países de Língua Portuguesa – CPLP. IHMT/CMDT; Lisboa, Portugal (Outubro 2006).*

Nogueira, F., do Rosário, V.R. *Laboratory Research Research and Field Data in Relation to Drug Resistance. 7th European Congress of Chemotherapy and Infection.* Florência, Italia (Outubro 2005).

Nogueira, F., do Rosário, V.R. *Aspectos gerais sobre resistência aos antimaláricos (Antimalarial drug resistance – overall view).* V **Simpósio NECF doenças Infecciosas. Núcleo de Estudantes de Ciências Farmacêuticas do Instituto Superior de Ciências da Saúde – Sul.** Lisboa, Portugal (Abril 2005).

Nogueira, F., Lopes, D., Gil, J.P., do Rosário, VE; Cravo, P. *Efflux pumps of antimalarial-resistant Plasmodium falciparum.* **6th European Congress of Chemotherapy and Infection ECC & RICAI 2004**, Paris, França (Dezembro 2004).

Nogueira, F., Lopes, D.; Gil, J.P.; Rosário, VE; & Cravo, P. *Putative MRP-like (Multidrug Resistance Protein) genes in Plasmodium falciparum.* **The Third MIM Pan-African Malaria Conference.** Arusha, Tanzânia (Novembro 2002).

## **Prémios**

**Segundo prémio para posters** no XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, II Encontro de Medicina tropical dos Países de Língua Portuguesa I Encontro da Sociedade Brasileira de Medicina de Viagem. Campos do Jordão, Brasil (Março 2007), com o Poster:

Nogueira, F., Pimentel, S., Figueiredo, P., Lopes, D., Benchimol, C., Varandas, L., do Rosário, V.E., Bernardino, L.. *Molecular epidemiology of antimalarial resistance in Luanda, Angola. Prevalence of Pfmdr1, pfcrt, pfdhfr, pfdhps and pfcytb mutations associated with drug resistance.*

**Prémio do Anuário do Hospital Dona Estefânia – Medicina.** 2006 com o trabalho:

Pimentel, S., Nogueira, F., Benchimol, C., Quinhentos, V., Bom, J., Varandas, L., do Rosário, V., Bernardino, L. *Detection of atovaquone-proguanil resistance conferring mutations in Plasmodium falciparum cytochrome b gene in Luanda, Angola.*



## Sumário

A malária causada por *Plasmodium falciparum* é, em conjunto com a tuberculose e o HIV/SIDA, a maior causa de mortalidade mundial entre as doenças infecciosas. Nas últimas décadas, o controlo e tratamento da malária têm sido bastante dificultados pelo surgimento e disseminação da resistência parasitária aos antimaláricos mais utilizados, nomeadamente às quinoleínas.

O parasita encontra-se em fase de elevada actividade metabólica, nos estadios sensíveis às quinoleínas, correspondente à degradação da hemoglobina no vacúolo digestivo, a qual gera ferriprotoporfirina IX (FP-IX) e espécies reactivas de Oxigénio (ROS). A destoxificação destes grupos é efectuada por enzimas de resposta ao stress oxidativo, como a superoxidodismutase e as enzimas dos sistemas dependentes da tiorredoxina e do glutatião (GSH). Os compostos resultantes são demasiado hidrofílicos para difundir através da membrana citoplasmática, necessitando de transportadores específicos da super-família de proteínas ABC. O facto de *P. falciparum* apresentar resistência a diferentes antimaláricos e a relação existente entre as proteínas ABC (nomeadamente das sub-famílias MDR/TAP e MRP/CFTR) e os fenótipos de multi-resistência, justificaram esta investigação.

No genoma de *P. falciparum* foram identificadas 18 novas ABCs e posicionadas em 8 sub-famílias.

A susceptibilidade *in vitro* de isolados de *P. falciparum* (recorrendo a testes O.M.S.), provenientes de São Tomé e Príncipe, Tailândia e Angola demonstrou resistência simultânea a mais de um fármaco e níveis distintos de susceptibilidade entre aquelas regiões. Ao efectuar um estudo de associação das alterações de sequência nos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* (identificadas no decorrer deste trabalho), os resultados demonstraram uma correlação positiva apenas na Tailândia, no respeitante à mefloquina, para os polimorfismos de *pfmrp1* (191Y e 347A) e para a presença de inserções/delecções nos codões 779 e 3591 em de *pfmrp2*. Usando PCR em tempo real e para os mesmos isolados, foi determinado o número de cópias dos transportadores ABC *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2*. Para os dois últimos apenas foi detectada uma cópia, mas para *pfmdr1* foi identificado aumento do número de cópias (mais de 2) associado a menor susceptibilidade ao mesmo fármaco, no mesmo País.

Em estudos de expressão dos genes codificantes de enzimas de resposta ao stress oxidativo (*pfFe-sod*, *pfj-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR* e *pf2-CysPx*) e de transportadores

ABC *pfmrp1* e *pfmrp2*, verificou-se que são regulados no ciclo de desenvolvimento e que o gene *pfgrpd* apresentou um padrão de regulação consistente com um gene *housekeeping*. Duma forma geral a amplitude de variação da expressão (no sentido da diferença entre máximo e mínimo) dos genes ao longo do ciclo intra-eritrocitário em 3D7 (clone sensível) é maior do que a observada em Dd2 (clone resistente).

O aumento da expressão dos genes codificantes de enzimas do sistema de destoxificação dependente do glutatião, parece ocorrer na fase inicial do desenvolvimento do parasita (estadio de anel e trofozoíto), antes dos genes codificantes de enzimas do sistema de destoxificação dependente da tioredoxina visível em fase posterior (esquizonte). O aumento da expressão do gene *pfmrp1*, coincidiu com a função biológica (por analogia) de transporte de xenobióticos atribuída às proteínas da sub-família ABCC. Pelo contrário, o padrão de expressão do gene *pfmrp2*, foi compatível com uma função de importação (de ex. glutatião). Este resultado é discutível.

Os perfis de expressão dos referidos 10 genes, indicam que a presença de CQ (dose IC50), altera significativamente a expressão no sentido do aumento de expressão (indução). Mais, a amplitude de variação de expressão dos genes é significativamente mais elevada no clone 3D7 (sensível) do que no Dd2 (resistente). Em geral não foi verificada diminuição (repressão) significativa da expressão dos genes em presença de CQ para as doses utilizadas (IC50). Os resultados dos estudos de estabilidade do mRNA, sugerem que o efeito de regulação da CQ se processa a nível transcripcional, e que a CQ não modifica a velocidade de degradação do mRNA destes genes.

## Abstract

Malaria, tuberculosis and AIDS are presently the most important infectious diseases worldwide. In malaria, this is related to the emergence and spread of multi-drug resistant strains of *Plasmodium falciparum*, namely to quinolines and has greatly complicated malaria control programs.

Quinoline-containing antimalarial drugs interfere with hemoglobin digestion in the blood stages of the parasite cycle. Digestion of hemoglobin in the food vacuole, produces high quantities of Ferriprotoporphyrin IX (FP-IX) and reactive Oxygen species (ROS) as toxic by-products. ROS and FP-IX that reaches parasite cytoplasm are detoxified by stress response enzymes like: superoxide dismutase and thioredoxin and glutathione (GSH) dependent detoxification systems.

Multidrug resistance associated proteins (ABC transporters) are fundamental cellular detoxifying factors supposed to transport a wide range of compounds across cell membranes either as GSH conjugates, GSSG or as co-transport accompanying GSH transposition.

The observations that some *P. falciparum* strains exhibit resistance to different antimalarials and taking under consideration the association of ABC proteins (namely MDR/TAP and MRP/CFTR sub-families) to multidrug resistant phenotypes in other biological systems justified this research.

We identified 18 new ABCs and positioned them in 8 different sub-families.

Drug susceptibility studies with isolates from São Tomé Príncipe, Angola and Thailand (using WHO assays) demonstrated presence of multidrug resistance in isolates as well different levels of susceptibility among the regions. Correlating sequence variation on *pfmrp1* e *pfmrp2* genes (identified in this work) data demonstrated positive association only in Thailand, concerning mefloquine and *pfmrp1* (191Y e 347A) as well as *pfmrp2* concerning tandem repeats in condoms 779 e 3591. Gene copy numbers of *pfmdr1*, *pfmrp1* and *pfmrp2* were analysed by Real-time PCR, for the referred isolates. For the later two only one copy of the gene was detected, while for *pfmdr1* a positive correlation was detected between altered copy number (more than 2) and resistance to the same drug and country.

Oxidative stress response genes (*pfFe-sod*, *pfy-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR* e *pf2-CysPx*) and the ABC transporters *pfmrp1* e *pfmrp2*, are cell cycle regulated in *P. falciparum*. Only *pfg6pd* exhibit a housekeeping gene consistent behaviour.

Generally, gene expression was greater for the sensitive (3D7) clone than for the resistant one (Dd2). Genes coding for enzymes of the GSH dependent detoxification system, increase expression earlier (late ring and trophozoite) than those coding for enzymes of the thioredoxin dependent detoxification system (schizont stage).

The transcription of *pfmrp1* peaks consistently with what would be expected from their inferred functional interaction as xenobiotics, GSH conjugates and GSSG efflux pumps. However, the second MRP gene *pfmrp2* is transcribed much earlier, during the ring stage and peaks again towards the end of the cycle, behaviour more consistent with an importer activity (namely of GSH). This is arguable.

Expression profiles of the 10 studied genes under CQ challenge (IC50) indicate that this drug significantly enhances their expression in both clones. However, for the sensitive clone (3D7), upregulation is significantly higher than for the resistant Dd2, for most of the genes. Significant gene downregulation was not observed. CQ did not induce gene expression in the presence of an mRNA transcription inhibitor, suggesting regulation at the transcriptional level.

## Lista de Abreviaturas

$\Delta$  - Variação ou diferença

$\mu\text{g}$  - micrograma

$\mu\text{l}$  - microlitro

A - adenina

a.a. - aminoácido

ABC – Região de ligação ao ATP (*ATP binding cassette*)

Act.D – Actinomicina D

AMQ – Amodiaquina

Angola – República de Angola

ANOVA - análise de variância

ATP - adenosina trifosfato

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

bp – Pares de bases

BSA – Albumina de soro bovino

C - Citosina

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CMDT – Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

CQ – Cloroquina

Ct – *Threshold cycle* (ciclo onde ocorre um aumento significativo da fluorescência emitida)

Chr. - cromossoma

DEPC – Dietilpirocarbonato

DHFR – Dihidrofolato reductase

DHPS – Dihidropteroato sintetase

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease I

dNTPs - desoxirribonucleótidos trifosfato

dp – Desvio padrão

EDTA – Ácido etileno diamino tetra acético

FAM - 6-carboxifluoresceína

FP-XI – ferriprotoporfirina IX  
G - guanina  
GSH - glutatião reduzido  
GSSH – Dissulfito de glutatião  
GST – Glutatião S-transferase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogeno  
HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N-2-etanosulfônico  
h - hora  
IC – Concentração inibitória  
IC50 – dose que inibe 50% dos parasitas  
IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
Kb -kilobase  
kDa – Kilo dalton  
MDR – *Multi Drug Resistance*  
mg - miligrama  
min – Minuto  
ml - mililitro  
Mn-SOD – proteína Mn-superóxidodismutase  
MQ – Mefloquina  
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro  
NADP - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido  
ng - nanograma  
nM: nano molar  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - radical superóxido  
°C - graus centígrados  
OH - radical hidroxilo  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
p/v – peso/volume  
pb - pares de bases  
PBS – tampão fosfato  
PCR – Reacção de polimerização em cadeia (*Polimerase Chain Reaction*)  
*pfβ-actinaI* – Gene *Plasmodium falciparum* β actinaI  
*pf2-CysPx* - Gene *Plasmodium falciparum* 2-Cys peroxiredoxina

Pf2-CysPX – Proteína 2-Cys-Peroxiirredoxina

*pf crt* – Gene *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter

PFCRT – Proteína *Plasmodium falciparum* Chloroquine resistance transporter

*pfFe-sod* - Gene *Plasmodium falciparum* Fe-superoxido dismutase

PfFe-SOD - Proteína *Plasmodium falciparum* superoxidodismutase

*pf g6pd* – gene glucose-6-fosfato desidrogenase

PfG6PD -Proteína glucose-6-fosfato desidrogenase

*pf gpx* - Gene *Plasmodium falciparum* glutatião peroxidase

PfGPX - Proteína *Plasmodium falciparum* glutatião peroxidase

*pf gr* - Gene *Plasmodium falciparum* glutatião reductase

PfGR – Proteína *Plasmodium falciparum* glutatião reductase

*pf gst* - Gene *Plasmodium falciparum* glutatião S-transferase

PfGST – Proteína *Plasmodium falciparum* glutatião S-transferase

*pf mdr1* – Gene *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1

*pf mdr2* – Gene *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 2

*pf mrp1* - Gene *Plasmodium falciparum* multidrug resistance associated protein 1

PfMRP1 - Proteína *Plasmodium falciparum* multidrug resistance associated protein 1

*pf mrp2* - Gene *Plasmodium falciparum* multidrug resistance associated protein 1

PfMRP2 - Proteína *Plasmodium falciparum* multidrug resistance associated protein 2

*pf rRNA18S* - Gene codificante da subunidade 18S de *Plasmodium falciparum*

*pf trxR* - Gene *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase

PfTrxR – Proteína *Plasmodium falciparum* tioredoxina reductase

*pf y-gcs* - Gene *Plasmodium falciparum*  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetase

Pfy-GCS - Proteína *Plasmodium falciparum*  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetase

*pf y-gcs* - Gene *Plasmodium falciparum* gamma-glutamylcysteine synthetase

Pgh1 – Proteína *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1

Pgh2 – Proteína *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 2

QN – Quinino

R – Resistente

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*

Rn – Sinal de fluorescência do produto amplificado em qualquer momento da reacção

RNA - ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

RPMIc – Meio de cultura completo

RPMIinc – Meio de cultura incompleto  
rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal  
RT-PCR – *Reverse transcriptase – polymerase chain reaction*  
S – Sensível  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
STP – República Democrática de São Tomé e Príncipe  
T - Timidina  
TAMRA - 6- carboxitetrametilrodamina  
TBE – Tampão constituído por Tris, ácido bórico e EDTA  
TCTP – *Translationally controlled tumor protein*  
TE – Tampão de eluição constituído por Tris EDTA  
TEMED – N,N,N',N' tetrametiletlenodiamina  
Tris - tri-(hidroximetil)-aminometano  
TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano  
U – Unidades  
UEI – Unidade de Investigação e Ensino  
UNL – Universidade Nova de Lisboa  
UV – ultra violeta  
V – Volt  
V/V – volume/volume



## Índice Geral

|   |       |
|---|-------|
| Agradecimentos  | I     |
| Artigos científicos   | III   |
| Apresentações Orais   | III   |
| Prêmios   | IV    |
| Sumário   | V     |
| Abstract  | VII   |
| Lista de Abreviaturas   | IX    |
| Índice Geral  | XIII  |
| Índice de Figuras   | XX    |
| Índice de Tabelas   | XXIII |
| <b>I – INTRODUÇÃO</b>   | 1     |
| <b>I.1 - Distribuição geográfica e condições de transmissão da malária</b>  | 2     |
| I.1.1 - Ciclo de vida e transmissão dos parasitas do género <i>Plasmodium</i>   | 3     |
| I.1.2 - Morfologia de <i>Plasmodium falciparum</i> e dos eritrócitos infectados   | 6     |
| <b>I.2 - A resistência aos antimaláricos</b>  | 8     |
| I.2.1 - Focos e origem da resistência a antimaláricos e sua propagação  | 10    |
| I.2.2 - Multiresistência  | 11    |
| I.2.3- Modo de acção dos antimaláricos e mecanismos de resistência associados   | 11    |
| I.2.3.1 - Antimaláricos do grupo das quinoleínas  | 12    |
| I.2.4 - Aspectos metabólicos de <i>P. falciparum</i> associados à susceptibilidade a antimaláricos do grupo das quinoleínas                         | 16    |
| I.2.4.1 - Stress oxidativo em <i>Plasmodium falciparum</i> , resultante da ingestão e metabolização da hemoglobina no vacúolo digestivo do parasita | 16    |
| I.2.4.2 - Sistemas antioxidantes em <i>Plasmodium falciparum</i>  | 18    |
| I.2.4.3 - Contribuição da mitocôndria e apicoplasto para o equilíbrio redox em <i>Plasmodium falciparum</i>   | 29    |
| <b>I.3 - Importância das proteínas ABC, no fenótipo de multiresistência</b>   | 30    |
| I.3.1 - Resistência a múltiplos fármacos mediada por transportadores ABC  | 33    |

|   |    |
|---|----|
| I.3.1.1 - Sub-família MDR/TAP (ABCD)  | 34 |
| I.3.1.2 - Sub-família MRP/CFTR (ABCC)   | 35 |
| I.3.1.3 - Sub-família White (ABCG)  | 36 |
| I.3.2 - O papel das proteínas ABC, no fenótipo de resistência de com a resposta ao stress oxidativo                                   | 37 |
| I.3.3 - MRPs na defesa celular em <i>Plasmodium falciparum</i> , relação com a resposta ao stress oxidativo                           | 39 |
| <b>I.4 - Objectivos gerais</b>  | 42 |
| <b>II – MATERIAL E MÉTODOS</b>  | 44 |
| <b>II.1 - Material Biológico</b>  | 45 |
| II.1.1 - Isolados e clones de <i>Plasmodium falciparum</i>  | 45 |
| II.1.2 - Isolados de <i>Plasmodium falciparum</i>   | 45 |
| II.1.3 - Estirpes de <i>Escherichia coli</i>  | 45 |
| II.1.4 - Vector de clonagem; plasmídeo pGEX-6P-1-His  | 45 |
| <b>II.2 - Descrição das técnicas</b>  | 47 |
| II.2.1 - Cultura <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>  | 47 |
| II.2.2 - Extracção de ácidos nucleicos  | 48 |
| II.2.2.1 - Extracção DNA  | 48 |
| II.2.2.2 - Extracção de RNA   | 50 |
| II.2.3 - Síntese de DNA complementar (cDNA)   | 50 |
| II.2.4 - PCR - <i>Polimerase Chain Reaction</i>   | 51 |
| II.2.5 - Desenho de <i>primers</i>  | 52 |
| II.2.6 - Electroforese de DNA em gel de Agarose   | 52 |
| II.2.7 - PCR em tempo real (RT-PCR)   | 52 |
| II.2.8 - Preparação de bactérias <i>E. coli</i> JM 109/SURE® <i>E. coli</i> BL21 electrocompetentes                                   | 55 |
| II.2.9 - Extracção e quantificação de proteínas (método Bradford) de <i>Plasmodium falciparum</i> a partir de cultura <i>in vitro</i> | 55 |
| II.2.10 - Electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polycrylamide Gel Electrophoresis</i> )              | 56 |
| II.2.11 - Preparação de lâminas de cultura <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i> , para imunofluorescência IFA              | 57 |
| <b>II.3 – Metodologia</b>   | 58 |

|  |    |
|--|----|
| II.3.1 – Selecção da grelha aberta de leitura ORF ( <i>Open Reading Frame</i> )<br>para cada gene  | 58 |
| II.3.2 - Sequenciação dos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> a partir de cDNA   | 58 |
| II.3.3 - Identificação por PCR das inserções/delecções na sequência do<br>gene <i>pfmrp2</i>   | 60 |
| II.3.4 - Identificação das mutações pontuais nos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i><br>por PCR-RFLP   | 61 |
| II.3.4 - Detecção por PCR das repetições na sequência do gene <i>pfy-gcs</i>   |    |
| II.3.5 - Identificação do número de cópias do genes <i>pfmrp1</i> , <i>pfmrp2</i> e<br><i>pfmdr1</i>   | 62 |
| II.3.6 - Estudo <i>in vitro</i> , da susceptibilidade, de isolados de <i>P. falciparum</i><br>aos fármacos cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino   | 63 |
| II.3.6.1 - Selecção de isolados de <i>P. falciparum</i>  | 63 |
| II.3.6.2 - Colheita e armazenamento de isolados de <i>Plasmodium</i><br><i>falciparum</i>  | 64 |
| II.3.6.3 - Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> de isolados de<br><i>Plasmodium falciparum</i>  | 64 |
| II.3.7 - Estudo da associação dos polimorfismos dos genes <i>pfy-gcs</i> ,<br><i>pfmdr1</i> , <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e a resposta <i>in vitro</i> de isolados de pacientes<br>infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> aos fármacos cloroquina, mefloquina,<br>amodiaquina e quinino | 66 |
| II.3.8 - Expressão de <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e de genes codificantes de<br>enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo ao longo do ciclo intra-<br>eritrocitário de <i>P. falciparum</i> na presença e ausência de fármaco   | 67 |
| II.3.8.1 - Quantificação relativa da expressão dos genes por RT-PCR<br>usando o método dos CTs comparativos ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )  | 68 |
| II.3.8.1.1 - Análise de resultados relativos à expressão génica  | 72 |
| a) Cálculo do coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> entre os perfis<br>de expressão obtidos para os clones 3D7 e Dd2 dos genes de enzimas de<br>resposta ao stress <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i>   | 72 |
| b) Regulação dos genes em estudo no ciclo intra-eritrocitário de <i>P.</i><br><i>falciparum</i>  | 73 |
| II.3.8.2 - Análise da estabilidade do mRNA dos genes em estudo   | 73 |

|   |    |
|---|----|
| II.3.9 - Produção de soros hiper imunes para detecção das proteínas codificadas pelos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i>   | 74 |
| II.3.9.1 - Identificação <i>in silico</i> e amplificação por PCR dos fragmentos a clonar para cada gene   | 74 |
| II.3.9.2 - Clonagem dos fragmentos no vector pGEX-6P-1-His por CRL  | 75 |
| II.3.9.3 - Transformação de <i>E. coli</i> JM 109/SURE® e selecção por PCR, das colónias contendo o inserto na orientação correcta  | 76 |
| II.3.9.4 - Selecção das colónias contendo o inserto na orientação correcta, por PCR   | 77 |
| II.3.9.5 – Transformação de <i>E. coli</i> BL21 com o DNA plasmídico e selecção dos clones que expressavam as proteínas recombinantes MRP1A / MRP1B / MRP1C e MRP2A/MRP2B/MRP2  | 77 |
| II.3.9.6 - Purificação das proteínas recombinantes a partir de cultura dos clones <i>E. coli</i> BL21 seleccionados   | 78 |
| II.3.9.7 - Inoculação de ratinhos para a produção de soro hiper imune imune contra as proteínas recombinantes   | 78 |
| II.3.9.8 - Detecção das proteínas PfMRP1 e PfMRP2   |    |
| <b>III – RESULTADOS</b>   | 81 |
| <b>III.1 – Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC, nomeadamente da sub-família MRP/CFTR no genoma de <i>Plasmodium falciparum</i></b>  | 82 |
| III.1.1 - Identificação <i>in silico</i> de sequências de genes candidatos a proteínas da família ABC no genoma de <i>P. falciparum</i>   | 82 |
| III.1.2 - Pesquisa de homologias das sequências das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 com proteínas da sub-família MRP/CFTR de outros organismos  | 85 |
| III.1.3 - Sequenciação dos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> em <i>P. falciparum</i>  | 89 |
| III.1.4 - Análise de sequências   | 90 |
| <b>III.2 - Estudo da associação dos polimorfismos dos genes <i>pfy-gcs</i>, <i>pfmdr1</i>, <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e a resposta <i>in vitro</i> de isolados de pacientes infectados com <i>Plasmodium falciparum</i> aos fármacos cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino</b> | 93 |
| III.2.1 - Caracterização fenotípica dos isolados de <i>Plasmodium</i>   |    |

|   |     |
|---|-----|
| <i>falciparum</i> recolhidos na STP, Angola e Tailândia   | 93  |
| III.2.2 - Caracterização genotípica dos isolados em relação aos genes <i>pfmrp1</i> , <i>pfmrp2</i> , <i>pfy-gcs</i> e <i>pfmdr1</i> e a sua relação com o fenótipo de isolados de <i>P. falciparum</i> provenientes de regiões geográficas diferentes                                | 95  |
| III.2.3 - Associação das alterações pontuais e inserções/delecções dos genes <i>pfmrp1</i> , <i>pfmrp2</i> e <i>pfy-gcs</i> com o fenótipo de amostras de <i>P. falciparum</i> provenientes das regiões geográficas diferentes  | 100 |
| III.2.4 - Estudo da associação do número de cópias dos genes <i>pfmrp1</i> , <i>pfmrp2</i> e <i>pfmdr1</i> com a susceptibilidade in vitro de isolados de <i>P. falciparum</i> a antimaláricos  | 101 |
| <b>III.3 - Expressão dos transportadores <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo ao longo do ciclo intra-eritrocitário de <i>Plasmodium falciparum</i> na presença e ausência de fármaco nos clones 3D7 e Dd2</b> | 105 |
| III.3.1 - Determinação do valor de IC50 relativo aos clones 3D7 e Dd2 em resposta à cloroquina  | 105 |
| III.3.2 - Optimização das condições de PCR em tempo real para os estudos de expressão génica em <i>P. falciparum</i>  | 106 |
| III.3.3 - Avaliação do desenvolvimento e sincronização das microculturas de parasitas dos clones 3D7 e Dd2, ao longo do ciclo intra-eritrocitário de <i>P. falciparum</i>   | 108 |
| III.3.4.1 - Expressão dos transportadores <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo ao longo do ciclo intra-eritrocitário de nos clones 3D7 e Dd2   | 110 |
| III.3.4.1.1 - Regulação dos genes em estudo, no ciclo intra-eritrocitário de <i>P. falciparum</i>   | 114 |
| III.3.4.1.2 - Correlação dos perfis de expressão de cada gene em ambos os clones 3D7 e Dd2 ao longo do ciclo intra-eritrocitário de   | 117 |
| III.3.4.2 - Alteração da expressão dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e transportadores ( <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> ) ao longo do ciclo intra-eritrocitário nos clones 3D7 e Dd2 na presença de cloroquina  | 118 |
| III.3.4.3 - Efeito da cloroquina na regulação da transcrição dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e dos transportadores <i>pfmrp1</i> e   |     |

|  |     |
|--|-----|
| <i>pfmrp2</i> nos clones 3D7 e Dd2   | 124 |
| <b>III.4 - Detecção e localização celular das proteínas codificadas pelos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> nos clones 3D7 e Dd2 de <i>P. falciparum</i></b>   | 128 |
| III.4.1 - Clonagem dos fragmentos de cada um dos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> no vector de expressão pGEX-6P-1-His  | 128 |
| III.4.2 - Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> (BL21)   | 129 |
| III.4.3 - Detecção de <i>P. falciparum</i> em eritrócitos infectados pela técnica de imunofluorescência IFA ( <i>immunofluorescence assay</i> ) com os soros MRP1A e MRP2A   | 130 |
| III.4.4 - Detecção das proteínas <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> por <i>Western Blot</i> com os soros hiper imunes MRP1A e MRP2A, respectivamente  | 132 |
| <b>IV – DISCUSSÃO</b>  | 133 |
| <b>IV.1 - Genes candidatos a proteínas da família ABC no genoma de <i>P. falciparum</i></b>  | 134 |
| <b>IV.2 - Associação dos polimorfismos dos genes <i>pfγ-gcs</i>, <i>pfmdr1</i>, <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e a resposta <i>in vitro</i> de isolados de <i>P. falciparum</i> aos fármacos cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino</b>        | 142 |
| a) Prevalência da resistência <i>in vitro</i> de isolados de <i>P. falciparum</i> a antimaláricos  | 143 |
| b) Associação das alterações pontuais nos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e a resposta <i>in vitro</i> de isolados de <i>P. falciparum</i>   | 144 |
| c) Associação das inserções/delecções no gene <i>pfγ-gcs</i> e <i>pfmrp2</i> e a resposta <i>in vitro</i> de isolados de <i>P. falciparum</i>  | 146 |
| d) Associação do número de cópias dos genes <i>pfmdr1</i> , <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e a resposta <i>in vitro</i> de isolados   | 147 |
| <b>IV.3 - Expressão dos transportadores <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo ao longo do ciclo intra-eritrocitário na presença e ausência de fármaco nos clones 3D7 e Dd2</b> | 148 |
| IV.3.1. Correlação entre os perfis de expressão basal dos genes em 3D7 e Dd2 - estudo em condições normais de cultura  | 150 |
| IV.3.2. Regulação da expressão génica na presença de CQ  | 155 |
| IV.3.3 - Efeito da cloroquina na regulação da transcrição dos genes em   |     |

|  |     |
|--|-----|
| estudo   | 158 |
| <b>IV.4 – Detecção e localização celular das proteínas PfMRP1 e PfMRP2<br/>codificadas pelos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i></b> | 159 |
| <b>V – PRINCIPAIS CONCLUSÕES</b>   | 161 |
| <b>VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | 166 |
| ANEXO 1  | 203 |
| ANEXO 2  | 204 |
| ANEXO 3  | 205 |
| ANEXO 4  | 206 |
| ANEXO 5  | 207 |
| ANEXO 6  | 214 |
| ANEXO 7  | 227 |
| ANEXO 8  | 229 |
| ANEXO 9  | 239 |
| ANEXO 10   | 248 |
| ANEXO 11   | 249 |
| ANEXO 12   | 250 |
| ANEXO 13   | 251 |
| ANEXO 14   | 252 |
| ANEXO 15   | 253 |
| ANEXO 16   | 255 |
| ANEXO 17   | 256 |
| <b>VIII – GLOSSÁRIO</b>  | 258 |

## Índice de Figuras

|  |          |
|--|----------|
| <b>Figura I.1</b> – Mapa da distribuição geográfica da malária e dos fármacos aos quais <i>Plasmodium falciparum</i> apresenta resistência.  | 3<br>4   |
| <b>Figura I.2</b> - Ciclo de vida de <i>Plasmodium falciparum</i> .  |          |
| <b>Figura I.3</b> - Estádios de desenvolvimento intra-eritrocitário de <i>Plasmodium falciparum</i> .  | 5        |
| <b>Figura I.4</b> - Invasão de um eritrócito por um merozoíto de <i>Plasmodium falciparum</i> .  | 6        |
| <b>Figura I.5</b> - Representação simplificada dos vários processos bioquímicos que participam na resposta ao stress oxidativo na fase intra-eritrocitária de <i>Plasmodium falciparum</i> .                     | 19       |
| <b>Figura I.6</b> - Modelos bidimensionais dos arranjos moleculares hipotéticos de proteínas ABC.  | 32       |
| <b>Figura I.7</b> - Modelo ilustrando a inter-relação entre uma proteína do tipo MRP e o glutatião (GSH).  | 40       |
| <b>Figura II.1</b> - Esquema representativo do vector de clonagem, o plasmídeo pGEX-6P-1-His.  | 46       |
| <b>Figura II.2</b> - Representação gráfica do aumento da concentração de DNA durante uma reacção de PCR.   | 53       |
| <b>Figura II.3</b> - Emissão de fluorescência durante a reacção de PCR em tempo real pelos 3 métodos usados neste trabalho.  | 55       |
| <b>Figura II.4</b> - Fotografia de gotas espessas realizadas a partir da microcultura <i>in vitro</i> para avaliação da susceptibilidade a antimaláricos segundo o teste MARK III da OMS.                        | 65<br>72 |
| <b>Figura II.5</b> - Validação da aplicação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .   |          |
| <b>Figura II.6</b> - Programa e componentes da mistura de CRL ( <i>Cycle Restriction Ligation</i> ) usados na clonagem de cada fragmento no plasmídeo pGEX-6P-1-His.   | 76       |
| <b>Figura III.1</b> - Comparação da sequência de a.a. dos NBDs de PfMRP1 de <i>P. falciparum</i> , com as seis proteínas com o maior grau de semelhança ao nível da estrutura primária identificadas pelo BLAST. | 87       |
| <b>Figura III.2</b> - Comparação da sequência de a.a. dos NBDs de PfMRP2 de <i>P. falciparum</i> , com as seis proteínas com o maior grau de semelhança ao nível da  | 88       |



|   |            |
|---|------------|
| estrutura primária identificadas pelo BLAST.  | 90         |
| <b>Figura III.3</b> - Resultado da amplificação por PCR a partir de cDNA, após purificação, dos fragmentos dos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> a sequenciar.  | 96         |
| <b>Figura III.4</b> - Detecção por PCR das inserções/deleções nos genes <i>pfmrp2</i> e <i>pfy-gcs</i> em clones e isolados fenotipados de <i>P. falciparum</i> .   |            |
| <b>Figura III.5</b> - Fotografias de géis exemplificativos da electroforese dos fragmentos obtidos por PCR-RFLP para a identificação dos polimorfismos de <i>pfmrp1</i> .   | 98<br>99   |
| <b>Figura III.6</b> - Identificação do polimorfismo de <i>pfmrp2</i> por digestão com <i>BclI</i> , nos clones 3D7 e Dd2 e em isolados.   | 101        |
| <b>Figura III.7</b> - Número de cópias dos genes <i>pfmdr1</i> , <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> , determinado por RT-PCR usando SYBR <i>Green</i> .  | 103        |
| <b>Figura III.8</b> - Número de cópias dos genes <i>pfmrp1</i> , <i>pfmrp2</i> e <i>pfmdr1</i> nos isolados provenientes da Tailândia de Angola.  | 106        |
| <b>Figura III.9</b> - Curvas de dose-resposta resultantes dos testes de susceptibilidade para a determinação dos IC50 dos clones 3D7 e Dd2 para a cloroquina.   | 107<br>109 |
| <b>Figura III.10</b> - Fotografia do gel correspondente à electroforese dos produtos dos 10 genes amplificados por PCR em tempo real.   |            |
| <b>Figura III.11</b> - Monitorização da sincronia das culturas <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> .  | 112        |
| <b>Figura III.12</b> - Perfil de expressão dos genes <i>pfFe-sod</i> , <i>pfy-gcs</i> , <i>pfgr</i> , <i>pfgst</i> , <i>pfgpx</i> , <i>pftrxR</i> , <i>pf2-cysPx</i> , <i>pfg6pd</i> , <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone 3D7 de <i>P. falciparum</i> . | 113        |
| <b>Figura III.13</b> - Perfil de expressão dos genes <i>pfFe-sod</i> , <i>pfy-gcs</i> , <i>pfgr</i> , <i>pfgst</i> , <i>pfgpx</i> , <i>pftrxR</i> , <i>pf2-cysPx</i> , <i>pfg6pd</i> , <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone Dd2 de <i>P. falciparum</i> . | 115<br>116 |
| <b>Figura III.14</b> - Alteração da amplitude de expressão dos diferentes genes entre estadios intra-eritrocitários do clone 3D7 de <i>P. falciparum</i> .  |            |
| <b>Figura III.15</b> - Alteração da amplitude de expressão dos diferentes genes entre estadios intra-eritrocitários do clone Dd2 de <i>P. falciparum</i> .  | 120        |
| <b>Figura III.16</b> - Alteração da expressão dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo, <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone 3D7 na presença de cloroquina.   | 121        |

- Figura III.17** - Alteração da expressão dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone Dd2 na presença de cloroquina. 126
- Figura III.18** - Influência da Actinomicina D no efeito da cloroquina sobre a transcrição dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2* no clone 3D7. 127
- Figura III.19** - Influência da Actinomicina D no efeito da cloroquina sobre a transcrição dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2* no clone Dd2. 129
- Figura III.20** - Fotografia dos géis de confirmação das construções genéticas dos diferentes insertos com o vector pGEX-6P-1His. 130
- Figura III.21** - Indução da expressão e purificação das proteínas recombinantes. 131
- Figura III.22** - Detecção por IFA dos parasitas *P. falciparum* em eritrócitos infectados, usando o soro hiper imune MRP1A. 132
- Figura III.23** - Detecção por IFA dos parasitas *P. falciparum* em eritrócitos infectados, usando o soro hiper imune MRP2A.
- Figura III.24** - Detecção das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 por *western blot* em extracto de proteínas totais de *P. falciparum* com os soros hiper imunes MRP1A e MRP2A.

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
|   | 38 |
| <b>Tabela I.1</b> - Alguns exemplos de transportadores de membrana da super-família ABC e as respectivas funções celulares.   |    |
| <b>Tabela II.1</b> - Características dos clones de <i>P. falciparum</i> 3D7, Dd2, HB3 e K1.   | 45 |
| <b>Tabela II.2</b> - Sequência dos <i>primers</i> e condições de amplificação por PCR dos fragmentos dos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> .  | 59 |
| <b>Tabela II.3</b> - Sequência dos <i>primers</i> e condições de PCR para amplificação do fragmento do gene <i>pfmrp2</i> que inclui as inserções/deleções.   | 60 |
| <b>Tabela II.4</b> - Fragmentos amplificados e enzimas de restrição, para identificação das mutações pontuais dos genes <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> .   | 61 |
| <b>Tabela II.5</b> - Sequência dos <i>primers</i> e condições de PCR para amplificação do fragmento do gene <i>pfy-gcs</i> que inclui as sequências repetidas.  | 62 |
| <b>Tabela II.6</b> - Sequência dos <i>primers</i> para determinação do número de cópias dos genes <i>pfmdr1</i> , <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> .   | 63 |
| <b>Tabela II.7</b> - Períodos de segurança relativamente à toma de antimaláricos.   |    |
| <b>Tabela II.8</b> - Critérios de inclusão para aplicação de testes de susceptibilidade, segundo MARK III da OMS.   | 64 |
| <b>Tabela II.9</b> - Concentrações de antimalárico, usadas nos ensaios de susceptibilidade <i>in vitro</i> dos isolados de <i>P. falciparum</i> .   | 65 |
| <b>Tabela II.10</b> - Valores de IC99 indicativos de resistência relativamente a cada antimalárico segundo a metodologia MARK III – OMS.  | 66 |
| <b>Tabela II.11</b> - Sequência dos <i>primers</i> e <i>beacons</i> para estudo da expressão dos genes de resposta ao stress oxidativo e <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> .                                  | 70 |
| <b>Tabela II.12</b> - Sequência dos <i>primers</i> e condições de PCR para amplificação dos fragmentos a clonar do gene <i>pfmrp1</i> - MRP1A / MRP1B / MRP1C e de <i>pfmrp2</i> - MRP2A / MRP2B / MRP2C. | 75 |
| <b>Tabela III.1</b> - Sequências de genes candidatos a proteínas da família ABC no genoma de <i>Plasmodium falciparum</i> .   | 84 |
| <b>Tabela III.2</b> - Comparação da sequência completa de aminoácidos de PfMRP1 e PfMRP2, com proteínas da base de dados SwissProt.   | 86 |
| <b>Tabela III.3</b> - Previsão do número e orientação das hélices transmembranares,   | 89 |

nas sequências de PfMRP1 e PfMRP2.

**Tabela III.4** - Alterações identificadas na sequência do gene *pfmrp1* nos clones 3D7 e Dd2. 91

**Tabela III.5** - Alterações pontuais identificadas na sequência do gene *pfmrp2* nos clones 3D7 e Dd2. 92

**Tabela III.6** - Número de repetições de cada sequência inserida/delectada na sequência do gene *pfmrp2* nos clones 3D7 e Dd2. 92

**Tabela III.7** - Prevalência de isolados resistentes *in vitro* aos diferentes antimaláricos em Angola, Tailândia e STP. 93

**Tabela III.8** - Fármacos, genes e respectivas alterações de sequência incluídos neste estudo. 96

**Tabela III.9** - Associação das frequências das mutações pontuais dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* e das inserções/delecções dos genes *pfmrp2* e *pfγ-gcs* com a resposta *in vitro* a diferentes fármacos em isolados de *P. falciparum* provenientes da Tailândia, Angola e STP. 100

**Tabela III.10** - Parâmetros da amplificação por PCR em tempo real referentes à validação da utilização do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para a quantificação relativa dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1* tendo como controlo interno o gene *pfβ-actinal*. 102

**Tabela III.11** - Parâmetros da amplificação por PCR em tempo real referentes à validação da utilização do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para o estudo da expressão dos genes *pfFe-sod*, *pfγ-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-CysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2*, tendo como controlo interno o gene *pf rRNA18S*. 108

**Tabela III.12** - Correlação entre os perfis de expressão obtidos para os clones 3D7 e Dd2 dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e transportadores (*pfmrp1* e *pfmrp2*). 118



## Introdução

---

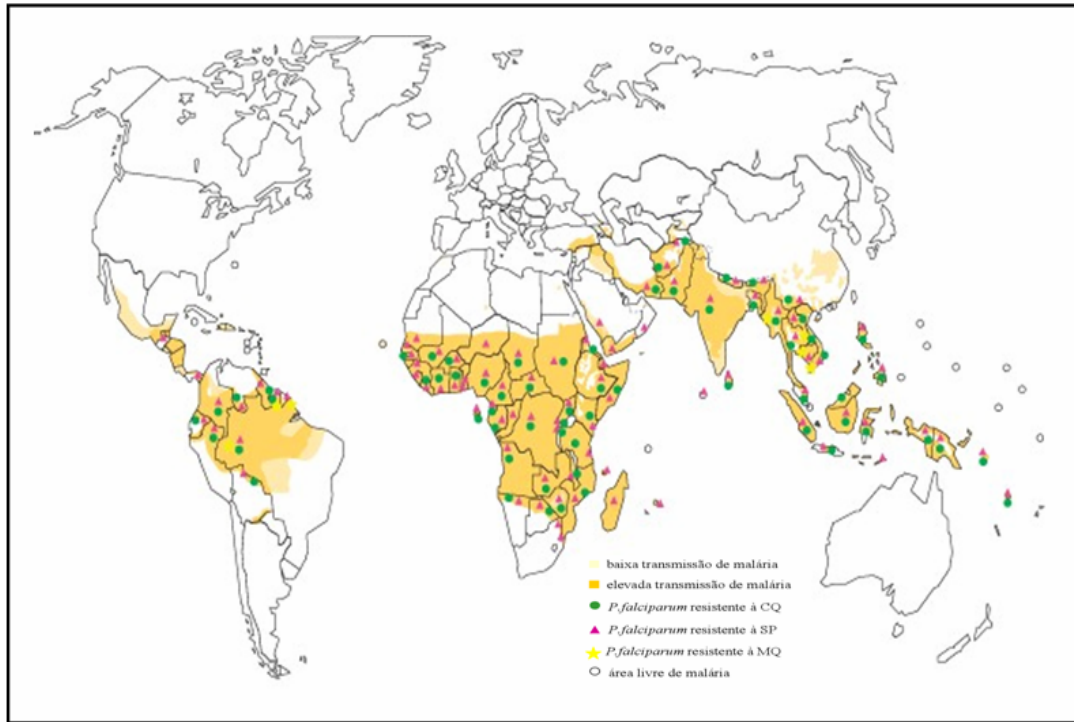
A malária é uma doença causada por protozoários do género *Plasmodium*. Existem 4 espécies que infectam o Homem, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*, sendo esta última a espécie mais patogénica, podendo causar morte por anemia ou por malária cerebral. As características da doença variam com a espécie infectante, a parasitémia, o estado imunitário do paciente, com a administração da terapêutica correcta e com a susceptibilidade do parasita a esta. Em 1997, 100 países possuíam risco de transmissão de malária, estimando-se em 300 a 500 milhões os casos clínicos de malária por ano (WHO,1997). Destes, morrem em consequência da infecção 1,5 a 2,7 milhões por ano (Butler, 2004), aproximadamente 1 milhão de mortos são crianças com menos de 5 anos de idade ([www.who.int/malaria/](http://www.who.int/malaria/)).

O diagnóstico precoce e uma terapêutica correcta, são os factores cruciais na prevenção da mortalidade. A resistência dos vectores aos insecticidas e dos parasitas aos antimaláricos, constituem factores decisivos para a resolução do flagelo da malária. Os antimaláricos são caros, e na sua maioria inacessíveis para as populações das áreas endémicas.

### **I.1 - Distribuição geográfica e condições de transmissão da malária**

A distribuição geográfica da malária a nível mundial (Figura I.1) incide sobre regiões tropicais e subtropicais, onde estão reunidas as condições para a existência dos mosquitos vectores ([www.who.int/malaria/](http://www.who.int/malaria/)). Assim, inclui a África sub – Sahariana, a América Central e do Sul, o Médio Oriente, o Sudeste Asiático e a Oceania, verificando-se no entanto, variações na intensidade de transmissão e risco de infecção em cada uma destas zonas, existindo programas de controlo bem sucedidos em algumas delas. *P. falciparum* é a espécie mais comum representando mais de dois terços dos casos mundiais de malária, e apresenta uma distribuição muito vasta desde os trópicos a áreas temperadas (Figura I.1). Segundo a Organização Mundial de Saúde ([www.who.int/malaria](http://www.who.int/malaria)), a malária é endémica em mais de 90 países em todo o mundo, correspondendo a cerca de 40% da população humana em risco (Price & Nosten, 2001).

## Introdução



**Figura I.1 - Mapa da distribuição geográfica da malária e dos fármacos aos quais *Plasmodium falciparum* apresenta resistência** (adaptado de WHO). CQ – cloroquina, SP – sulfadoxina/pirimetamina, MQ – mefloquina.

Esta distribuição está relacionada com a intensidade da transmissão dos parasitas da malária, que varia geograficamente de acordo com as espécies vectoras de mosquitos *Anopheles*. A interrupção de transmissão é, em varias partes do globo, tecnicamente difícil devido a limitações na aplicação de métodos para o controlo da malária (Beier *et al.*, 1999).

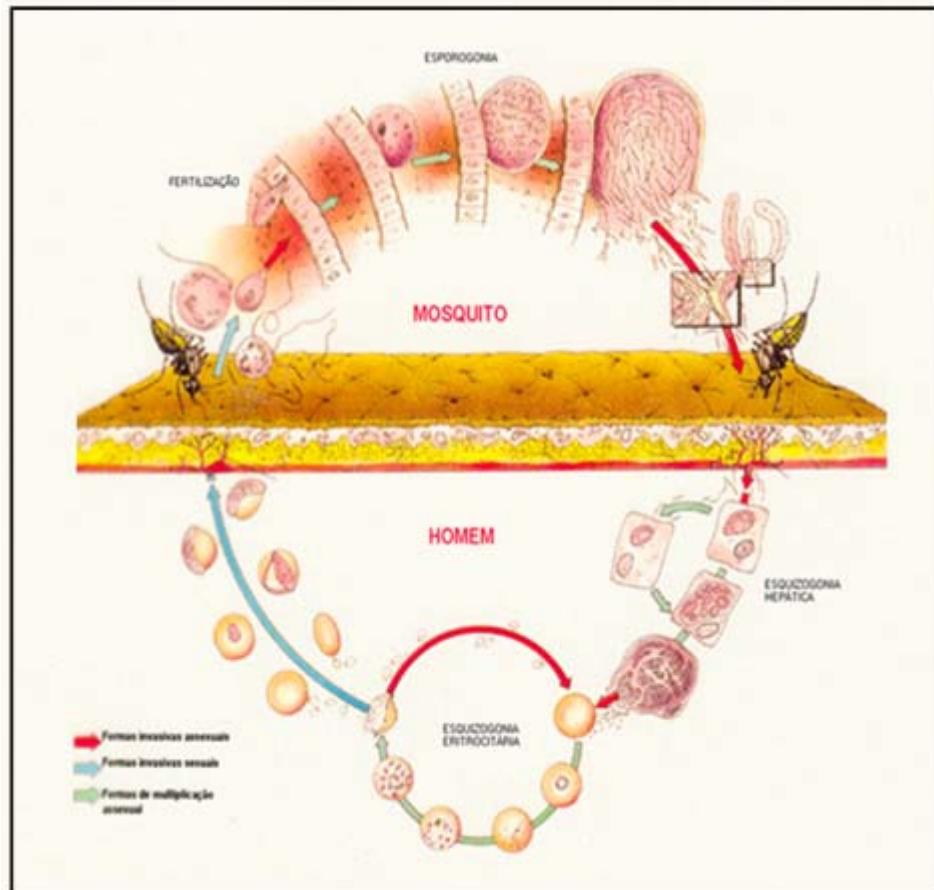
### I.1.1 - Ciclo de vida e transmissão dos parasitas do género *Plasmodium*

Os plasmódios são protozoários unicelulares e haplóides durante parte do seu ciclo de vida (Figura I.2). O estado de diploidia verifica-se durante um breve período do ciclo, no hospedeiro invertebrado. A transmissão do parasita ao hospedeiro vertebrado, constitui uma etapa obrigatória no ciclo de vida das 4 espécies de *Plasmodium* referidas, bem como em outras espécies.

Classificação taxonómica de *Plasmodium falciparum*: Filo Alveolata; Ordem Apicomplexa; Família Haemosporida e Género *Plasmodium*.

## Introdução

O ciclo de vida inclui duas fases: a fase esporogônica, com multiplicação do parasita no hospedeiro definitivo, invertebrado (género *Anopheles*), e a fase esquizogônica, com multiplicação no hospedeiro intermediário vertebrado (*Homo sapiens*) (Gilles, 1989; Knell, 1988; Bruce-Chwatt *et al.*, 1970).



**Figura I.2 - Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*.** (adaptado de (Knell, 1988)). O parasita é transmitido ao vetor, após uma refeição sanguínea de um mosquito fêmea num hospedeiro intermediário infectado e com parasitas no estadiu de gametócitos. Após a maturação dos gametócitos no estômago do mosquito, ocorre a fertilização. O zigoto formado transforma-se num oocineto móvel e invasivo que penetra o epitélio do estômago do mosquito, fixando-se neste. Inicia-se aí o desenvolvimento do oocisto. Este sofre uma divisão meiótica, seguida de múltiplas divisões mitóticas que originam inúmeros esporozoítos. Quando maturo, o oocisto liberta, após rebentamento, os esporozoítos móveis, para o hemocélio do mosquito. Estes deslocam-se para as glândulas salivares, acumulando-se nos ductos salivares.

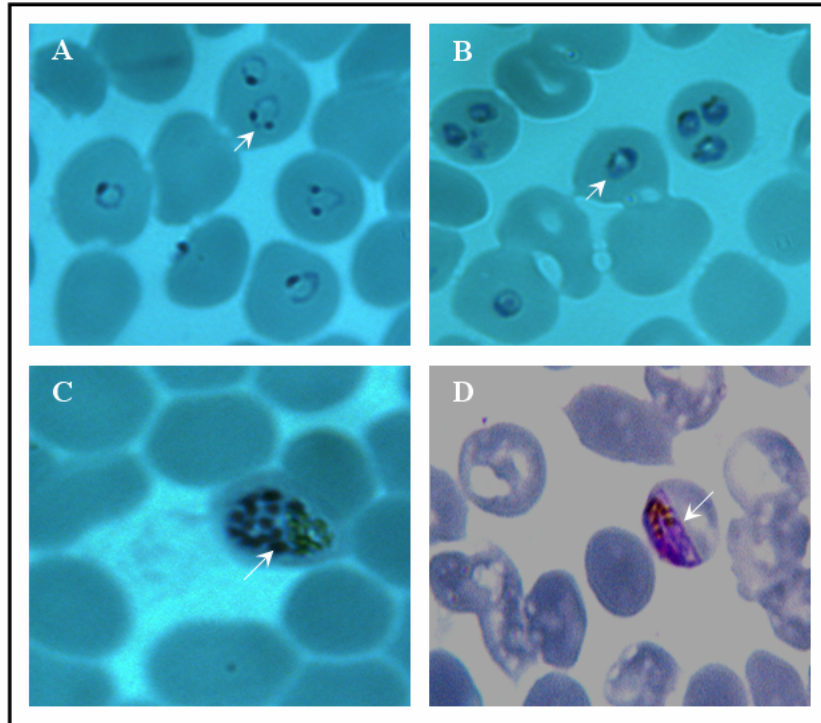
Quando o mosquito infectado se alimenta no hospedeiro vertebrado, os esporozoítos inoculados durante a picada do mosquito, entram na corrente sanguínea. Alguns destes esporozoítos penetram nos hepatócitos iniciando a esquizogonia hepática ou extra-eritrocitária. Em *P. vivax* e *P. ovale*, este desenvolvimento não se processa de imediato, existindo formas hepáticas latentes ou hipnozoítos. Após maturação dos esquizontes



## Introdução

---

hepáticos ocorre a sua ruptura, sendo os merozoítos libertados para a corrente sanguínea.



**Figure I.3 - Estádios de desenvolvimento intra-eritrocitário de *Plasmodium falciparum*.** A fase de anel, a seta assinala um parasita com dupla cromatina; B fase de trofozoíto; C fase de esquizonte, a seta assinala um dos merozoítos; D gametócito (Fotografias de microscopia de transmissão de partir de esfregaços de cultura corados com giemsa, ampliação 100X).

Os merozoítos invadem eritrócitos, iniciando-se a esquizogonia sanguínea ou intraeritrocitária. Durante a fase intraeritrocitária do parasita, os merozoítos sofrem diferenciação originando estádios de desenvolvimento: anel, trofozoíto e esquizonte (Figura I.3). Até à fase de divisão nuclear é designado trofozoíto. Quando o núcleo entra em divisão, ocorre a esquizogonia, originando merozoítos - forma-se o esquizonte (cada esquizonte origina 16 a 32 merozoítos). Os merozoítos são libertados por rotura do esquizonte invadindo novos eritrócitos. Este ciclo ocorre de uma forma periódica de aproximadamente 48 h, sendo responsável pelos picos febrís típicos de uma infecção de malária.

Alguns dos merozoítos diferenciam-se em gametócitos (Figura I.3), as formas infectantes para o vector. A maturação dos gametócitos, inicia-se no hospedeiro

## Introdução

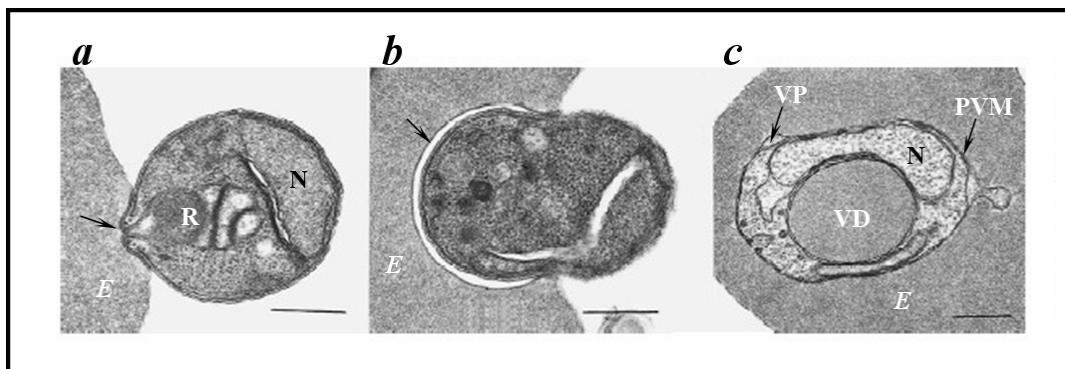
---

vertebrado e é completada no mosquito após refeição sanguínea, dando início a um novo ciclo esporogónico (Gilles, 1989; Knell, 1988; Bruce-Chwatt *et al.*, 1970).

### I.1.2 - Morfologia de *Plasmodium falciparum* e dos eritrócitos infectados

*P. falciparum* é um parasita intracelular obrigatório, que invade activamente o eritrócito hospedeiro, onde se desenvolve no interior do vacúolo do parasitóforo (PV) (Figura.I.4) formado durante a invasão.

A invasão do eritrócito pelos merozoítos ocorre rapidamente ( $\approx 30s$ ) (Fowler *et al.*, 1998). Estudos morfológicos realizados por microscopia electrónica e de transmissão, revelam que a invasão se processa de forma sequencial (Fowler *et al.*, 1998) (Bannister & Dluzewski, 1990; Aikawa *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1973).



**Figura I.4 - Invasão de um eritrócito por um merozoíto de *Plasmodium falciparum*.** **a** - o merozoíto adere ao eritrócito pela região apical (seta), R=roptria, N = núcleo; **b** - a membrana do eritrócito sofre invaginação (seta) e engloba o merozoíto; **c** - o parasita (estádio de anel) rodeado pela membrana do vacúolo do parasitóforo; VP = vacúolo do parasitóforo, PVM = membrana do vacúolo do parasitóforo VD = vacúolo digestivo. Barra = 0.5  $\mu m$  adaptado de (Akaki *et al.*, 2002).

Após contacto com um eritrócito, o merozoíto adere à membrana deste (Aikawa *et al.*, 1978); penetra no eritrócito onde sofre desenvolvimento no interior de um compartimento chamado vacúolo do parasitóforo (VP), formado a partir da membrana do eritrócito. A membrana que rodeia o merozoíto nesta fase, tem origem no eritrócito e toma o nome de membrana do vacúolo do parasitóforo (PVM) (Figura I.4 *b* e *c*).

O parasita desenvolve-se no interior do VP (Figura I.4 *c*). A membrana do vacúolo do parasitóforo constitui a interface entre o parasita e o citoplasma do eritrócito. A

## Introdução

---

hemoglobina proveniente do eritrócito hospedeiro, é digerida no vacúolo digestivo do parasita (Akaki *et al.*, 2002). O processo de digestão inicia-se com a formação do citostoma, uma invaginação das membranas parasitárias plasmática e do vacúolo do parasitóforo, formando vesículas de pinocitose as quais transportam o citoplasma do eritrócito. Estas vesículas coalescem com o vacúolo digestivo onde libertam o seu conteúdo (maioritariamente constituído por hemoglobina), no VP as proteases degradam a hemoglobina em pequenos péptidos e aminoácidos (Rathore *et al.*, 2005b; Lew *et al.*, 2003). A degradação da hemoglobina liberta compostos lipofílicos ferrosos os quais são oxidados até ferriprotoporfirina-IX (FP-IX) (Ayad *et al.*, 2001). Os grupos heme livres são polimerizados originando a substância cristalina denominada hemozoína (Egan *et al.*, 2002; Krugliak *et al.*, 2002; Loria *et al.*, 1999).

### **a) Alterações morfológicas do eritrócito infectado**

O parasita completa a fase assexuada do seu ciclo de desenvolvimento no interior do vacúolo do parasitóforo (VP). As proteínas de origem eritrocitária são excluídas da PVM e substituídas por proteínas de origem parasitária, enquanto que os lípidos derivam na sua maior parte da membrana plasmática do eritrócito (Pouvelle *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1993). À medida que o parasita se desenvolve e replica dentro do VP, ocorrem varias alterações no citoplasma do eritrócito infectado (Das *et al.*, 1994; Behari & Haldar, 1994; Elmendorf & Haldar, 1993). Nos estadios maduros do parasita (esquizontes) a alteração mais evidente da superfície do eritrócito infectado é causada pelas protuberâncias denominadas *knobs*. Estes são consequência da deposição e inserção de proteínas de origem parasitária<sup>1</sup> na superfície interna da membrana do eritrócito, originando uma deformação na membrana eritrocitária (Luse & Miller, 1971). É através dos *knobs* que os eritrócitos infectados se ligam à superfície de eritrócitos não infectados (ex. formação de rosetas) e outras células (ex. endotélio vascular cerebral), contribuindo para a forma mais grave da doença, a malária cerebral (Aikawa, 1988; Aley *et al.*, 1984).

---

<sup>1</sup> O principal componente dos *knobs* é a proteína rica em histidina associada aos knobs (KAHRP), a qual forma o principal elemento estrutural destas protuberâncias (Triglia *et al.*, 1987; Pologe *et al.*, 1987; Kilejian *et al.*, 1986). Outros componentes são a PfEMP-1 uma proteína integral de membrana e actua como ligando na adesão aos receptores celulares do endotélio vascular (Smith & Fornace, 1995; Baruch *et al.*, 1995) e a PfEMP3 (Pasloske *et al.*, 1993) cuja função se pensa estar associada ao transporte da PfEMP1 (Waterkeyn *et al.*, 2000).

### **b) Alterações fisiológicas do eritrócito infectado**

No eritrócito infectado a membrana do vacúolo do parasitóforo (PVM) forma uma barreira entre o citoplasma da célula hospedeira e a superfície do parasita. É através da PVM que o parasita recebe nutrientes do meio extra celular, que incluem aminoácidos, ácidos gordos e purinas. Ao contrário dos mamíferos, os protozoários (Berens *et al.*, 1998), em particular *Plasmodium spp.* (Gero *et al.*, 1984), não possuem a capacidade sintetizar *de novo* purinas. Assim, dependem totalmente do hospedeiro para obter este nutriente essencial à síntese de DNA. Os nutrientes têm de ser transportados através de 3 membranas: a membrana plasmática do eritrócito, a membrana do vacúolo do parasitóforo e a membrana plasmática do parasita (Figura I.4). O transporte de nutrientes envolve proteínas transportadoras, canais e as membranas tubovisculares (Saliba & Kirk, 2001; Saliba & Kirk, 1999; Lauer *et al.*, 1997; Upston & Gero, 1995; Behari & Haldar, 1994).

À medida que o parasita se desenvolve dentro do eritrócito, são associadas ao citoesqueleto do eritrócito ou inseridas na sua membrana, diversas proteínas com origem parasitária. Isto resulta em modificações a nível do citoplasma e da membrana do eritrócito (Foley & Tilley, 1995; Lingelbach, 1993). Existem evidências de que os eritrócitos infectados possuem uma permeabilidade aumentada (relativamente aos eritrócitos não infectados) para um determinado número de substâncias de baixo peso molecular, com relevância para as moléculas aniónicas (Penny *et al.*, 1998; Ginsburg & Atamna, 1994c).

### **I.2 - A resistência aos antimaláricos**

Nas últimas décadas, o controlo e tratamento da malária têm sido bastante dificultados pelo surgimento e disseminação da resistência parasitária aos antimaláricos mais utilizados, nomeadamente à cloroquina (Talisuna *et al.*, 2003a).

No contexto deste trabalho adoptaremos a definição da Organização Mundial de Saúde que refere resistência como “a capacidade que uma dada população de parasitas tem para se multiplicar ou sobreviver, na presença de concentrações de fármaco, que habitualmente destruiriam parasitas da mesma espécie ou impediriam a sua multiplicação” ([www.malariasite.com/malaria/DrugResistance](http://www.malariasite.com/malaria/DrugResistance)). A eficácia terapêutica dos fármacos, baseia-se na capacidade destes inibirem ou destruírem os parasitas *in vivo*.

Os acontecimentos que permitem aos parasitas da malária sobreviver na presença de um determinado antimalárico são espontaneos, raros e independentes do fármaco usado (White, 2004). Estes acontecimentos estão associados a mutações ou alteração do número de cópias de genes codificantes do alvo de determinado fármaco ou de transportadores (bombas) cuja função afecta a concentração intra-parasitária do fármaco. São diversos os factores que poderão influenciar a selecção de resistência aos antimaláricos, incluindo características do parasita, do hospedeiro, do vector e do agente antimalárico utilizado.

### a) Factores associados ao parasita

- A frequência com que surgem espontaneamente mutações no genoma e a eficiência dos mecanismos de reparação do DNA (Trotta *et al.*, 2004).
- A *fitness*<sup>2</sup> conferida pelas mutações em relação à presença de antimaláricos, em relação a parasitas portadores do alelo selvagem (Osman *et al.*, 2007; Walliker *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2002).
- O grau de susceptibilidade/resistência (relação dose resposta) que determinada mutação confere ao parasita em relação a um ou mais antimaláricos (Wernsdorfer & Noedl, 2003a; Le Bras & Durand, 2003a; Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003; Wongsrichanalai *et al.*, 2002; Korsinczky *et al.*, 2000).
- O número de parasitas expostos ao fármaco<sup>3</sup> e a probabilidade de ocorrerem infecções mistas (presença de diferentes estirpes de parasitas no mesmo hospedeiro) têm um efeito aditivo na selecção de parasitas resistentes (ter Kuile *et al.*, 1995).

### b) Factores associados ao hospedeiro humano

- O sistema imunitário do individuo (imunidade específica<sup>4</sup> e não específica), contribui para a eliminação dos parasitas. A má nutrição, infecções concomitantes ou outros favorecem a imunodepressão, aumentando a probabilidade de sobrevivência dos parasitas não eliminados pelo fármaco (White, 2004; Djimde *et al.*, 2003; White, 2003; Wernsdorfer, 1991b).

---

<sup>2</sup> Vantagem adaptativa conferida a um organismo, por uma determinada mutação, em relação as organismos portadores do alelo selvagem.

<sup>3</sup> Em áreas de transmissão moderada ou alta, as parasitémias toleradas sem sintomas de doença, podem atingir mais de 10,000 parasitas por  $\mu\text{l}$  de sangue (entre  $10^{10}$  e  $10^{11}$  parasitas totais no sangue de um adulto).

<sup>4</sup> A imunidade específica é menor em areas de baixa transmissão do que em areas de elevada transmissão.

- A metabolização dos antimaláricos pelo organismo humano varia entre indivíduos, devido à acção de enzimas maioritariamente membros da super família dos citocromos P450<sup>5</sup> (Giao & de Vries, 2001). A metabolização mais rápida do fármaco, contribui para a exposição do parasita a doses sub-terapêuticas (Vennerstrom *et al.*, 2000). Nos indivíduos ou populações em que isto se verifica, a concentração de composto é insuficiente para realizar uma protecção profilática ou terapêutica, no entanto é muitas vezes suficiente para exercer pressão selectiva sobre os parasitas, contribuindo para a selecção de parasitas resistentes (White, 2004; Wernsdorfer, 1991a).

### c) Factores associados ao fármaco

- Exposições sucessivas a concentrações sub-terapêuticas de fármaco permitem a selecção de parasitas cada vez mais resistentes, tal como a administração indevida dos antimaláricos, para tratamento de outras patologias, cujos sintomas iniciais podem ser confundidos com os de uma infecção por *Plasmodium* (Wernsdorfer, 1991a; Etting *et al.*, 1989; Payne, 1988).

- A resistência cruzada a diferentes fármacos, surge pelo facto de alguns antimaláricos serem quimicamente semelhantes, permite que a resistência estabelecida a um deles facilite a selecção de resistência ao outro antimalárico quimicamente relacionado (Hall *et al.*, 1975)(Basco & Le Bras, 1991).

### I.2.1 - Focos e origem da resistência a antimaláricos e sua propagação

Em termos gerais o fenómeno de resistência a antimaláricos, tem sido descrito para duas das quatro espécies de *Plasmodium* que infectam o Homem: *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo que este último tem demonstrado capacidade de resistir a quase todos os fármacos em uso (Looareesuwan *et al.*, 1997; Murphy & Lewis, 1993), exceptuando a artemisinina e seus derivados. Actualmente parasitas resistentes a um ou mais fármacos podem ser encontrados em todas as regiões onde a malária é endémica, com excepções da América Central e algumas do Médio Oriente e Ásia Central (Figura I.1).

Uma revisão detalhada sobre origem da resistência a antimaláricos e sua propagação pode ser encontrada em (White, 2004).

---

<sup>5</sup> Os genes que codificam estas enzimas são polimórficos, originando enzimas com capacidades catalíticas variáveis resultando em cinéticas de metabolização diferentes de indivíduo para indivíduo.

### I.2.2 – Multiresistência

A designação de multiresistência a antimaláricos refere-se ao fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos, fenómeno este que tem sido observado em *P. falciparum*. A resistência a vários antimaláricos em simultâneo resulta da utilização frequente e simultânea dos mesmos, provocando uma pressão selectiva que culmina no aparecimento deste fenómeno de multiresistência; a resistência cruzada entre antimaláricos está relacionada com os aspectos comuns dos seus mecanismos de acção, bem como dos mecanismos de resistência que lhes estão associados (Le Bras & Durand, 2003a). Habitualmente, refere-se à resistência à cloroquina e à combinação pirimetamina/sulfadoxina (SP), mediada por mutações nos genes *pfcr*, *pfdhfr* e *pfdhps*, respectivamente. No entanto, estirpes resistentes à cloroquina, SP, mefloquina e com susceptibilidade diminuída ao quinino foram já descritas (Syafuddin *et al.*, 2006; Syafuddin *et al.*, 2005; Syafuddin *et al.*, 2003). Actualmente, a região do globo mais afectada por este fenómeno de multiresistência é o Sudeste Asiático (Figura I.1).

### I.2.3- Modo de acção dos antimaláricos e mecanismos de resistência associados

A eficácia e especificidade dos compostos usados para tratamento das doenças infecciosas, assenta na capacidade destes interferirem com aspectos do metabolismo do agente, que diferem significativamente dos do hospedeiro humano. A fase sintomática da infecção por *P. falciparum* é intra-eritrocitária. As adaptações metabólicas e mesmo vias biossintéticas totalmente distintas, necessárias para o seu desenvolvimento, constituem assim potenciais alvos terapêuticos. Isto é válido não só para os fármacos existentes mas também, para o desenho de novos compostos.

Na profilaxia e tratamento da malária, os grupos de compostos com maior expressão são os fármacos antagonistas da síntese do ácido fólico (ex. pirimetamina e sulfadoxina), os derivados do Quinghaosu (ex. artemisinina) e os fármacos antimaláricos da classe das quinoleínas (ex. quinino, mefloquina, cloroquina e primaquina) (Arav-Boger & Shapiro, 2005; Cowman & Foote, 1990).

Nesta secção, serão abordados os aspectos metabólicos do parasita, modos de acção e mecanismos inerentes à resistência aos antimaláricos, com especial destaque para a classe das quinoleínas, por serem os antimaláricos objecto de estudo deste trabalho.

### I.2.3.1 - Antimaláricos do grupo das quinoleínas

Foram os Jesuítas que introduziram na Europa a utilização da casca da quina para combater a malária. No século XIX (1820), o alcalóide quinino é isolado a partir da cinchona (*Cinchona succirubra*), *Chinchona spp.*, pelos químicos franceses Pierre Pelletier e Joseph Caventou (Kwast *et al.*, 2002). A partir da estrutura do quinino foram desenvolvidos vários análogos como a cloroquina a mefloquina ou a amodiaquina (Rieckmann *et al.*, 1987; Peto & Gilks, 1986). Este é o grupo de antimaláricos, com maior expressão no tratamento e profilaxia da malária, quer em mono terapia (ex.: quinino) ou em combinação terapêutica com compostos quimicamente não relacionados (ex.: mefloquina/artemeter).

As quinoleínas apresentam uma acção selectiva em relação aos estadios intraeritrocitários do parasita durante os quais se produz hemozoína: trofozoítos maduros e esquizontes (Orjih, 1997; Skinner *et al.*, 1996; Geary *et al.*, 1989). O seu mecanismo de acção ainda não se encontra esclarecido. Sendo consensual que interferem com a destoxificação dos produtos de degradação da hemoglobina, no vacúolo digestivo do parasita (Becker *et al.*, 2004c; Ginsburg, 2003; Famin & Ginsburg, 2002). A similaridade da estrutura química destes compostos, aumenta a probabilidade de existirem factores comuns entre os respectivos mecanismos de acção e resistência.

#### a) Cloroquina

A cloroquina é uma 4-aminoquinolina, a sua utilização era já generalizada durante os anos 40. Os estudos efectuados nas diferentes fases do ciclo de vida intra-eritrocitário de *P. falciparum*, apontaram o vacúolo digestivo, como o local de actuação deste antimalárico (Krogstad *et al.*, 1992; Zarchin *et al.*, 1986). A cloroquina, bem como outros fármacos quimicamente relacionados, actua por acumulação em concentrações elevadas no vacúolo digestivo do parasita, podendo atingir mais de 100 vezes as do plasma (Gligorijevic *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 1996a; Yayon *et al.*, 1984b; Aikawa *et al.*, 1972). No vacúolo interfere com a destoxificação dos grupos heme e a polimerização da hemozoína (Sullivan *et al.*, 1996a). Estudos realizados com parasitas de malária murina e *P. falciparum* mostraram que, a acumulação de cloroquina no vacúolo é menor em estirpes resistentes (Ursos *et al.*, 2000), que não se verifica



## Introdução

---

resistência cruzada com quinino e mefloquina (Geary & Jensen, 1983), que a menor acumulação se deve ao aumento do efluxo e não à diminuição da acumulação (Sanchez *et al.*, 2003; Krogstad *et al.*, 1987), e ainda que o verapamil<sup>6</sup> reverte (parcialmente) a acumulação no vacúolo e a sensibilidade à cloroquina (Martin *et al.*, 1987).

As duas aproximações experimentais, realizadas na tentativa de explicar os diferentes níveis de acumulação da cloroquina no vacúolo do parasita, resultaram na identificação de dois mecanismos genéticos distintos para explicar a acumulação da cloroquina na célula. Um é baseado em mutações no gene *pfcr1* (*P. falciparum chloroquine-resistance transporter*) (Fidock *et al.*, 2000b). O outro tem como base mutações gene *pfmdr1* (*P. falciparum multidrug-resistance 1*) (Wellems *et al.*, 1990), provavelmente um modelador dos níveis de resistência (Arav-Boger & Shapiro, 2005).

A análise do mapa de *linkage* da descendência do cruzamento de dois clones de *P. falciparum* HB3 X Dd2 (HB3 sensível à cloroquina e Dd2 resistente) realizado por Wellems e seus colaboradores (Wellems *et al.*, 1990), localizou o determinante de resistência à cloroquina no cromossoma 7. Posteriormente verificou-se que esta associação se devia a pelo menos uma mutação pontual na sequência do gene *pfcr1* (Fidock *et al.*, 2000b). Estudos posteriores identificaram varias mutações<sup>7</sup> no gene *pfcr1*, associadas à resistência a este antimalárico (Labbe *et al.*, 2001; Adagut & Warhurst, 2001; Durand & Le Bras, 2001; Fidock *et al.*, 2000b; Duraisingh *et al.*, 2000). A tradução da sequência que codifica o gene *pfcr1* resultou numa proteína, com dez segmentos transmembranares. Esta localiza-se na membrana do vacúolo digestivo, onde forma um canal de Cloro que reduz os níveis de cloroquina no vacúolo. Reduzindo desta forma a acumulação de grupos heme livres e a citotoxicidade (Arav-Boger & Shapiro, 2005; Waller *et al.*, 2003). O mecanismo pelo qual o produto de *pfcr1* reduz os níveis de cloroquina no vacúolo não se encontra ainda esclarecido. O gene homólogo de *pfcr1* em *P. vivax*, não está associado ao fenótipo de resistência à cloroquina (Nomura *et al.*, 2001).

O mecanismo que envolve o gene *pfmdr1* é baseado na observação de que o verapamil pode reverter a resistência à cloroquina impedindo o efluxo do fármaco (Krogstad *et al.*,

---

<sup>6</sup> Verapamil inibidor da calmodulina, compete com os fármacos pelos receptores do transportador.

<sup>7</sup> Estão identificadas 11 mutações no gene *pfcr1* relacionadas com resistência à cloroquina, códões 72, 74, 75, 76, 144, 160, 220, 271, 326, 356 e 371.

1987; Martin *et al.*, 1987). Em *P. falciparum* foi localizada na membrana do vacúolo digestivo uma proteína da super-família ABC (ver I.3) a Pgh1 (produto do gene *pfmdr1*) (Cowman *et al.*, 1991) a qual está relacionada com a resistência à cloroquina (Reed *et al.*, 2000a). Está demonstrado que alterações de a.a. nesta proteína podem conduzir a alterações na acumulação de cloroquina (van Es *et al.*, 1994b).

### **b) Amodiaquina**

A amodiaquina, uma 4-aminoquinoleína com uma estrutura química muito semelhante à cloroquina, é também muito utilizada no tratamento de malária. Sendo ainda eficaz em algumas áreas endêmicas (Barennes *et al.*, 2004), em África é considerada uma alternativa economicamente viável, à cloroquina (Ochong *et al.*, 2003a; Aubouy *et al.*, 2003). Esta quinoleína é actualmente usada em combinação terapêutica com o artemeter (Talisuna *et al.*, 2004; Barennes *et al.*, 2004; Molta *et al.*, 2003; Checchi *et al.*, 2002).

Tal como a cloroquina, a amodiaquina é acumulada no vacúolo digestivo do parasita inibindo a polimerização dos grupos heme (Ginsburg *et al.*, 1998; Fitch *et al.*, 1974). Os mecanismos de resistência do parasita a estes dois antimaláricos apresentam aspectos em comum (Basco & Le Bras, 1992). Um estudo *in vivo* efectuado por (Ochong *et al.*, 2003a), no Sudão, demonstrou uma forte associação entre um dos polimorfismos do gene *pfcr1* e o fenótipo de resistência à amodiaquina, o que reforça a similaridade entre ambos os mecanismos. Em contrapartida, no mesmo estudo não foi identificada nenhuma associação do gene *pfmdr1* a este fenótipo (Ochong *et al.*, 2003a).

### **c) Quinino**

Este composto é um alcalóide, apresentando um efeito tóxico sobre os estadios intraeritrocitários: trofozoíto maduro e esquizonte. A sua utilização tem sido limitada ao tratamento de malária grave, não sendo habitualmente utilizado como profilático, pois apresenta vários efeitos secundários adversos. Continua, no entanto, a ser o fármaco de eleição no tratamento de malária grave ou em casos de resistência a múltiplos fármacos (Roche *et al.*, 2003).

O quinino interfere com o processo de digestão da hemoglobina pelo parasita (Geary *et al.*, 1986). O mecanismo de resistência a este composto, ainda não se encontra clarificado, no entanto, estudos de transfecção demonstraram que as mutações no gene

*pfmdr1*, nos codões 1034, 1042 e 1246, podem estar associadas à resistência ao quinino (Reed *et al.*, 2000a; Ward & Bray, 2000). Existem algumas evidências de que alteração do número de cópias e dos níveis de expressão do gene *pfmdr1*, podem também influenciar a diminuição da susceptibilidade ao quinino (Ferdig *et al.*, 2004a; Burke *et al.*, 2003; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Em pesquisas de genes e/ou transportadores associados à resistência a antimaláricos, os genes *pfmrp1* e *pfcr1* foram identificados como genes potencialmente envolvidos na resposta ao quinino. Mutações pontuais nestes genes podem constituir um factor necessário mas não suficiente para justificar a capacidade do parasita para resistir a este fármaco (Sisowath *et al.*, 2005; Mu *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2002). Um estudo recente demonstrou que os cromossomas 5, 7 e 13 contêm genes que potencialmente contribuem para as variações na resposta do *P. falciparum* ao quinino (Ferdig *et al.*, 2004b).

### **d) Mefloquina**

A mefloquina é um composto com estrutura química semelhante ao quinino ou à cloroquina (Peters, 1985; Peters *et al.*, 1977). No entanto é bastante lipofílico, talvez por este motivo não se detectem elevadas concentrações de mefloquina no vacúolo digestivo do parasita, indicando a possibilidade de existir um local de acção distinto (Foley & Tilley, 1997). Este facto parece ainda sugerir que a acumulação de fármaco na célula, não será o factor determinante da sua actuação.

O mecanismo de resistência à mefloquina tem sido associado ao aumento do número de cópias do gene *pfmdr1* (maior ou igual a 3) (Price *et al.*, 2004; Pickard *et al.*, 2003; Begum *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001), bem como ao aumento de expressão do produto deste gene, a proteína Pgh1 (Peel *et al.*, 1994; Cowman *et al.*, 1994). Em isolados provenientes do Sudeste Asiático, o fenótipo de resistência à mefloquina é um fenómeno reversível pelo verapamil, no entanto em isolados africanos este fenómeno não se verifica (Basco *et al.*, 1995). A discrepância entre os resultados publicados, relativamente ao mecanismo de resistência inerente à mefloquina, indica como provável que este fenótipo surja como resultado da combinação de vários factores ou mecanismos (Frederich *et al.*, 2002).

Em conjunto, as observações expostas sugerem que o fenótipo de resistência aos fármacos da classe das quinoleínas, em especial à cloroquina, é o resultado de um fenómeno multi-factorial (ou multi-génico) que continua por esclarecer e que pode ser diferente entre os principais fármacos desta classe (cloroquina, mefloquina e quinino) (Le Bras & Durand, 2003b; Zalis *et al.*, 1998).

### **I.2.4 - Aspectos metabólicos de *P. falciparum* associados à susceptibilidade a antimaláricos do grupo das quinoleínas**

Apesar dos modos de actuação da maioria dos antimaláricos ainda não estarem completamente esclarecidos (Hayton & Su, 2004), alguns deles encontram-se já associados a determinadas vias metabólicas do parasita, nomeadamente: **(a)** a ingestão e metabolização da hemoglobina, e o metabolismo redox, aos quais parece estar associado o modo de actuação da cloroquina, amodiaquina, mefloquina, quinino, artemisinina e seus derivados, inibindo os mecanismos de destoxificação dos grupos ferriprotoporfirina IX (FP-IX); **(b)** a síntese de ácidos nucleicos à qual está também associado o modo de acção dos antifolatos (pirimetamina e sulfamidas) e **(d)** a síntese proteica que parece ser inibida pela acção dos antibióticos com actividade antimalárica.

#### **I.2.4.1 - Stress oxidativo em *Plasmodium falciparum*, resultante da ingestão e metabolização da hemoglobina no vacúolo digestivo do parasita**

A vida em aerobiose requer a manutenção de um ambiente redox intracelular apropriado, de forma a minimizar a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), tais como aniões superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilo (OH), os quais danificam os ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e membranas (Imlay & Linn, 1987). A primeira linha de defesa é constituída pelas superoxidismutases, uma família de metaloproteínas que catalisam a dismutação de  $O_2^-$  para formar  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Schwartz *et al.*, 1999). O  $H_2O_2$  por sua vez é decomposto em  $H_2O$  e  $O_2$ , para prevenir oxidação de componentes celulares. Esta reacção é catalizada por enzimas como; catalases, glutatião peroxidases e tioredoxina peroxidases (Muller, 2004a; Wood *et al.*, 2003; Rahlfs & Becker, 2001; Clairmont *et al.*, 1999).

## Introdução

---

Os parasitas da malária são particularmente vulneráveis ao stress oxidativo durante os estádios intra-eritrocitários (Becker & Kirk, 2004; Muller, 2003a; Simoes *et al.*, 1992b; Hunt & Stocker, 1990a). Isto deve-se ao facto de o parasita viver num ambiente rico em Oxigénio (O<sub>2</sub>) e Ferro (Fe), condições favoráveis à formação de ROS via a reacção de Fenton<sup>8</sup>. A principal fonte de ROS em *P. falciparum* durante os estádios intraeritrocitários, é a digestão da hemoglobina proveniente do hospedeiro, no vacúolo digestivo (VD) do parasita (Becker & Kirk, 2004; Muller, 2003a; Simoes *et al.*, 1992b; Hunt & Stocker, 1990b).

### Digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo do parasita

A elevada toxicidade dos grupos heme livres na célula, deve-se sobretudo a este ser um composto, bastante reactivo que, danifica o DNA, desestabiliza membranas e inactiva enzimas, comprometendo a manutenção fisiológica da célula (Gluzman *et al.*, 1994; vander Jagt *et al.*, 1992). Ao contrário dos mamíferos, os quais destoxificam os grupos heme abrindo o anel enzimaticamente e por glucoronidação, o parasita recorre a um mecanismo enzimático de destoxificação celular, polimerizando os grupos heme, produzindo uma matriz cristalina, quimicamente inerte, não tóxica designada por hemozoína (pigmento malárico) (Slater *et al.*, 1991) a qual é armazenada no vacúolo digestivo (Olliaro, 2001).

A digestão da hemoglobina constitui uma fonte necessária de aminoácidos, liberta espaço para o parasita se desenvolver e contribui para a manutenção da pressão osmótica do eritrócito (Lew *et al.*, 2003). No entanto a degradação da hemoglobina é um processo metabólico que gera grandes quantidades de ferriprotoporfirina IX (FP-IX) e ROS (Papalexis *et al.*, 2001a). O pH ácido do vacúolo (estima-se pH 5.2; (Spiller *et al.*, 2002; Ursos *et al.*, 2001; Yayon *et al.*, 1984a), provoca a oxidação espontânea do ião Fe<sup>2+</sup> em Fe<sup>3+</sup> com a formação de aniões superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

O parasita *P. falciparum* degrada pelo menos 75% da hemoglobina do eritrócito durante o seu desenvolvimento intra-eritrocitário (Krugliak *et al.*, 2002; Loria *et al.*, 1999). A maior parte dos FP-IX sofrem biomineralização (até 90%;(Egan *et al.*, 2002) originando hemozoína. No entanto uma parte dos FP-IX (que pode ir até 50% segundo (Zhang *et*

---

<sup>8</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup> + Fe<sup>3+</sup> → O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> / Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Fe<sup>3+</sup> + OH<sup>-</sup> + OH<sup>-</sup>

*al.*, 1999; Loria *et al.*, 1999) escapam à biomineralização difundindo para o citoplasma do parasita seguindo o gradiente de concentração (Becker *et al.*, 2004a; Atamna & Ginsburg, 1993). Mesmo uma fracção (0,5%) do total de FP-IX na célula (que pode ir até 20 mM), é suficiente para inibir enzimas do parasita (Campanale *et al.*, 2003; Famin *et al.*, 1999), causar peroxidação dos lípidos, alterar a estabilidade das membranas (Loria *et al.*, 1999) bem como lisar o eritrócito hospedeiro (Zhang & Hempelmann, 1987).

### I.2.4.2 - Sistemas antioxidantes em *Plasmodium falciparum*

Em *P. falciparum*, a manutenção do equilíbrio intracelulares de ROS envolve reacções enzimáticas que incluem enzimas dos sistemas de defesa antioxidante dependentes da superoxidodismutase, do glutatião e das tioredoxinas, estando as suas contribuições relativas ainda por definir (Harwaldt *et al.*, 2002; Kanzok *et al.*, 2000). Os FP-IX livres (que escapam à a biomineralização) no citoplasma do parasita podem sofrer reacções de oxiredução e gerar iões superóxido ( $O_2^-$ ). Estes aniões, resultam da oxidação do ferro da hemoglobina. São destoxificados pela superoxidodismutase (SOD) para originar  $H_2O_2$  (Figura I.5), ou podem reagir de forma espontânea com o  $H_2O_2$  conduzindo à formação de radicais hidroxilo (OH). A protecção das células dos ROS requer a manutenção de uma concentração adequada de tiois intracelulares nomeadamente de glutatião reduzido (GSH) pelo NADPH. A glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) cataliza o passo limitante na via biossintética das pentoses de fosfato (PPP), responsável pela síntese de NADPH (Abdin *et al.*, 2003). Em células de mamíferos não nucleadas, nomeadamente eritrócitos, a G6PD é essencial na protecção contra ROS ao nível do citoplasma (Beutler, 1996; Luzzatto, 1995).

No parasita assim como no hospedeiro, a via das PPP é essencial para a neutralização de ROS durante a infecção de eritrócitos por *Plasmodium*. De acordo com esta observação está o facto de que a actividade da PPP se encontra aumentada em eritrócitos infectados comparativamente com não infectados, sendo a PPP do parasita responsável por 82% desta actividade (Nagata *et al.*, 2000). Em *Plasmodium spp.* não estão identificadas catalases (Sztajer *et al.*, 2001).



Em síntese os sistemas antioxidantes em *Plasmodium falciparum* englobam: Superoxidodismutases, Destoxificação dependente de glutatião e Destoxificação dependente de tioredoxinas.

### I.2.4.2.1 – Superoxidodismutases

As superoxidodismutases (SODs) catalisam a dismutação dos aniões superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e oxigénio  $O_2$  (Schwartz *et al.*, 1999). Os parasitas da malária têm uma Fe-SOD (Gratepanche *et al.*, 2002) e uma Mn-SOD (Ranz & Meshnick, 1989)(Figura I.5). Este facto transforma as SODs em potenciais alvos terapêuticos (Turrens, 2004). O facto do seu substrato ser uma molécula bastante pequena ( $O_2^-$ ), tem dificultado a identificação de análogos que permitam a inibição selectiva, apenas das SODs dos parasitas (Muller, 2004b; Schwartz *et al.*, 1999).

Dado que a Fe-SOD é uma proteína citosólica, é pouco provável que actue sobre os aniões superóxido gerados dentro do vacúolo digestivo durante a digestão da hemoglobina. As SODs do hospedeiro parecem continuar funcionantes mesmo no interior do vacúolo digestivo do parasita (Fairfield *et al.*, 1988; Fairfield *et al.*, 1988; Stocker *et al.*, 1985). No entanto, o papel destas SODs na destoxificação de  $O_2^-$  deve ser negligenciável (Ginsburg & Atamna, 1994a).

A segunda superoxidodismutase de *P. falciparum*, uma Mn-SOD localiza-se na mitocôndria (Sienkiewicz *et al.*, 2004; Ranz & Meshnick, 1989). A existência de uma cadeia respiratória activa (Kita *et al.*, 2002) a qual gera iões superóxido, torna imperativa a existência de uma SOD na mitocôndria do parasita, para evitar danos nas funções metabólicas, nos ácidos nucleicos, nas proteínas e membranas do organelo (Inoue *et al.*, 2003).

### I.2.4.2.2 - Destoxificação dependente de glutatião

A destoxificação do  $H_2O_2$  originado pelas superoxidodismutases de *P. falciparum* é exclusivamente realizada pelas peroxidases dependentes de tioredoxina e pela glutatião S-transferase, pois este parasita não possui catalase nem peroxidases dependentes de glutatião (Flohe *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2003).



## Introdução

---

O tripéptido glutatião (GSH ou glutamyl cistainil glicina), é uma das moléculas que mais contribui para a manutenção do equilíbrio redox intracelular em células aeróbias (Clairmont *et al.*, 1999). Para além do seu efeito tampão, actua também como cofactor de várias de enzimas (ex. glutatião reductase, glutatião S-transferase) (Clairmont *et al.*, 1999). A razão entre a sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG- dissulfito de glutatião) ou seja; [GSH]/[GSSG] é elevada (entre 10:1 e 100:1) e fundamental para manter o equilíbrio redox intracelular. A inactivação por reacção com glutatião<sup>11</sup>, constitui uma via essencial em *Plasmodium spp.* para minimizar os efeitos tóxicos dos FP-IX (Figura I.5) (Flohe *et al.*, 2003; Ginsburg & Golenser, 2003) (Becker *et al.*, 2003) (Ginsburg & Golenser, 1999). Em *P. falciparum*, esta razão parece ser dependente da síntese *de novo* de GSH, do efluxo de GSSG para fora do parasita e da acção concertada da glutatião reductase (PfGR) com o ciclo das pentoses de fosfato (Figura I.5) (Luersen *et al.*, 2000; Ayi *et al.*, 1998; Atamna & Ginsburg, 1997).

### Síntese *de novo* e transporte de glutatião

Os eritrócitos infectados com *P. falciparum* perdem a capacidade de realizar síntese *de novo* do tripéptido glutatião (GSH), devido à perda do intermediário  $\gamma$ -glutamyl cisteína, o qual difunde para fora da célula (Atamna & Ginsburg, 1997). Perdem ainda rapidamente o seu glutatião na forma oxidada (GSSG) devido à acção de bombas de efluxo de GSSG (Ayi *et al.*, 1998; Atamna & Ginsburg, 1997) (Meierjohann *et al.*, 2002b; Luersen *et al.*, 2000; Ginsburg *et al.*, 1998). Isto é compensado pelo transporte activo de GSSG através da membrana do parasita, efectuado pelas designadas bombas de efluxo de GSSG (Figura I.5) ( transportadores ABC do tipo MRP-*multidrug resistance associated protein* (Homolya *et al.*, 2003; Borst, 1999; Krauth-Siegel *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 1990), ver I.6.2.1). No citoplasma do eritrócito o GSSG é reduzido a GSH pela acção da glutatião reductase do hospedeiro.

#### a) $\gamma$ -glutamyl cisteína sintetase

*P. falciparum* possui a capacidade de realizar síntese *de novo* de GSH, o que contribui largamente para manter em equilíbrio as concentrações relativas de GSH/GSSG

---

<sup>11</sup> A ligação de FP-IX a proteínas como a HRP2 e HRP3 tem também vindo a ser propoosto como mecanismo adicional (Mashima *et al.*, 2002; Papalexis *et al.*, 2001b; Choi *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 1996a).

(Luersen *et al.*, 2000; Ayi *et al.*, 1998; Atamna & Ginsburg, 1997). A  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase (Pf $\gamma$ -GCS) cataliza o passo limitante da síntese de GSH em *P. falciparum* (Meierjohann *et al.*, 2002a; Luersen *et al.*, 2000) e cataliza a ligação do glutamato à cisteína (Figura I.5). Uma segunda enzima, a glutatião sintetase (PfGS), cataliza a adição de glicina para originar GSH (Meierjohann *et al.*, 2002c; Luersen *et al.*, 1999).

Na sequência nucleotídica dos genes que codificam a Pf $\gamma$ -GCS de diferentes clones de *P. falciparum*, foi identificado um número variável de repetições, as quais não ocorrem em outras espécies, como no gene que codifica a  $\gamma$ -GCS de *P. berghei* (espécie que infecta roedores) (Luersen *et al.*, 1999; Birago *et al.*, 1999). Aparentemente estas variações não estão associadas à resistência a antimaláricos nem à proveniência geográfica das amostras. A sua função não está ainda identificada (Luersen *et al.*, 1999).

### **b) Glutatião reductase**

A relação GSH/GSSG (10:1 a 100:1), é mantida sobretudo pela acção da glutatião reductase (PfGR), enzima responsável por manter o glutatião no seu estado reduzido (GSH) (Figura I.5) (Savvides *et al.*, 2002). O GSSG é reduzido a GSH pela acção da PfGR usando NADPH como dador de electrões. O NADP<sup>+</sup> resultante é reduzido a NADPH por enzimas do ciclo das pentoses de fosfato como a glucose-6-fosfato desidrogenase (Figura I.5) (Bohme *et al.*, 2000).

A estrutura primária da PfGR contém inserções no domínio de ligação ao FAD (a.a 123–134), no domínio central (a.a 314–347) e no domínio de interface dos domínio (a.a 496–499), que são específicas do parasita. A deleção experimental das duas primeiras inserções, afecta claramente a ligação ao grupo prostético-FAD e a estabilidade da proteína, respectivamente (Gilberger *et al.*, 2000). As estruturas da PfGR e da GR humana são similares. No entanto, a diferença ao nível do domínio de interface dos dímeros pode permitir o desenho de inibidores que se liguem especificamente neste local da proteína do parasita (Becker *et al.*, 2004b; Sarma *et al.*, 2003). Mesmo assim inúmeros estudos clínicos e epidemiológicos sugerem que a GR de *P. falciparum* constitui um potencial alvo para o desenvolvimento de novos antimaláricos (Grellier *et*

*al.*, 2001; Davioud-Charvet *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1988).

### c) Glutatião peroxidase

A proteína de *P. falciparum* identificada como glutatião peroxidase (PfGPX) (Gamain *et al.*, 1996b; Gamain *et al.*, 1996a) utiliza a tioredoxina como dador de electrões em vez de glutatião, na redução de peróxidos. No entanto, não é um membro da família das peroxidredoxinas (Sztajer *et al.*, 2001) (ver I.2.4.2.3 4). A sua reacção com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o GSH é menor do que a das peroxidases. O envolvimento do GSH na redução de peróxidos em *P. falciparum*, necessita assim de mecanismos alternativos como por exemplo a enzima glutatião S-transferase (PfGST) (cuja actividade peroxidásica dependente do GSH) (Harwaldt *et al.*, 2002).

### d) Glutatião S-transferase

Em geral, a glutatião S-transferase (GST), conjuga substâncias electrofílicas endógenas ou fármacos com GSH, por forma a serem transportados através da membrana por bombas de efluxo do tipo MRP (*multidrug resistance associated protein*), para fora da célula (Homolya *et al.*, 2003; Borst *et al.*, 1999). Este tipo de bombas transporta também GSSG (Sharma *et al.*, 2000; Suzuki & Sugiyama, 1998). A actividade da GST depende directamente da disponibilidade de GSH. Duma maneira geral em parasitas, as funções das GSTs incluem; (1) a ligação mais ou menos específica de substâncias electrofílicas ao GSH, (2) a função como ligandinas<sup>12</sup> e (3) a redução de hidroperóxidos dependente de GSH. As GSTs catalizam a conjugação de GSH ao centro electrofílico de compostos hidrofóbicos, destoxificando uma variedade de mutagénios, carcinogénios, moléculas farmacologicamente activas e moléculas endógenas resultantes do stress oxidativo (ex. produtos da peroxidação de lípidos).

Ao contrario do hospedeiro (humano), e mesmo de outros parasitas como *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi*, os quais contêm varias GST, *P. falciparum* apenas possui um gene que codifica uma GST (*pfgst*) (Nebert & Vasiliou, 2004; Renzoni *et al.*, 2004; Klokouzas *et al.*, 2003). Em *P. falciparum*, as funções fisiológicas da PfGST não estão

---

<sup>12</sup> Ligandinas são transferases que catalisam a adição de radicais alifáticos, aromáticos heterocíclicos e epóxidos ao glutatião (Mukanganyama *et al.*, 2002; Mukanganyama *et al.*, 2001).

completamente caracterizadas (Srivastava *et al.*, 1999). Esta enzima, representa mais de 1% total das proteínas celulares, podendo funcionar como efeito tampão *in vivo*, para prevenir os efeitos tóxicos dos FP-IX (Liebau *et al.*, 2002; Harwaldt *et al.*, 2002). Na presença de GSH, a PfGST funciona como ligandina para os grupos FP-IX. A PfGST possui também actividade peroxidásica, o que pode contribuir para a actividade peroxidásica dependente de GSH detectada em parasitas da malária (Fritz-Wolf *et al.*, 2003; Harwaldt *et al.*, 2002).

A estrutura primária da GST de *P. falciparum* (PfGST) apresenta semelhanças com as GSTs da classe Mu de mamíferos<sup>13</sup> (cerca de 37%) (Perbandt *et al.*, 2004; Fritz-Wolf *et al.*, 2003). A estrutura tridimensional, revelou uma porção C-terminal mais pequena em relação às GSTs da classe Mu de mamíferos, resultando numa maior acessibilidade dos substratos ao centro activo<sup>14</sup> centro activo hidrofóbico H-site (*hydrophobic binding pocket, H-site*) (Fritz-Wolf *et al.*, 2003). Assim, assume-se que a especificidade da GST de *P. falciparum* seja menor, permitindo a destoxificação duma maior gama de moléculas. Isto explicaria (em parte) o facto deste parasita apenas possuir um gene codificante de GST (*pfgst*).

Estas diferenças têm vindo a ser exploradas no desenho de inibidores específicos, com efeito algumas moléculas (ex. S-hexilglutatião) baseadas em péptidos, foram já testadas mas sem grande sucesso (Fritz-Wolf *et al.*, 2003).

### **I.2.4.2.3 - Destoxificação dependente de tioredoxinas**

O sistema de destoxificação dependente da tioredoxina em *Plasmodium falciparum* inclui: **1**- as proteínas da super-família das tioredoxinas (Rahlfs *et al.*, 2002c; Krnajski *et al.*, 2001a; Kanzok *et al.*, 2000); **2** - a tioredoxina reductase (PfTrxR); **3** - e as peroxiredoxinas (Flohe *et al.*, 2003; Krnajski *et al.*, 2001b; Rahlfs & Becker, 2001; Kawazu *et al.*, 2001; Kawazu *et al.*, 2000).

---

<sup>13</sup> Com base na sua sequência aminoacídica e especificidade de substratos, as glutatião S-transferases citosólicas dos mamíferos foram divididas em sete classes: *Alfa*, *Mu*, *Pi*, *Teta*, *Zeta*, *Sigma* e *Omega*. A GST mitocôndrial designa-se *Kappa*. Estudos efectuados em organismos não mamíferos revelaram existência de mais classes distintas como a *Beta* em bactérias, a *Phi* e *Tau* em plantas, e a *Delta* em insectos (Sheehan *et al.*, 2003; Salinas & Wong, 1999).

<sup>14</sup> É a porção C-terminal da proteína quem restringe estruturalmente o acesso dos substratos ao centro activo das enzimas da classe *Mu* em mamíferos.

### 1 - Proteínas da super-família das Tioredoxinas

Esta é uma super-família de proteínas pequenas (cerca de 13 kDa), caracterizadas por possuírem o típico motivo Cys-X-X-Cys (em que X representa qualquer a.a.) (Rahlfs et al., 2003; Rahlfs et al., 2002c). A nível da sua estrutura primária, são pouco semelhantes entre si, sendo no entanto estruturalmente relacionadas e tendo funções similares na célula (Fernandes et al., 2004; Prieto-Alamo et al., 2000). São considerados mensageiros redox, que interactuam com diversas proteínas implicadas na resposta ao stress oxidativo, como as ribonucleótido reductase<sup>15</sup>, factores de transcrição, peroxidases, ciclofilinas<sup>16</sup> e tiois de baixo peso molecular (ex.: glutatião ou A N-acetil-L-cisteína<sup>17</sup>) (Fernandes et al., 2004; Kolaczowski et al., 2003; Prieto-Alamo et al., 2000).

Em *P. falciparum* estão caracterizadas 3 proteínas da super-família das tioredoxinas, a tioredoxina (PfTrx1), a glutaredoxina (PfGrx1), e a plasmoredoxina (Plrx); estão ainda identificados 6 outros genes que codificam para hipotéticas proteínas desta super-família.

#### a) Tioredoxina

A tioredoxina (PfTrx-1) de *P. falciparum* possui o motivo Cys-Gly-Pro-Cys, típico das tioredoxinas (Rahlfs et al., 2002b; Krnajski et al., 2001a; Kanzok et al., 2000). Estão ainda identificados 4 genes que codificam para hipotéticas proteínas do tipo tioredoxina (*Thioredoxin-like proteins*)<sup>18</sup> neste parasita. A proteína PfTrx-1 fornece equivalentes redutores para as peroxidases e ribonucleótido reductases e é ainda reduzida pela tioredoxina reductase (PfTrxR, ver I.2.4.2.3 2). Foi detectada a redução não enzimática de GSSG pela PfTrx-1. Com base nesta observação, demonstrou-se que este sistema não enzimático dependente de PfTrx-1, suporta elevados fluxos de GSSG (Kanzok et al., 2000), o que o torna particularmente eficiente em parasitas da malária (Kanzok et al.,

---

<sup>15</sup> Um complexo proteico que converte ribonucleotídeos difosfato em dioxiribonucleotídeos difosfato. Este complexo requer tioredoxina, tioredoxina reductase, e NADPH, e é crucial na síntese de DNA.

<sup>16</sup> Ciclofilinas são uma família de isomerasas, que se ligam à ciclosporina (antibiótico com actividade reguladoras do sistema imunitário; imunossupressor) Em *P. falciparum* inibem o crescimento intraeritrocitário dos trofozoítos (Kumar et al., 2005; Gavigan et al., 2003).

<sup>17</sup> NAC é um tiól de baixo peso molecular, produto endógeno do metabolismo da cisteína.

<sup>18</sup> PfTrx-1, gene *pftrx1*, PF14\_0545; motivo Cys-Gly-Pro-Cys, localização citosólica; PfT1p-1, *Thioredoxin-like protein-1*, gene *t1p-1*, PF14\_0590, motivo Cys-Gly-Pro-Cys, localização citosólica; PfT1p-2, *Thioredoxin-like protein-2*, gene *t1p-2*, PF11250w, motivo Cys-Ala-Pro-Cys, localização citosólica; PfT1p-3, *Thioredoxin-like protein-3*, gene *t1p-3*, Chr.13 (MAL13P1.225), motivo Cys-Gln-Ala-Cys, localização não definida; PfT1p-4, *Thioredoxin-like protein-4*, gene *t1p-4*, PF10790w, motivo Cys-Lys-Pro-Cys, localização citosólica.

## Introdução

---

2002). A PfTrx-1 está directamente envolvida no efeito tampão sobre os ROS (ex.: redução não enzimática de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Rahlfs *et al.*, 2003), contribuindo desta forma para a defesa antioxidante do parasita, o qual não possui uma peroxidase dependente de glutatião nem catalase (Becker *et al.*, 2004c).

### b) Glutaredoxinas

Em geral as glutaredoxinas possuem o motivo Cys-Pro-Tyr-Cys, contribuem para a defesa celular do stress oxidativo, controlo da transcrição por via redox, apoptose (Collinson *et al.*, 2002; Prieto-Alamo *et al.*, 2000) e redução de GSSG (Dandrea *et al.*, 2002). Em *P. falciparum* está descrita uma 2-Cys glutaredoxina (PfGrx-1), e duas 1-Cys glutaredoxinas (PfGlp-1 e PfGlp-2)<sup>19</sup>, estas últimas, apenas possuem uma cisteína no motivo característico da super-família das tioredoxinas (Rahlfs & Becker, 2001). PfGrx-1 possui o motivo típico Cys-Pro-Tyr-Cys (Rahlfs & Becker, 2001), a sua função é dependente de glutatião, fornece equivalentes redutores à ribonucleótido reductase (Rahlfs & Becker, 2001) e actua como um eficiente reductor da plasmoredoxina (I.2.4.2.3 c)) (Nickel *et al.*, 2005).

Por comparação com a função de 1-Cys glutaredoxinas de outros organismos, em *P. falciparum* tem sido sugerido que estas participem na síntese de proteínas do grupo das proteínas contendo Ferro (Fe) e Enxofre (S) (Ballerini *et al.*, 2002) e na redução das pontes de dissulfito de proteínas, convertendo GSH em GSSG (Wang *et al.*, 2003; Shenton *et al.*, 2002). Os membros do grupo das 1-Cys glutaredoxinas possuem apenas uma cisteína conservada (Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 1999) e tal como a 1-Cys Grx de humanos é provável que interajam com a proteína cinase C. Os membros deste grupo são designados proteínas PICOT (*protein kinase C interacting cousin of thioredoxin*) e foram também descritos em bactérias, outros parasitas e plantas (Rahlfs & Becker, 2001; Isakov *et al.*, 2000).

### c) Plasmoredoxina

---

<sup>19</sup> 1-Cys Glutaredoxinas (*glutaredoxin-like protein-1*, PfGlp-1, gene *glp-1*, Chr.3 (MAL3P2.10), motivo Cys-Gly-Phe-Ser, localização mitocondrial); 1-Cys glutaredoxina-2 (*glutaredoxin-like protein-2*, PfGlp-2, gene *glp-2*, Chr.6 (MAL6P1.72), motivo Cys-Lys-Phe-Ser, localização citosólica).

A plasmoredoxina (Plrx)<sup>20</sup> (Becker *et al.*, 2003), outro membro da super-família das tioredoxinas, é bastante conservada e apenas foi identificada em parasitas da malária, sendo aparentemente exclusiva de *Plasmodium spp.* (Becker *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2003; Rahlfs *et al.*, 2003; Rahlfs & Becker, 2001). Esta proteína pode ser reduzida pelo glutatíão, mas é reduzida mais rapidamente por ditióis como no caso da tioredoxina ou glutaredoxina. À semelhança das outras proteínas da super-família das tioredoxinas identificadas em *Plasmodium spp.*, esta proteína reduz também a ribonucleótido reductase, mas a sua função exacta não se encontra definida (Nickel *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2003).

## 2 - Tioredoxina reductase

Tal como na tioredoxina reductase de mamíferos<sup>21</sup> (Williams *et al.*, 2000), a função do centro activo da tioredoxina reductase de *P. falciparum* (PfTrxR) (Becker *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1995), localizado na extremidade C-terminal da proteína, foi caracterizado como possuindo actividade redox (Williams *et al.*, 2000; Krnajski *et al.*, 2000; Gilberger *et al.*, 1998). O facto de a actividade da PfTrxR não ser dependente de Selénio (Se) e diferir no seu centro activo C-terminal (CGGGKC) da TrxR humana (Cys-Sec) representa uma boa possibilidade para o desenho de compostos com actividade anti-parasitária dirigida para o seu centro activo (Gromer & Gross, 2002; Williams *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2000).

Estudos de “knock out”<sup>22</sup>, demonstraram que PfTrxR é essencial para a sobrevivência dos estadios intra-eritrocitários de *P. falciparum* (Krnajski *et al.*, 2002). A inactivação da enzima resulta na morte do parasita, o que a torna num alvo potencial para antimaláricos (Krnajski *et al.*, 2002). Neste sentido foram seleccionadas de entre 350 000 compostos as bases insaturadas Mannich<sup>23</sup>, como promissores inibidores da PfTrxR (Davioud-Charvet *et al.*, 2003).

---

<sup>20</sup> Plasmoredoxina, gene *pfplrx*, PFC0166w, motivo Cys-Lys-Tyr-Cys, localização citosólica.

<sup>21</sup> A tioredoxina reductase em bactérias, fungos, plantas e em alguns protozoários parasitas como *Trichomonas vaginalis*, a proteína possui 35 kDa; enquanto que em mamíferos, insectos e *Plasmodium falciparum*, a tioredoxina reductase possui entre 55 e 60 kDa (Coombs *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2000). As análises filogenéticas revelaram que os dois grupos de proteínas não são evolutivamente relacionados. As tioredoxina reductase de elevado peso molecular (55 a 60 kDa) são mais próximas das glutatíão reductases (dos correspondentes organismos) do que das de baixo peso molecular (35 kDa) (Hirt *et al.*, 2002). Os mecanismos catalíticos de ambos os grupos são também distintos (Williams *et al.*, 2000).

<sup>22</sup> Termo informal, mas generalizadamente usado para referir a criação de um organismo mutante no qual, a função de um gene em particular foi completamente eliminada.

<sup>23</sup> Aminas cetónicas preparadas por condensação de uma cetona com formaldeído e amónia ou com uma amina primária ou secundária (resultado da reacção química de Manich). Uma serie de bases de Manich de 4-aminoquinolinas foram sintetizadas com base na amodiaquina. A sua actividade contra formas intraeritrocitárias de *P. falciparum in vitro* e de *P. berghei in vivo*, foi também testada (Raynes *et al.*, 1999).

### 3 – Peroxiredoxinas

As peroxiredoxinas são enzimas ubiquitárias que exercem a sua actividade reductora através das Cisteínas (Cys) do seu centro activo. O número de Cys presentes no centro activo separa estas proteínas em classes: as 2-Cys peroxiredoxinas típicas, as 2-Cys peroxiredoxinas atípicas e as 1-Cys peroxiredoxinas (Wood *et al.*, 2003).

Grande parte da capacidade de destoxificação por peroxidação em *Plasmodium spp.* parece dever-se à acção das peroxiredoxinas (Nickel *et al.*, 2005; Kawazu *et al.*, 2005). Em *P. falciparum* foi descrita pelo menos uma 1-Cys peroxiredoxina (Krnajski *et al.*, 2001b; Kawazu *et al.*, 2000) e duas peroxiredoxinas da família das 2-Cys peroxiredoxinas típicas (uma citosólica e outra mitocôndrial) (Krnajski *et al.*, 2001b; Kawazu *et al.*, 2001) (Rahlfs & Becker, 2001).

#### a) 2-Cys peroxiredoxina citosólica

A 2-Cys peroxiredoxina citosólica (Pf2-CysPx) é dependente da tioredoxina. (Figura I.5). Os parâmetros cinéticos da redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* desta enzima, sugerem um papel crucial como peroxidase de hidroperóxidos *in vivo* (Akerman & Muller, 2003). A sua eficiência na redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qualifica-a como uma das peroxiredoxinas mais eficientes. Isto é consistente com o facto de *P. falciparum* não possuir uma glutatião peroxidase típica (ver I.2.4.2.2 c) nem uma catalase. Na ausência destas enzimas, era previsível que o parasita dependesse em grande parte das peroxiredoxinas para reduzir os ROS. No entanto, estudos de *knock out*, indicam que parasitas com o gene que codifica a Pf2-CysPx inactivado, são viáveis e apenas ligeiramente mais susceptíveis ao stress oxidativo, do que os parasitas com o gene não inactivado (Komaki-Yasuda *et al.*, 2003).

#### b) 1-Cys peroxiredoxina

A 1-Cys peroxiredoxina (Pf1-CysPx) é dependente da tioredoxina (ver I.2.4.2.3 a)) (Rahlfs & Becker, 2001). Localizada no citosol, a importância desta enzima na resposta ao stress oxidativo em *P. falciparum*, é dúbia. Embora se tenha detectado, um elevado nível de expressão do gene (*pfl-CysPx*) correspondente ao longo do ciclo



intraeritrocitário (Le Roch *et al.*, 2003a), a sua função efectiva na redução de ROS permanece desconhecida. É também desconhecido o agente redutor desta peroxiredoxina, embora existam observações indicando que, em concentrações elevadas o glutatião pode actuar como dador de electrões (Kawazu *et al.*, 2000). Alguns estudos sugerem as ciclofilinas, e o glutatião como dadores de electrões para proteínas homólogas em outros eucariótas (Aracena *et al.*, 2005; Aksenov *et al.*, 1998; Hoffmann & Handschumacher, 1995).

### **I.2.4.3 - Contribuição da mitocôndria e apicoplasto para o equilíbrio redox em *Plasmodium falciparum***

As formas asexuadas dos estádios intraeritrocitários de *P. falciparum*, vivem num ambiente pobre em oxigénio e dependem da glicólise para produção de ATP (Jacobasch *et al.*, 1990). A sua mitocôndria não tem actividade de fosforilação oxidativa e a cadeia transportadora de electrões é incompleta; no entanto fornece reacções redox com relevância metabólica (Bannister *et al.*, 2000). Uma delas é a ligação do citocromo c reductase (complexo citocromo b/citocromo c1) à dihidrooroato desidrogenase, uma enzima chave na síntese de nucleótidos. É neste ponto que actua a atovaquona<sup>24</sup> inibindo o transporte de electrões (Fry & Beesley, 1991).

Embora a cadeia respiratória do parasita seja menos activa do que a de células de mamíferos (Fry & Beesley, 1991), gera iões superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Estes necessitam de ser destoxificados. Em *P. falciparum* está identificada uma superoxidodismutase dependente de Manganês (Mn-SOD). Não se encontra descrita a forma como é reduzido o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultante da sua actividade dentro da mitocôndria. No entanto está descrita um peroxiredoxina localizada na mitocôndria a 2-Cys peroxiredoxina (Rahlfs & Becker, 2001) e encontra-se anotado nas bases de dados PlasmoDB e NCBI (MAL13P1.225 e AAQ05974) um gene codificante de uma possível tioredoxina mitocôndrial. Alguns autores referem que o ácido lipóico pode também fornecer equivalentes redutores para a destoxificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependente da tioredoxina (Perelman *et al.*, 2003), à semelhança do que se verifica em *Mycobacterium spp.* (Byun *et al.*, 2005). Em concordância, foi descrita a via biossintética do ácido lipóico localizada no apicoplasto (Waller *et al.*, 1998) de *P. falciparum*.

---

<sup>24</sup> Atovaquona antimalárico que em conjunto com o proguanil constituem a associação de dose fixa conhecida comercialmente como Malarone, usado no tratamento e profilaxia da malária.

Em *P. falciparum* foi identificada uma enzima do tipo glutatíon peroxidase, que usa preferencialmente tioredoxina e se localiza provavelmente no apicoplasto (Foth & McFadden, 2003; Foth *et al.*, 2003; Sztajer *et al.*, 2001).

Alguns antimaláricos actualmente em uso clínico (ex.: cloroquina e artemisinina) exercem a sua actividade, pelo menos em parte, aumentando o stress oxidativo no eritrócito infectado. Potenciais novos antimaláricos, que interferem com o metabolismo redox dos parasitas da malária incluem: antimaláricos que actuam por alquilação de grupos FP-IX e proteínas; inibidores de enzimas antioxidantes como glutatíon reductase e glutatíon S-transferase; e antraquinonas e xantonas as quais provavelmente interferem com a formação da hemozoína. Algumas destas enzimas, representam alvos terapêuticos promissores para o desenvolvimento de novos antimaláricos.

### **I.3 – Importância das proteínas ABC, no fenótipo de multiresistência**

São conhecidas mais de mil proteínas pertencentes à super-família das proteínas ABC, assim designadas por possuírem os característicos domínios de ligação ao ATP (ATP *Binding Cassete*). As funções fisiológicas dos transportadores ABC incluem, a captação de nutrientes e o transporte de agentes citotóxicos através da membrana celular, resultando na redução da acumulação intracelular de agentes citotóxicos (Szakacs *et al.*, 2006; Piddock, 2006; Cascorbi, 2006; Pradines *et al.*, 2005). Desempenham um papel determinante na modulação da absorção, distribuição e excreção de inúmeros compostos com actividade farmacológica e outras moléculas (Higgins, 1995). Estas últimas, incluem iões, lípidos, ácidos biliares, metais pesados, conjugados de glutatíon e pequenos péptidos (Dean & Allikmets, 1995; Kuchler *et al.*, 1992; Higgins, 1992). Em mamíferos, a especial importância destas proteínas é evidenciada pelos níveis elevados de expressão dos transportadores ABC, em barreiras farmacológicas como o epitélio das microvilosidades do intestino, ou na barreira hemato-encefálica (Cascorbi, 2006; Szakacs *et al.*, 2006; Borst & Elferink, 2002a; Klein *et al.*, 1999c).

Os transportadores ABC, podem ser encontrados em todos os seres vivos, sendo a sua importância médica muito abrangente. Estão na origem de doenças hereditárias (ex.:

## Introdução

---

síndrome de Dubin-Jhonson<sup>25</sup> ou Fibrose Quística<sup>26</sup>) bem como associadas à susceptibilidade às terapêuticas farmacológicas, de doenças tão diversas como o cancro, a SIDA ou a malária.

### a) Estrutura geral dos transportadores ABC

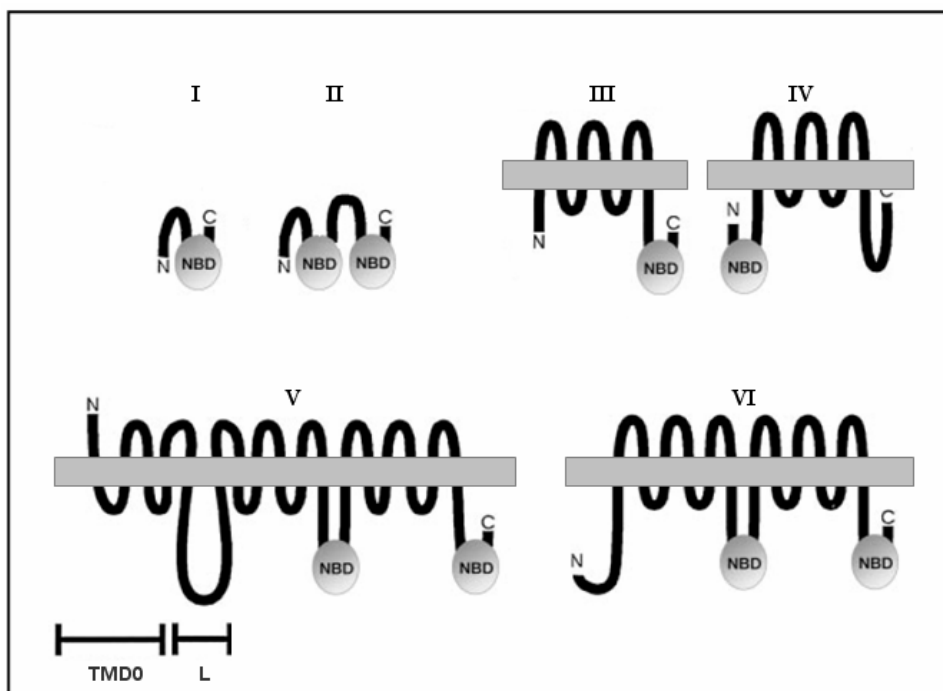
Os transportadores ABC são proteínas integrais de membranas, localizando-se na membrana plasmática ou nas membranas de organelos celulares. Medeiam o transporte entre compartimentos celulares ou para o meio extra celular. Sendo a sua actividade dependente da hidrólise de ATP (Conseil *et al.*, 2005; Conseil *et al.*, 2005; Deeley & Cole, 1997).

As proteínas ABC partilham uma arquitectura molecular semelhante, constituída pelos domínios transmembranares TMD (*transmembrane domain*) e pelos domínios de ligação ao ATP NBD (*nucleotide binding domain*) (Dean & Allikmets, 1995; Kuchler & Thorner, 1992; Higgins, 1992). Existem algumas excepções, as quais não possuem os domínios transmembranares (Figura I.6 I e II). As regiões transmembranares servem de âncora das proteínas à membrana e formam um canal/poro através do qual são transportadas moléculas várias. As hélices inseridas na membrana, encontram-se geralmente em grupos de 6 que, em conjunto, representam os TMD (Figura I.6, III, IV, V e VI) (Oswald *et al.*, 2006; Davidson & Chen, 2004).

---

<sup>25</sup> Síndrome de Dubin-Johnson é uma doença hepática caracterizada por hiperbilirrubinemia crónica. É hereditária, autossómica recessiva, originada por alteração do gene que codifica a proteína ABCC: MRP2 *multidrug resistance associated protein 2* (Wada *et al.*, 1998; Paulusma *et al.*, 1997).

<sup>26</sup> Fibrose Quística é uma doença autossómica recessiva, classicamente descrita como uma tríade: doença pulmonar obstrutiva crónica, insuficiência pancreática exógena e elevação das concentrações de sódio e cloreto no suor. O gene cujas mutações são responsáveis pelo síndrome, denomina-se *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* – CFTR (Barrett & Dharmasathaphorn, 1990).



**Figura I.6 - Modelos bidimensionais dos arranjos moleculares hipotéticos de proteínas ABC.** Neste esquema simplificado a membrana está representada como uma barra horizontal cinzenta, a linha a preto representa as hélices inseridas na membrana e ansas hidrofóbicas da proteína. Os NBD incluem os *Walker A* e *Walker B* os quais estão separados pela assinatura ABC. N- extremidade NH<sub>2</sub> proximal; C- extremidade COOH terminal; L- *linker* região de ligação do TMD0 ao TMD1 (**I**) - um único NBD (ex.: sub-família ANSA); (**II**) - dois NBD (ex.: sub-família GCN20); (**III**) - um TMD e um NBD em posição C-terminal (ex.: proteínas TAP da sub-família MDR/TAP); (**IV**) - um TMD e um NBD em posição N-proximal (ex.: sub-família *White*); (**V**) - TMD e dois NBD em posição C-terminal (ex.: sub-família MRP/CFTR)<sup>27</sup>; (**VI**) dois TMD e dois NBD em posição C-terminal (ex.: sub-família MDR/TAP) Os modelos bidimensionais dos arranjos moleculares hipotéticos de proteínas ABC apresentados, são baseados na análise teórica de perfis de hidrofobicidade da sequência de aminoácidos de diversas proteínas ABC (Cascorbi, 2006; Borst & Genest, 2006; Klein *et al.*, 1999c).

Na generalidade, a exigência estrutural mínima para um transportador ABC activo, parece ser de dois TMD e dois NBD (Jones & George, 1999). Esta combinação de domínios pode estar presente num mesmo polipéptido (Figura I.6, V e VI), ou como resultado de um complexo multiproteico (Figura I.6, III e IV) (Borst & Genest, 2006; Tamura *et al.*, 2005).

O NBD, com características hidrófilas, é constituído por uma sequência de cerca de 200 aminoácidos (a.a.) onde se identificam motivos conservados: *Walker A*, *Walker B* e assinatura ABC. Os dois motivos conservados denominados *Walker A* e *Walker B* (Walker & Brodie, 1982), encontram-se separados por uma sequência de aproximadamente 100 a.a a qual inclui uma região menor (16 a.a) conhecida como

<sup>27</sup> Uma revisão detalhada sobre a classificação, estrutura e função das proteínas ABC, pertencentes a cada uma das sub-família referidas como exemplo, pode ser encontrada em (Klein *et al.*, 1999c) e em (Cascorbi, 2006).

assinatura ABC (Jones & George, 1999; Higgins, 1992; Ames, 1990). Em conjunto, os *Walker A* e *B* (Walker & Brodie, 1982) e a assinatura ABC (Schmitt & Tampe, 2002) identificam a super-família das proteínas ABC: **Walker A** (sequência consenso descrita [GXXGXGKS/T]<sup>28</sup> em que X representa qualquer a.a.), **Walker B** (sequência consenso descrita [XXXXD], em que X representa qualquer a.a. hidrofóbico) e a **assinatura ABC** (sequência consenso descrita [LSGGQ]).

As sequências de ligação ao ATP representam regiões evolutivamente conservadas entre os membros da super-família ABC, apresentando níveis de homologia na ordem dos 30 a 40% ou superiores (Higgins *et al.*, 1997).

### I.3.1 – Resistência a múltiplos fármacos mediada por transportadores ABC

Nesta secção dedicaremos especial atenção à estrutura, dos transportadores ABC e respectiva função na modulação do fenótipo de resistência múltipla a fármacos ou multiresistência (MDR). O tipo de resistência, conhecido como MDR, caracteriza-se pela resistência celular cruzada a vários compostos estruturalmente diferentes. A importância dos transportadores ABC na defesa celular contra os fármacos citotóxicos<sup>29</sup>, foi observada pela primeira vez em 1973 por Dano (Dano, 1973). Mais tarde foi isolada uma glicoproteína (P-glicoproteína ou Pgp) na membrana plasmática de células com fenótipo MDR (Juliano & Ling, 1976). A Pgp é uma bomba de efluxo que transporta fármacos distintos, contra um gradiente de concentração usando a energia da hidrólise de ATP (Borst & Schinkel, 1997; Muller *et al.*, 1996).

Até à data, os estudos *in vitro*, têm revelado consistentemente que o principal mecanismo de MDR na maioria das linhas celulares de mamíferos envolve, a proteína Pgp (sub-família MDR/TAP), proteínas da sub-família MRP/CFTR (nomeadamente do tipo MRP - *multidrug resistance associated protein*) ou a proteína BCRP/MXR/ABC (sub-família *White*)<sup>30</sup>. O aumento de expressão de outros transportadores ABC, tem também vindo a ser detectado em linhas celulares seleccionadas *in vitro*, por pressão de diversos compostos (Szakacs *et al.*, 2006).

---

<sup>28</sup> No decorrer deste trabalho será usado o código IUPAC, uma letra para cada a.a., para designar as sequências proteicas.

<sup>29</sup> Na edição de Março de 2006 do periódico *Nature Reviews*, pode ser encontrada uma revisão da importância fisiológica e farmacológica das proteínas ABC nomeadamente em humanos (Szakacs *et al.*, 2006).

<sup>30</sup> Uma descrição detalhada das relações filogenéticas, doenças causadas por mutações e da importância na farmacocinética dos 48 transportadores ABC humanos, pode ser encontrada em (Szakacs *et al.*, 2006; Oswald *et al.*, 2006; Gottesman *et al.*, 2002; Dean *et al.*, 2001).

Os transportadores da sub-família MDR/TAP (nomeadamente Pgp), transportam moléculas hidrofóbicas com carga neutra ou ligeiramente positiva (Ishikawa, 1992b), enquanto que os MRPs (sub-família MRP/CFTR) transportam conjugados de moléculas hidrofóbicas com carga negativa, bem como uma variedade de compostos hidrofóbicos sem carga (não conjugados). O mecanismo de transporte de fármacos neutros pelos MRPs, não está clarificado, mas sabe-se estar ligado ao transporte ou ao efeito alostérico<sup>31</sup> do glutatião reduzido (GSH) (Cascorbi, 2006). Os substratos da proteína BCRP/MXR/ABC são variados. O estudo do seu transporte é dificultado pelo facto de variarem grandemente, em função das mutações que ocorrem na sua sequência (Cascorbi, 2006; Borst & Elferink, 2002b; Klein *et al.*, 1999a).

A demonstração de que o fenótipo de resistência de *P. falciparum* à cloroquina, pode ser modulado com o verapamil (Martin *et al.*, 1987), e que a mediação do fluxo de cloroquina é efectuada por transportadores dependentes de ATP (Krogstad *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1987) sugerem semelhanças com o fenótipo de multiresistência (*multidrug resistance* MDR) observado em células tumorais. Em *P. falciparum* foi localizada na membrana do vacúolo digestivo uma proteína da sub-família MDR/TAP a Pgh1 (produto do gene *pfmdr1*) (Cowman, 1991a), a qual está relacionada com a resistência à cloroquina e mefloquina (Reed *et al.*, 2000b; van Es *et al.*, 1994a).

Em pesquisas de genes e/ou transportadores associados à resistência a antimaláricos, o gene *pfmrp1* (sub-família MRP/CFTR) foi identificado como potencialmente envolvido na resposta ao quinino. Mutações pontuais neste gene podem constituir um factor necessário mas não suficiente para justificar a capacidade do parasita para resistir a este fármaco (Mu *et al.*, 2003).

### I.3.1.1 - Sub-família MDR/TAP (ABCD)

Um dos transportadores de múltiplos compostos mais estudado é a P-glicoproteína humana (Oswald *et al.*, 2006). O fenótipo MDR observado em células tumorais humanas é atribuído à expressão aumentada ou presença de mutações no gene codificante da Pgp (Gekeler *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 1987; Gros *et al.*, 1986).

---

<sup>31</sup> Regulação por modificações não-covalentes, chamada de alostérica. Em enzimas, quando a sua estrutura, é oligomérica ou seja composta de várias cadeias polipeptídicas, cada uma com um sítio ativo. A ligação do substrato ao centro ativo de uma das sub-unidades afecta a conformação das demais, facilitando a ligação dos substratos aos centros activos.

Experiências de transfecção com Pgp demonstraram que a proteína conferia um fenótipo MDR a células tumorais sensíveis (Gros *et al.*, 1986). Nos primeiros estudos em que foi descrita esta proteína, foi também demonstrado *in vitro*, a acção do verapamil<sup>32</sup> na reversão da resistência à daunomicina<sup>33</sup> (Dano, 1973) e a reversão da resistência à vincristina e vimblastina em leucemia P388 (*in vitro* e *in vivo*) (Tsuruo *et al.*, 1981). A reversão pelo verapamil é uma característica frequentemente observada em células com fenótipo MDR.

### I.3.1.2 - Sub-família MRP/CFTR (ABCC)

Os compostos tóxicos para os organismos, são frequentemente modificados por oxidação e/ou transformados em compostos mais solúveis em H<sub>2</sub>O por conjugação com glutatião (GSH), sulfatos ou glucoronato. Os conjugados resultantes são demasiado hidrofílicos para difundir através da membrana citoplasmática necessitando por isso de transportadores específicos (Borst & Elferink, 2002b). Estes transportadores são diferentes das P-glicoproteínas (P-gp), pois estas possuem afinidade preferencial por substratos hidrofóbicos neutros (Ishikawa *et al.*, 1997; Ishikawa *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1995).

Estudos *in vitro* e observações *in vivo* evidenciaram um fenótipo MDR não dependente de P-gp (Savas *et al.*, 1992; Eijdemis *et al.*, 1992; Ghosh *et al.*, 1992; Reeve *et al.*, 1990; Bourhis *et al.*, 1989; Slovak *et al.*, 1988; Mirski *et al.*, 1987). Susan Cole e colaboradores procederam à clonagem de um gene que codificava uma nova proteína ABC (humana) associada ao fenótipo MDR não relacionada com as proteínas da sub-família MDR/TAP, denominada MRP1 (*multidrug resistance associated protein1*) (Cole *et al.*, 1992a). A expressão aumentada do MRP1 humano tem sido demonstrada em algumas linhas tumorais humanas com fenótipo MDR, não dependente da P-gp (Choudhuri & Klaassen, 2006; Hipfner *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1997; Akimaru *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1994; Zaman *et al.*, 1993).

As proteínas do tipo MRP possuem uma topologia membranar comum, contendo dois TMD e dois NBD (tal como as MDR/TAP, Figura I.6 VI) (Borst *et al.*, 2000; König *et*

---

<sup>32</sup> Verapamil é um composto do grupo dos fármacos anti-arrítmicos. Usado no tratamento de arritmias cardíacas. Actua bloqueando os canais de Cálcio (Ca<sup>2+</sup>) das membranas. Como anti-arrítmico, bloqueia os canais de cálcio activados e inactivados nos miócitos condutores do coração. Compete com outros fármacos pelos transportadores de membrana da família das ABC (Pesic *et al.*, 2006; Cornwell *et al.*, 1987; Cohen *et al.*, 1981).

<sup>33</sup> A daunomicina, vincristina e vimblastina são citostáticos.

*al.*, 1999; Hipfner *et al.*, 1999; Flens *et al.*, 1994). Os MRPs dividem-se em dois grupos; os que possuem um TMD adicional, a nível da extremidade N-proximal (MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 e MRP7, indicado como TMD0 na Figura I.6.V), e os que não apresentam TMD0 (MRP4, MRP5, MRP8 e MRP9, Figura I.6.V) ((Borst & Genest, 2006). O TMD0 confere especificidade no transporte de alguns substratos<sup>34</sup> (Hipfner *et al.*, 1997).

### I.3.1.3 - Sub-família *White* (ABCG)

As proteínas do tipo *White* possuem um arranjo molecular pouco frequente, com o NBD numa posição N-proximal em relação à região transmembranar (Figura I.6, IV). Foi assim designado *White* por ser o arranjo correspondente ao gene *White* de *Drosophila melanogaster*. Em *D. melanogaster* a proteína correspondente, está envolvida no transporte dos precursores do pigmento do olho (Morgan, T.H., 1910<sup>35</sup>). Em humanos encontram-se identificadas duas proteínas deste tipo: a ABCG1<sup>36</sup> (ABC8/hwhite) (Croop *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996) e a ABCG2 (BCRP/MXR/ABC) (Doyle *et al.*, 1998) (Miyake *et al.*, 1999b; Miyake *et al.*, 1999a; Allikmets *et al.*, 1999).

A ABC8/hwhite desempenha um papel fundamental no transporte de triptofano e guanina. As designações da proteína ABCG2 humana BCRP (*breast cancer resistance protein*), MXR (*mitoxantrone resistance protein*), ABCP (*placenta-specific ABC gene*), resultam das diferentes aproximações que resultaram na sua identificação. Esta proteína está associada à resistência clínica à mitoxantrona. Várias linhas celulares humanas<sup>37</sup> apresentam aumento de expressão da ABCG2 quando seleccionadas por pressão da mitoxantrona. A análise do genoma de uma destas linhas (MCF-7), revelou amplificação do gene que codifica ABCG2 (Ross *et al.*, 1999). Experiências de transfecção usando esta mesma linha celular, demonstraram a associação de ABCG2 a fenótipos de

---

<sup>34</sup> Nomeadamente transporte de leukotrieno C<sub>4</sub> pelo MRP1 humano (Hipfner *et al.*, 1997).

<sup>35</sup> Morgan, T.H., *Sex limited inheritance in Drosophila*, *Science* 32 (1910) 120-122.

<sup>36</sup> A HUGO (*Human Gene Nomenclature Committee*) (Outubro de 1999) propõe uma nomenclatura em código que atribui uma letra a cada uma das oito sub-famílias de proteínas ABC humanas e de roedores, e um número individual a cada proteína (ex. ABCG2 pertence à sub-família *White* e é a proteína BCRP/MXR/ABC). A nomenclatura proposta por este comité não é unanimemente aceite. Para uma revisão actualizada da nomenclatura consultar (<http://www.med.rug.nl/Mdlhumanabc.htm>).

<sup>37</sup> MCF-7 - carcinoma da mama, S1 e HT29 – carcinoma do cólon, EPG85-257 - carcinoma gástrico, EPF86-079 – fibrosarcoma e 8226 – mieloma



resistência à mitoxantrona, daunorubicina e doxorubicina (Doyle *et al.*, 1998), o que indica um fenótipo de MDR.

### **I.3.2 - O papel das proteínas ABC, no fenótipo de resistência de *Plasmodium falciparum***

A demonstração de que a resposta a alguns antimaláricos do grupo das quinoleínas (como a cloroquina, a mefloquina ou o quinino), pode ser modulada pelo verapamil (Singh & Puri, 2000; Kyle *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1987) sugere semelhanças com o fenótipo de multiresistência (MDR) observado em células tumorais.

Genes homólogos ao que codifica a P-gp humana têm sido identificados em vários eucariotas unicelulares como *Entamoeba histolytica* (*ehpgp*), *Leishmania tarentolae* (*ltpgpA*), *Plasmodium falciparum* (*pfmdr1*) ou *Schizosaccharomyces pombe* (*ste6*) entre outros (Tabela I.1). O aumento da expressão de genes homólogos ao gene que codifica a Pgp humana, em parasitas unicelulares relaciona-se com frequência à resistência a agentes citotóxicos (ex. arsênico, vimblastina) (Borst & Ouellette, 1995).

## Introdução

**Tabela I.1 - Alguns exemplos de transportadores de membrana da super-família ABC e as respectivas funções celulares.**

| Proteína           | Sub-família ABC | Espécie               | Ref.   | Função   |
|--------------------|-----------------|-----------------------|--|--|
| Ehpgp1             | MDR/TAP         | <i>E. histolytica</i> | (Descoteaux <i>et al.</i> , 1995)                            | Resistência à hemeína (fármaco usado no tratamento da amebíase intestinal)   |
| LtpgpA             | MRP/CFTR        | <i>L. tarentolae</i>  | (Ouellette <i>et al.</i> , 1990)                             | Resistência a metais pesados   |
| PFGCN20            | WHITE           | <i>P. falciparum</i>  | (Bozdech <i>et al.</i> , 1996)                               | Provavelmente associada à regulação da tradução <sup>38</sup>                |
| Pgh1 <sup>39</sup> | MDR/TAP         | <i>P. falciparum</i>  | (Foote <i>et al.</i> , 1989)                                 | Associado à resistência à cloroquina   |
| Pgh2               | MDR/TAP         | <i>P. falciparum</i>  | (Rosenberg <i>et al.</i> , 2006; Zalis <i>et al.</i> , 1993) | Resistência ao Cádmi   |
| STE6               | MDR/TAP         | <i>S. pombe</i>       | (Hughes <i>et al.</i> , 1990)                                | Transporte de factores de conjugação   |
| YCF1               | MRP/CFTR        | <i>S. cerevisiae</i>  | (Kolaczowski <i>et al.</i> , 1996)                           | Resistência ao cádmio, multiresistência e bomba de conjugados de glutatião   |
| BPT1               | MRP/CFTR        | <i>S. cerevisiae</i>  | (Purnelle & Goffeau, 1997)                                   | Transporte vacuolar de bilirubina dependente de ATP                          |
| YBT1               | MRP/CFTR        | <i>S. cerevisiae</i>  | (Kolaczowski <i>et al.</i> , 1996)                           | Transporte de ácidos biliares  |
| MRP1               | MRP/CFTR        | <i>H. sapiens</i>     | (Cole & Deeley, 1998)  | Transporte de quimiostáticos hidrófobos e conjugados de fármacos             |
| MRP2               | MRP/CFTR        | <i>H. sapiens</i>     | (Wada <i>et al.</i> , 1998; Paulusma <i>et al.</i> , 1997)   | Excreção hepatobiliar de conjugados de orgânicos (síndrome de Dubin Johnson) |
| CFTR               | MRP/CFTR        | <i>H. sapiens</i>     | (Riordan <i>et al.</i> , 1989)                               | Canal de cálcio dependente de cAMP (Fibrose Quística)                        |
| MDR1               | MDR/TAP         | <i>H. sapiens</i>     | (Roninson <i>et al.</i> , 1986; Shen <i>et al.</i> , 1986)   | Transporte de compostos hidrófobos tóxicos através da membrana plasmática    |

**Nota:** Apenas se encontram listadas as principais funções de cada proteína, consideradas relevantes no âmbito do presente estudo.

Até à data de início do presente trabalho encontravam-se identificadas e caracterizadas 4 proteínas ABC em *P. falciparum*.

**1** - A proteína Pgh1 codificada pelo gene *pfmdr1* (Foote *et al.*, 1989) tem vindo a ser associada à resistência a diversos antimaláricos, nomeadamente da classe das quinoleínas. O gene *pfmdr1* é homólogo dos MDR de mamíferos. A participação de

<sup>38</sup> Bozdech e colaboradores em 1998 classificaram esta proteína como um bom candidato a exercer uma função na complexa rede de transporte que permite a sobrevivência intracelular de *P. falciparum*.

<sup>39</sup> Produto do gene *pfmdr1*, recentemente Reed e colaboradores (2000) referem que determinadas mutações nesta proteína conferem também resistência ao quinino, mefloquina e halofantrina e influenciam a sensibilidade à artemisinina.

## Introdução

---

*pfmdr1* no fenótipo de resistência a antimaláricos é descrito em detalhe na secção I.2.3.1 a).

2 - A proteína Pgh2 codificada pelo gene *pfmdr2* (Zalis *et al.*, 1993), até à data sem função claramente atribuída. O gene é também homólogo dos MDRs de mamíferos. Estudos independentes, mostraram que Pgh2 não está relacionada com resistência à cloroquina (Zalis *et al.*, 1993) mas sim aos metais pesados, nomeadamente ao Cádmio (Rosenberg *et al.*, 2006; Rubio & Cowman, 1994).

3 - A proteína PFGCN20 codificada pelo gene *pfgcn20* (Bozdech *et al.*, 1996) provavelmente associada à regulação da tradução<sup>40</sup> não possui qualquer relação previsível com resistência a antimaláricos, é um homólogo da proteína Gcn20 de leveduras (Vazquez de Aldana *et al.*, 1995).

4 - No decorrer do presente trabalho Klokouzas A. e colaboradores publicaram a caracterização de uma proteína codificada pelo gene *pfmrp1* (Klokouzas *et al.*, 2004). O gene é homólogo dos MRP de mamíferos.

Com a conclusão da sequenciação total do genoma de *P. falciparum* (Outubro de 2002) foram anotadas automaticamente 11 sequências candidatas a genes codificantes de transportadores ABC (Gardner *et al.*, 2002b). Em *P. falciparum*, apenas uma das quatro proteínas ABC caracterizadas (Pgh1) está comprovadamente relacionada com a resistência a fármacos antimaláricos, nomeadamente do grupo das quinoleínas. Grande parte dos parasitas que possuem o mesmo alelo de *pfmdr1* e *pfprt*, respondem de forma diferente à cloroquina e ao quinino (Cooper *et al.*, 2002; Djimde *et al.*, 2001; Fidock *et al.*, 2000a), indicando que outros genes estão implicados na modulação da resistência a estes fármacos.

### **I.3.3 – MRPs na defesa celular em *Plasmodium falciparum*, relação com a resposta ao stress oxidativo**

A sequência metabólica, da destoxificação de substâncias lipofílicas endógenas e de xenobióticos é conceptualmente constituída por: oxidação, conjugação com glutatião ou

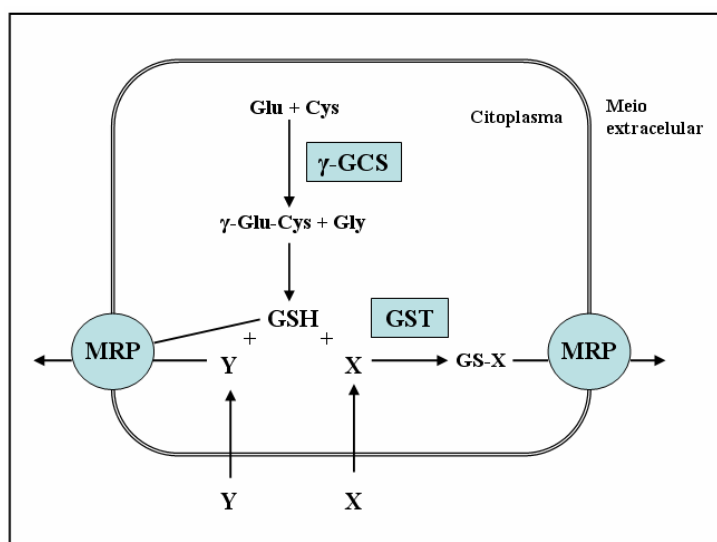
---

<sup>40</sup> Bozdech e colaboradores em 1998 classificaram esta proteína como um bom candidato a exercer uma função na complexa rede de transporte de moléculas, que permite a sobrevivência intracelular de *P. falciparum*.

## Introdução

grupos aniônicos alternativos e transporte dependente de ATP para o exterior da célula (Keppler *et al.*, 1999). Esta última, é de vital importância na homeostase celular (Ishikawa, 1992a).

O transporte de conjugados de glutatião, glucoronato, ou sulfato para fora da célula depende de ATP e é mediado por membros da sub-família MRP/CFTR (Buchler *et al.*, 1996). As proteínas MRP encontram-se localizadas na membrana plasmática, uma localização compatível com a sua acção na eliminação de fármacos e outros compostos xenobióticos, ou produtos do metabolismo celular (Konig *et al.*, 1999; Hipfner *et al.*, 1999). Os substratos destes transportadores são aniões orgânicos, de que são exemplo fármacos conjugados com glutatião<sup>41</sup>, ou sulfato<sup>42</sup> (Muller *et al.*, 1994; Leier *et al.*, 1994))(Konig *et al.*, 1999; Hipfner *et al.*, 1999; Leier *et al.*, 1996). Alguns fármacos, podem ser conjugados com o GSH pela glutatião-S-transferase (GST) e seguidamente exportados pelas proteínas do tipo MRP (ex. Y na Figura I.7); outros são co-transportados com o GSH<sup>43</sup> (ex. X na Figura I.7). Em ambos os casos, o transporte é dependente da síntese contínua de GSH, sendo o passo limitante desta síntese catalisado pela  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS) (Hopper *et al.*, 2001).



**Figura I.7 - Modelo ilustrando a inter-relação entre uma proteína do tipo MRP e o glutatião (GSH).** Alguns fármacos (X), podem ser conjugados com o GSH (GS-X) pela glutatião-S-transferase (GST) e seguidamente exportados pelas proteínas do tipo MRP, outros (Y) são co-transportados com o GSH. Em ambos os casos, o transporte é dependente da síntese contínua de GSH, sendo o passo limitante desta síntese catalisado pela  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS).

<sup>41</sup> MRP1 exporta conjugados de GSH com Metotrexato.

<sup>42</sup> MRP4 exporta preferencialmente conjugados de sulfato.

<sup>43</sup> Alcaloides da Vinca e as antraciclina, transporte pelo MRP2 (Evers *et al.*, 2000) e co-transporte do sal biliar taurocolato com GSH pelo MRP4 (Rius *et al.*, 2003).

## Introdução

---

Vários membros da sub-família MRP (ex. MRP1 humano e YCF1 de levedura), são reconhecidos transportadores de conjugados de GSH com xenobiontes, formados na designada fase 2 (conjugação) do processo metabólico de destoxificação (Keppler *et al.*, 1999; Keppler *et al.*, 1998). Em diferentes sistemas biológicos, o GSH tem um importante papel na defesa celular face ao stress oxidativo (Leier *et al.*, 1996; Keppler *et al.*, 1996). Em *Plasmodium spp.*, o GSH está potencialmente envolvido na inactivação de compostos electrofílicos, através da formação de conjugados de glutatião por uma reacção catalisada pela glutatião S-transferase (GST). O GSH serve também de agente redutor nas reacções catalisadas pelas peroxidases de glutatião dos peróxido de hidrogénio e hidroperóxidos orgânicos (Figura I.5). A oxidação do GSH a GSSG, sendo este excretado para o meio extra celular (Eklow *et al.*, 1984; Eklow *et al.*, 1981). Os membros da sub-família dos MRP têm um papel fundamental na regulação dos níveis intracelulares de GSSG e constituem um provável mecanismo de compensação do stress oxidativo intracelular (Figura I.5 e Figura I.7) (Keppler, 1999).

### I.4 - Objectivos gerais

O objectivo geral desta investigação é contribuir para o conhecimento dos mecanismos de resistência dos plasmódios (*P. falciparum*) ao nível molecular, de forma a direccionar o desenho de novos compostos ou associações de compostos contra alvos terapêuticos aqui estudados. Serão implementadas técnicas de cultura *in vitro* do parasita, adequando a mesma a estudos de expressão. Serão adaptadas técnicas várias de biologia molecular ao modelo da malária, mais concretamente no estudo das resistências.

#### I.4.1 - Objectivos específicos

**Objectivo 1** - Identificação de sequências candidatas a genes codificantes de proteínas ABC, no genoma de *Plasmodium falciparum*

Nos diferentes organismos onde os estudos em proteínas ABC foram mais aprofundados, encontrou-se sempre um número relativamente elevado destas proteínas. Assim sendo, e atendendo à complexidade do ciclo de vida e das alterações morfológicas do *P. falciparum*, é concebível que as proteínas ABC descritas até ao momento no parasita representem apenas uma minoria.

**Objectivo 2** - Clonar e caracterizar cDNAs candidatos a genes codificantes de transportadores ABC, nomeadamente da sub-família MRP/CFTR, e identificar as respectivas proteínas em *P. falciparum*.

a) Estudar a associação de alterações na sequência (mutações pontuais, inserções/delecções e amplificação génica) de genes identificados no presente trabalho aos fenótipos de resistência.

b) Estudar a expressão e localização das proteínas codificadas pelos genes isolados.

Os conjugados de GSH (GS-X), o GSSG e as substâncias xenobióticas (ou não) são demasiado hidrofílicos para difundir através das membranas, necessitando de transportadores específicos. Esta função de exportação é desempenhada pelos

## Objetivos

---

transportadores da sub-família MRP/CFTR. A expressão aumentada bem como a presença de mutações, em transportadores desta sub-família, tem sido associada em outros organismos a fenótipos de resistência ou/e multiresistência.

**Objectivo 3** - Caracterizar a resposta *in vitro* de *P. falciparum*, a fármacos de utilização regular e posteriormente, relacionar os resultados obtidos com alterações dos genes *pfygc*, *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1* nas mesmas (número de cópias dos genes, mutações pontuais e inserções/delecções de sequências de nucleótidos).

a) Identificação do grau de susceptibilidade *in vitro* de isolados de pacientes (infectados com *P. falciparum*) aos fármacos: cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino, utilizando os critérios da Organização Mundial de Saúde (O.M.S.), para a classificação das amostras dentro dos grupos “sensível” ou “resistente”.

Este estudo permite efectuar uma associação entre alterações nas sequências dos genes estudados e a resposta aos fármacos antimaláricos.

**Objectivo 4** - Avaliar a expressão de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo (com relevância para o metabolismo do glutationo) e dos genes codificantes de transportadores da sub-família MRP/CFTR identificados no presente trabalho em relação à resposta aos antimaláricos. Foram estudados os seguintes genes: *pfFe-sod*, *pfy-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-cysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* (ver Figura I.6) ao longo do ciclo intra-eritrocitário dos clones 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*.

a) Determinar o perfil de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pfy-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-cysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intra-eritrocitário dos clones 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*.

b) Avaliar a regulação da expressão de cada gene ao longo do ciclo intra-eritrocitário dos clones 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*.

c) Identificar a co-expressão de cada gene.





**Nota:** O capítulo sobre Material e Métodos é apresentado em secções: 1) material biológico utilizado na investigação; 2) descrição das técnicas, com detalhes laboratoriais; 3) metodologia da investigação realizada, complementando o ponto 2.

### II.1 - Material Biológico

#### II.1.1 - Isolados e clones clones de *Plasmodium falciparum*

Neste trabalho, o parasita *Plasmodium falciparum* foi mantido em cultura *in vitro* como modelo experimental. Os clones, previamente caracterizados quanto à resposta a antimaláricos (Tabela II.1), armazenados na colecção crio-preservada do Laboratório da UEI Malária/ Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, foram os seguintes: HB3, 3D7, K1 e Dd2.

**Tabela II.1 - Características dos clones de *P. falciparum* 3D7, Dd2, HB3 e K1.** CQ – cloroquina, Mef – mefloquina, QN – quinino, S - sensível, R – resistente, IC50 – concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitas, ? - Não está identificada a proveniência geográfica deste clone.

| Clone | Origem    | Referência                    | Fenótipo     |              |
|-------|-----------|-------------------------------|--------------|--------------|
|       |           |                               | S            | R            |
| HB3   | Honduras  | (Bhasin & Trager, 1984)       | CQ, Mef e QN | -            |
| 3D7   | ?         | (Rosario, 1981)               | CQ, Mef e QN | -            |
| Dd2   | Asiático  | (Oduola <i>et al.</i> , 1988) | -            | CQ, Mef e QN |
| K1    | Tailândia | (Thaithong & Beale, 1981)     | Mef e QN     | CQ           |

#### II.1.2 - Isolados de *Plasmodium falciparum*

Os isolados de *P. falciparum*, considerados no estudo da epidemiologia molecular dos genes *pfy-gcs*, *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2*, foram colhidos em diferentes zonas endémicas de malária: República Democrática de São Tomé e Príncipe, República de Angola e Tailândia.

#### II.1.3 - Estirpes de *Escherichia coli*

As estirpes de bactérias utilizadas neste trabalho, para a realização de clonagens foram as seguintes:

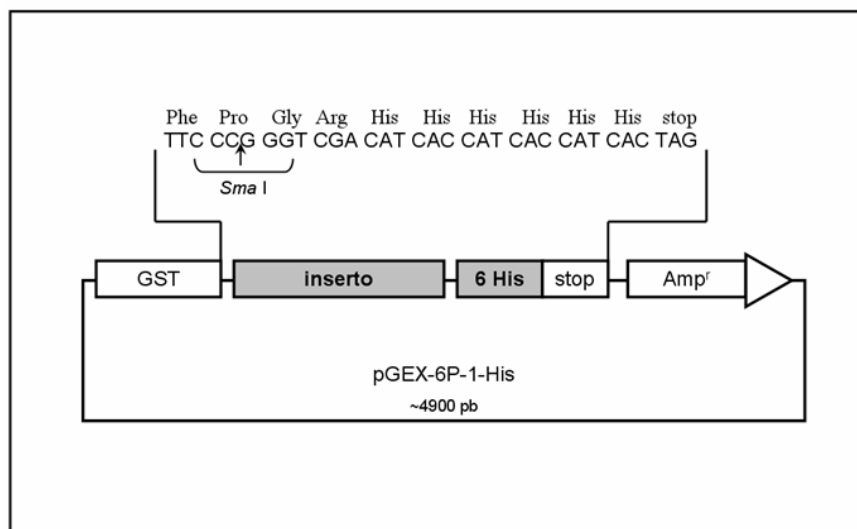
*E. coli* JM 109/SURE® - permite a replicação de DNA eucariótico de forma precisa, produzindo DNA de elevada qualidade para mini preparações.

*E. coli* BL21 - é uma estirpe modificada, caracterizada pela inativação dos genes que codificam as suas proteases. Assim, a probabilidade de ocorrer a proteólise das proteínas clonadas a expressar é menor.

As bactérias foram fornecidas pelo *Department of Molecular Parasitology and Molecular Epidemiology do Swiss Tropical Institute*, Basileia Suíça.

### II.1.4 - Vector de clonagem; plasmídeo pGEX-6P-1-His

O vector usado na clonagem, o pGEX-6P-1-His (Figura II.1), um vector multicópia, permite a construção de fusões genéticas com um fragmento de 6 histidinas numa extremidade (a qual vai permitir posteriormente purificar as proteínas recombinantes em coluna de resina com Níquel), e o gene da glutatíon S-transferase na extremidade oposta do fragmento de proteína recombinante codificada. Inclui um marca de selecção (o gene de resistência à ampicilina) a qual vai permitir seleccionar as colónias resultantes de bactérias transformadas. Possui ainda um promotor indutível pelo IPTG, que controla a expressão da proteína recombinante.



**Figura II.1 - Esquema representativo do vector de clonagem, o plasmídeo pGEX-6P-1-His.** GST - glutatíon S-transferase; 6 His – sequência de 6 histidinas; Amp<sup>r</sup> - gene de resistência à ampicilina; As características não relevantes para o objectivo do presente trabalho, foram omitidas neste esquema simplificado do vector.

O vector de clonagem foi fornecido pelo *Department of Molecular Parasitology and Molecular Epidemiology do Swiss Tropical Institute*, Basileia Suíça.

### II.2 - Descrição das técnicas.

Algumas técnicas foram usadas em mais do que um procedimento, no decorrer deste trabalho, tais como:

#### II.2.1 - Cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

A cultura *in vitro* dos clones de *P. falciparum*, foi efectuada de acordo com os métodos descritos por Trager & Jensen (1976) e Thaithong (1994), com algumas adaptações. Basicamente, este tipo de cultura de plasmódios consiste na manutenção dos eritrócitos, em meio de cultura RPMI completo (ANEXO 1), com um hematócrito de 5%, 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. O desenvolvimento dos parasitas foi avaliado pela observação por microscopia óptica, de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (Merck) a 20%, efectuando-se diluições e novas culturas, quando a parasitémia atinge cerca de 5-8% de eritrócitos parasitados.

A descrição da preparação do meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) e dos eritrócitos não parasitados para manutenção das culturas estão apresentadas no ANEXO 1).

#### a) Determinação de parasitémias.

No decorrer deste trabalho, a determinação da parasitémia foi realizada por dois métodos diferentes. Durante a manipulação de culturas *in vitro* de *P. falciparum*, a parasitémia foi determinada a partir de esfregaços sanguíneos, contando-se o número de eritrócitos parasitados, tendo sido determinado a percentagem de eritrócitos parasitados após contagem de cerca de 4 000 eritrócitos ( $n^{\circ}$  de eritrócitos infectados /  $n^{\circ}$  total de eritrócitos contados) X 100.

Nos estudos efectuados no terreno, no momento da colheita dos isolados de *P. falciparum*, fizeram-se gotas espessas, para determinação da presença de plasmódios, seguindo-se pelo esfregaço a determinação da parasitémia, em função do número de parasitas por  $\mu$ l de sangue (OMS - Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology). Esta contagem é baseada no pressuposto de que existem cerca de 8 000 leucócitos, num microlitro de sangue humano.

São observados os campos microscópicos correspondentes a 500 leucócitos, e registados em simultâneo o número de parasitas observados. O número de parasitas é

apresentado sob a forma de “número de eritrócitos parasitados por  $\mu\text{l}$  de sangue” pela fórmula:  $n^\circ$  de eritrócitos infectados  $\times$  8000/ $n^\circ$  de leucócitos contados ( $\geq 500$ ).

È utilizada a microscopia por imersão (ocular 10X, objectiva 100X).

A OMS considera este método adequado para análise comparativa (WHO, 1991), embora tenha associado um erro resultante das variações no número de leucócitos verificadas de indivíduo para indivíduo.

### **II.2.1.2 - Sincronização de culturas *in vitro* de *Plasmodium falciparum* com sorbitol.**

Dado que em cultura de *P. falciparum* se observa a presença simultânea de todos os estádios eritrocitários do parasita (anéis, trofozoítos, esquizontes e por vezes, gametócitos), é necessário sincronizar a cultura para a execução dos ensaios de susceptibilidade *in vitro* aos fármacos.

Este método baseia-se no facto dos eritrócitos infectados com parasitas com mais de 20 horas de desenvolvimento intra-eritrocitário, apresentarem uma maior fragilidade osmótica (Lambros & Vanderberg, 1979) sendo lisados devido à acção do sorbitol.

Resumidamente, as culturas ( $\approx 10\%$  de parasitémia), com predominância de parasitas jovens, são centrifugadas (676 x g 5 min.) e ao *pellet* são adicionados 10 volumes de sorbitol (Merck) (a 5%) esterilizado por filtração (filtros 0,2  $\mu\text{m}$ , Millipore).

Após 10 min. a 37°C, a cultura é centrifugada e lavada 2X com RPMI sem plasma, os eritrócitos recuperados após a última centrifugação são colocadas nas condições de cultura. Se necessário este protocolo pode ser repetido 6 a 8 hrs depois.

### **II.2.2 - Extracção de ácidos nucleicos**

#### **II.2.2.1 - Extracção DNA**

##### **a) Fenol-clorofórmio (em isolados de *P. falciparum*)**

Para a extracção de DNA de isolados com parasitémias baixas (menos de 0,2 %), seleccionou-se a técnica de extracção de DNA por fenol – clorofórmio (Snounou *et al*, 1993), devido à sua sensibilidade e pela qualidade e grau de pureza do DNA obtido.

De cada papel de filtro contendo a amostra de sangue infectado, retira-se um fragmento (correspondendo aproximadamente a 50  $\mu\text{l}$ ) ao qual se adiciona 1 ml de PBS (Sigma) + Saponina 0,05% v/v (Sigma) com agitação vigorosa (vortex); após uma lavagem com

PBS e sua eliminação, adiciona-se ao fragmento de papel 75 µl de tampão de lise e uma solução de pronase E (Sigma), numa concentração final de 2 mg/ml, que são incubados a 37° C, no mínimo durante 12 h. A extracção de DNA foi efectuada pela adição de 500 µl de fenol (Sigma), seguida de uma centrifugação a 15 800 x g/ 10 min a 4°C, após a qual é recuperada a fase aquosa, sendo transferida para um novo tubo com 500 µl de uma mistura de fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma). Após uma nova centrifugação 15 800 x g/ 15 min. (4°C), o DNA presente na fase aquosa é precipitado com 45 µl de acetato de sódio 3 M (Sigma) e 1 ml de etanol absoluto, durante 12 h a – 20° C ou 5 h a – 70° C; o DNA precipitado é submetido a nova centrifugação 15 800 x g/10 min. a 4° C, procedendo-se a uma lavagem com etanol a 80% (v/v em água). O DNA obtido é seco sob vácuo à temperatura ambiente, procedendo-se então à sua eluição em 20 µl de tampão TE (ANEXO 2). Durante a extracção de DNA foram incluídos controlos negativos, os quais correspondiam a papel de filtro sem amostra, intercalados entre os isolados.

### **b) Chelex (em material de cultura)**

Para extracção de DNA dos clones de *P. falciparum*, mantidos em cultura *in vitro* (II.2.1), e com parasitémias iguais ou superiores a 5%, foi seleccionado o método de extracção com Chelex. As culturas foram centrifugadas a 676 x g durante 5 min., e após eliminação do sobrenadante o *pellet*, a cerca de 50% de hematócrito (resto do meio de cultura), foi colocado em papel de filtro *Whatman* nº 4 e seco à temperatura ambiente.

Um fragmento de papel de filtro, contendo aproximadamente 50 µl de eritrócitos parasitados, é colocado num tubo de micro-centrífuga de 1,5 ml. A hemólise é efectuada adicionando-se 1ml de PBS + 50 µl de Saponina (10% v/v) ao papel de filtro contendo a cultura, tendo sido incubadas 4 – 16 h, a 4° C, seguindo-se uma lavagem com PBS e nova incubação a 4° C, durante 15 - 30 min.

A extracção de DNA foi realizada pela adição de 50 µl de uma solução de Chelex a 20% (Biorad), as amostras foram posteriormente incubadas a 95° C durante 10 min.. Finalmente, foram realizadas duas centrifugações (15 800 x g/ 5 min.), a primeira com o objectivo de eliminar o papel de filtro, e uma segunda, para eliminar os resíduos de Chelex em suspensão na amostra de DNA.

### II.2.2.2 - Extração de RNA

Para a extração de RNA total, todas as soluções foram preparadas com água bidestilada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC - um inibidor da actividade das enzimas RNases), e esterilizadas (Hyde & Read, 1993). Todo o material utilizado para tratamento das amostras, bem como as bancadas, foram submetidos a um tratamento prévio com RNase OUT™ (Gibco BRL).

No decorrer deste trabalho, a extração de RNA total foi realizada seguindo dois protocolos distintos, de acordo com o laboratório de investigação:

- recorrendo ao equipamento *ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Prepstation* (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante (AppliedBiosystems) e conforme se descreve seguidamente (Espanha)

- e com o reagente Trysol LS (Invitrogene), seguindo as instruções do fabricante conforme se descreve seguidamente (CMDT LA)

As amostras (1 ml) de cultura *in vitro* dos clones 3D7 e Dd2 de *P. falciparum* foram centrifugadas (700 x g/ 5 min.), tendo o *pellet* obtido sido incubado com 750 µl de Trysol LS (Invitrogene), durante 5 min., em gelo. A cada amostra foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Merck), a mistura foi homogeneizada por agitação manual durante 15 segundos, seguindo-se uma incubação durante 10 min. à temperatura ambiente, e uma centrifugação a 12 000 x g/ 15 min., a 4° C. A fase aquosa foi recuperada para um novo tubo, à qual foram adicionados 500 µl de isopropanol (Sigma), seguindo-se uma incubação a - 20° C durante 15 min., e uma nova centrifugação a 12000 x g/ 10 min à temperatura de 4° C. O *pellet* de RNA obtido foi lavado com 1 ml de etanol (Merk) a 75% (v/v) e centrifugado a 7500 x g/ 5 min. a 4° C. O RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 15 µl de água bidestilada estéril, tratada com DEPC.

### II.2.3 - Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), todo o material utilizado para manipulação das amostras de RNA, bem como as bancadas, foram submetidos a um tratamento prévio com RNase OUT™ (Gibco BRL).

De modo a eliminar a interferência de DNA contaminante na reacção de PCR, realizada a partir do cDNA sintetizado, as amostras de RNA foram tratadas com 2 U de *DNaseI* (Fermentas), incubadas durante 20 min. a 37° C. A enzima foi inactivada pela adição de 1 µl de EDTA 25 mM (Fermentas), com incubação a 65° C durante 10 min. A transcrição reversa (RT-PCR) do RNA para cDNA foi realizada num volume de reacção de 30 µl, onde a 1 µg de RNA tratado com *DNaseI* foram adicionados 200 U de RevertAid™ M-MuLV – RT (Fermentas), 40 U de RNaseOUT™ (Gibco BRL), 1X tampão M-MuLV-RT, 10 mM de BSA (New England Biolabs, UK), 1 µl de hexanucleótidos (*random primers*<sup>44</sup>) (Boehringer Mannheim) e 0,5 mM de dNTP's (Promega, USA). A mistura foi incubada a 37° C durante 60 min., tendo a reacção sido interrompida pela inactivação da enzima, através do aumento de temperatura até 95° C, durante 5 min. O cDNA obtido foi quantificado em espectrofotometro e armazenado a – 20° C.

### II.2.4 - PCR - *Polimerase Chain Reaction*

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*), foi descrita pela primeira vez em meados da década de 80, e é uma técnica de amplificação de DNA (Saiki *et al.*, 1986). Implica a utilização de sequências oligonucleotídicas (*primers* - sequências oligonucleotídicas de pequenas dimensões 12-25 pares de bases (*base pair* - bp) complementares a sequências alvo específicas no DNA molde, situadas em regiões adjacentes (3' e 5') de cada uma das cadeias da dupla hélice da sequência de DNA a amplificar. As polimerases de DNA apenas podem catalisar reacções de polimerização, a partir de uma extremidade 3'-OH livre (Kornenberg & Baker, 1992), as quais são fornecidas pelos *primers*.

A amplificação é baseada na repetição sequencial de passos: desnaturação, hibridação (annealing) e extensão. Em conjunto, estes 3 passos constituem um ciclo de amplificação. Esta técnica permite a síntese de cópias do DNA molde em quantidades acumuláveis de forma exponencial de base 2 ( $2^n$ ; em que n= número de ciclos de amplificação). A elevada sensibilidade da PCR permite detectar mesmo quantidades de DNA muito pequenas. Em teoria, apenas uma cópia de DNA molde é suficiente, para produzir por amplificação de milhões de cópias. Assim, no final do processo, podemos

---

<sup>44</sup> *Random primers* - refere-se a oligonucleotidos (*primers*) de 6 a 8 bps com sequencia aleatória, assim todos os transcritos têm identica probabilidade servir de molde à síntese de cDNA (Livak & Schmittgen, 2001). De grande utilidade na síntese de cDNA para estudos de expressão relativa de genes, de forma a evitar o enriquecimento da estimativa das quantidades relativas de mRNA.

com relativa facilidade visualizar (por ex. por electroforese em gel) o DNA sintetizado, concluindo assim, da presença ou não do DNA molde específico que procuramos na amostra original.

### II.2.5 - Desenho de *primers*

O desenho de primers adequados é essencial para garantir a sensibilidade e especificidade da reacção de PCR. Um dos parâmetros críticos da reacção de PCR, reside na escolha correcta dos primers. Foram tomadas em consideração os seguintes parâmetros: a) Temperatura de dissociação do par *primer*/sequência alvo; b) Conteúdo em Guanina/Citosina (G/C); c) Complementaridade da sequência do primer – com recurso ao OligoAnalyzer ([www.idtdna.com/html/analysis/](http://www.idtdna.com/html/analysis/)).

### II.2.6 Electroforese de DNA em gel de Agarose

Ao DNA amplificado de cada amostra adicionou-se 1/10 do volume final de tampão de aplicação (ANEXO 2), tendo sido aplicados em cada “poço” do gel de agarose (Gibco, BRL). Foram usados géis com diferentes concentrações de agarose, conforme o peso molecular dos fragmentos que se pretendiam resolver (ANEXO 3). A electroforese realizou-se em tampão TBE (ANEXO 2) a 4 V/cm.

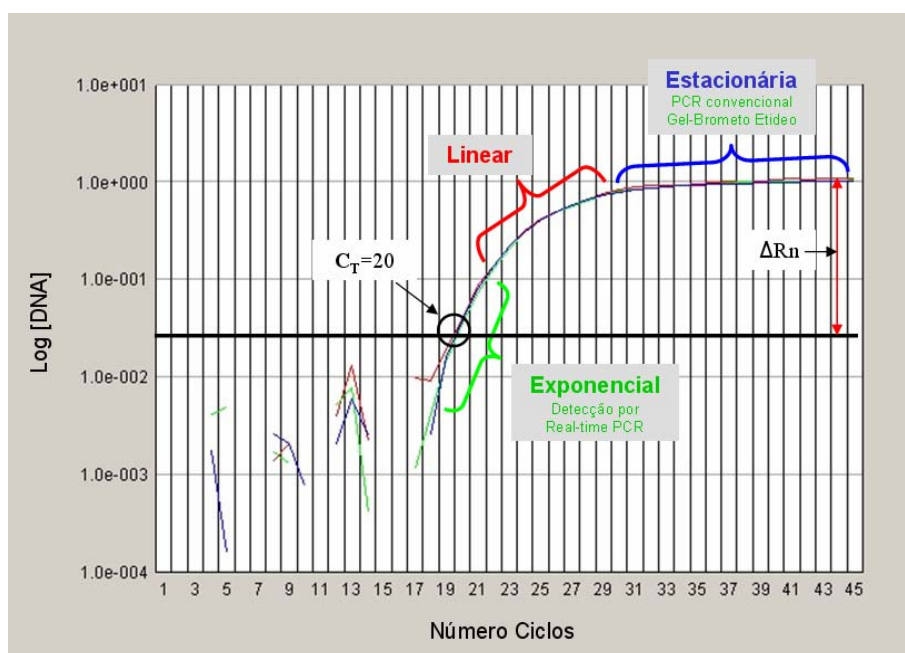
O brometo de etídio (Sigma) foi incorporado no gel de agarose, numa concentração final de 0,1 µg/ml, para permitir a visualização do DNA sob luz ultravioleta. Os géis foram observados e fotografados num transiluminador Eagle Eye II (Stratagene).

### II.2.7 - PCR em tempo real (RT-PCR)

O PCR em tempo real (Real-time PCR) consiste numa reacção de PCR (ver II.2.4) onde é detectada e avaliada a acumulação de produto amplificado ao longo da reacção, ou seja, em cada ciclo é registada a quantidade de produto amplificado (DNA). Quanto à cinética da reacção, podemos distinguir fases numa reacção de PCR (Figura II.2); **Fase exponencial** – em que o número de cópias do DNA molde duplica em cada ciclo (assumindo que a eficiência da reacção é de 100%). **Fase Linear** – em que os componentes da mistura de reacção estão a ser consumidos, a velocidade da reacção está a diminuir e os produtos de PCR começam a ser degradados. **Fase estacionária** (*end-point*) – em que a reacção cessa, não sendo sintetizados mais produtos de PCR.



Em Real-time PCR os resultados são medidos durante a fase exponencial, em que a quantidade de DNA medida, reflecte o número de cópias de DNA inicialmente presentes na amostra, seguindo uma exponencial de base 2 (ver II.2.4). Pelo contrario, num PCR convencional (*end-point PCR*) esta avaliação só é realizada na fase estacionária do ensaio, sendo apenas avaliada a quantidade de produto final acumulado (*end-point analysis*).



**Figura II.2 - Representação gráfica do aumento da concentração de DNA durante uma reacção de PCR.**  $C_T$  (*cycle threshold*) representa o ciclo a partir do qual é detectado um aumento, estatisticamente significativo, no sinal de fluorescência;  $\Delta R_n$  valor corresponde á diferença entre o valor máximo de número de cópias de DNA e o valor do mesmo parâmetro a partir do qual a fluorescência emitida ultrapassa um dado limite (fluorescência acima do controlo negativo).

No decorrer deste trabalho foram utilizados métodos de detecção do produto amplificado em tempo real;

1. Sondas *TaqMan*, 2. *SYBR Green* e 3. *Molecular Beacons*:

### a) Sondas *TaqMan*

Este método, explora a actividade 5' nucleásica da enzima *Taq Gold DNA* polimerase para degradar a sonda *TaqMan*. A sonda é constituída por um oligonucleótido marcado no terminal 5' com uma molécula repórter fluorescente e no terminal 3' uma molécula *quencher*. Quando próximos, o *quencher* reduz a emissão de fluorescência do repórter (Figura II.3 1A) A sonda, híbrida especificamente na sequencia alvo. Durante a amplificação por PCR, a sonda é degradada pela polimerase afastando o *quencher* do

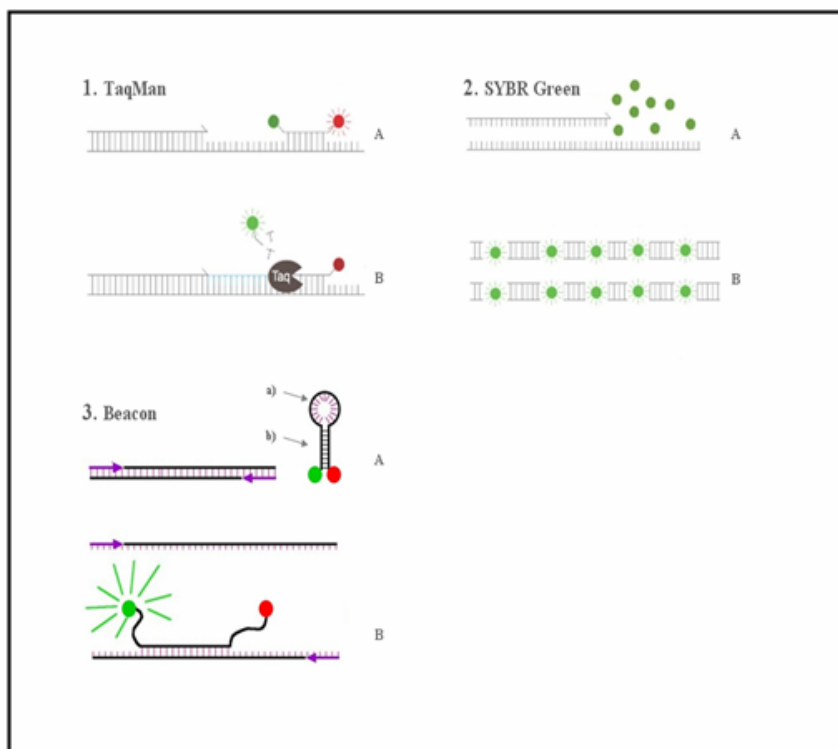
repórter (Figura II.3 1B), resultando num aumento da fluorescência detectada pelo sistema, correspondente à acumulação de produto de PCR.

### **b) SYBR Green**

Este cromóforo emite fluorescência (excitado por um feixe de luz) quando ligado à cavidade menor do DNA em cadeia dupla (Figura II.3 2A). Assim, quanto maior a quantidade de DNA em cadeia dupla mais fluorescência é emitida (Figura II.3 2B). Este método é menos específico do que as sondas *TaqMan*, mas possui a vantagem de ser mais económico.

### **c) Molecular Beacons**

Os beacons são pequenas moléculas de DNA de cadeia simples. Numa extremidade possuem 6 a 9 bases que são complementares com as 6 a 9 bases na extremidade oposta. Esta complementaridade permite à molécula formar uma estrutura em forma de alfinete (Figura II.3 3A). A ansa desta estrutura é necessariamente complementar à sequência alvo a amplificar. As extremidades complementares do *beacon*, podem fazer parte da sequência alvo ou ser acrescentadas durante o desenho deste. O beacon é marcado numa extremidade com uma molécula repórter fluorescente e na outra com uma molécula *quencher*. Quando próximos, o *quencher* impede a emissão de fluorescência do repórter (Figura II.3 3A). Quando a ansa do beacon hibrida especificamente na sequência alvo, o *quencher* e o repórter ficam afastados, resultando num aumento da fluorescência detectada pelo sistema, correspondente à acumulação de produto de PCR (Figura II.3 3B).



**Figura II.3 - Emissão de fluorescência durante a reacção de PCR em tempo real pelos 3 métodos usados neste trabalho. 1.** Sondas TaqMan: A-hibridação específica da sonda, B-amplificação e degradação da sonda pela Taq-polimerase, aumento da fluorescência; **2.** SYBR Green: B- SYBR Green intercalado no DNA em cadeia dupla, emissão de fluorescência; **3.** Beacons: A-Beacon fechado a) ansa, b) extremidades complementares, B- hibridação do Beacon ao DNA alvo, emissão de fluorescência.

### II.2.8 – Preparação de bactérias *E.coli* JM 109/SURE® *E. coli* BL21 electrocompetentes

Este procedimento foi realizado com as *E.coli* JM 109/SURE® e com as *E. coli* BL21.

As bactérias foram cultivadas em meio Luria Broth (LB) (Sigma) líquido (ANEXO 1) a 37°C com agitação até atingir densidade de O.D.<sub>600</sub> = 0,5. Esta suspensão foi mantida em gelo durante 30 min seguida de centrifugação a 4000 x g, 4°C, durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1,25 ml de H<sub>2</sub>O fria com 10% de glicerol e centrifugado (4000 x g, 4°C, durante 15 min). Esta suspensão foi dividida em aliquotas de 90µl e guardada a -80°C.

### II.2.9 - Extracção e quantificação de proteínas (método *Bradford*) de *Plasmodium falciparum* a partir de cultura *in vitro*

Culturas (conforme descrito em II.2.1) com parasitemia superior a 10%, foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min à temperatura ambiente, e o sobrenadante

descartado; foi adicionado PBS gelado ao *pellet*, e a mistura foi de novo centrifugada a 5000 rpm durante 5 min à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e os eritrócitos depositados foram lisados por adição de igual volume de uma solução de 0,2% de saponina em PBS, e incubação 20 min a 37°C. Esta mistura foi centrifugada a 10 000 rpm a 4°C durante 10 min, o sobrenadante descartado e os parasitas lavados 3 vezes com PBS gelado, seguindo-se nova centrifugação a 10 000 rpm, 4°C, 10 min. Para lisar os parasitas, foram adicionados 4 volumes de uma solução gelada de 1% de Tritom X-100 e inibidores de proteases (1 pastilha em 100ml de PBS). A mistura foi incubada em gelo, sonicada e congelada a -70°C, descongelada rapidamente a 37°C/ 5 min e centrifugada a 10 000 rpm durante 30 min. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas segundo o método de Bradford (ver II.2.10) e armazenadas a -70°C em aliquotas.

### **Quantificação de proteínas método Bradford**

Prepararam-se 5 amostras com diferentes concentrações de albumina (BSA, BioRad) 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0µg/µl e reagente de Bradford 1X (BioRad®). Em paralelo, foram preparadas 3 diluições seriadas de cada amostra de proteínas nas mesmas condições da recta padrão. As respectivas absorvâncias foram lidas em espectrofotómetro a 595nm. A concentração das amostras foi determinada a partir da equação da recta padrão (calculada com base nos valores de densidade óptica (OD) obtidos).

### **II.2.10 Electroforese de proteínas em gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polycrylamide Gel Electrophoresis*)**

Às amostras de proteína a aplicar em gel, é adicionado tampão de aplicação (ANEXO 2) com β-mercaptoetanol (que actua como agente redutor e desnaturante quebrando as ligações dissulfito das proteínas), expondo-se posteriormente as amostras a 96°C durante 5 min, sendo depois aplicadas no gel contendo SDS. O SDS desnatura a proteína, isto é, converte a proteína numa estrutura linear (a sua forma nativa é, geralmente, globular) e conferindo-lhe densidade de carga uniforme, desta forma as proteínas podem ser separadas por electroforese, somente, em função do tamanho (massa molecular). Quando colocadas neste gel de poliacrilamida (polímero de monómeros de acrilamida) e submetidas a um campo eléctrico, as proteínas desnaturadas movem-se para o pólo positivo, percorrendo uma distancia no gel

proporcional ao seu tamanhos (massa molecular). Quanto menor for a concentração de acrilamida no gel (ANEXO 3) maior será a distancia de migração entre as proteínas.

Após a electroforese, o gel é fixado e corado com uma solução de Azul de Coomassie (ANEXO 2). Para visualizar as bandas, o gel é descorado com uma solução contendo metanol (ANEXO 2).

### **II.2.11 – Preparação de lâminas de cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, para imunofluorescência IFA.**

#### **a) fixação com acetona**

Foram preparados esfregaços de cultura (ver II.2.1) não sincronizada, secos à temperatura ambiente, e fixados por imersão em acetona durante uns minutos (QBiogen) e armazenados a 4°C, após registo.

#### **b) fixação com paraformaldeido**

Foram recolhidas aliquotas de 1 ml de cultura (ver II.2.1) não sincronizada, com parasitemia superior a 10%, centrifugadas a 2000 rpm, 5 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, as células lavadas duas vezes com meio RPMI incompleto (ANEXO 1) e ressuspendidas em 250 µl RPMI incompleto. A 10 µl desta mistura foram adicionados 25 µl de solução de fixação com paraformaldeido (ANEXO 2). Aliquotas (10µl) desta suspensão de células foram dispensadas em lâminas e mantidas em câmara húmida, à temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente o excesso de suspensão foi aspirado, e as lâminas contendo um depósito com eritrócitos, parasitadas, armazenadas a -20°C.

### II.3 – Metodologia

#### II.3.1 – Seleção da grelha aberta de leitura ORF (*Open Reading Frame*) para cada gene

##### 1 - BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tools*)

A estratégia de pesquisa consistiu em recorrer à aplicação BLAST e efectuar buscas nas bases de dados de livre acesso, *Stanford Genome Technology Center* ([www-sequence.stanford.edu/](http://www-sequence.stanford.edu/)) e *PlasmoDB* ([www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp](http://www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp)), onde estão depositadas as sequências do projecto de sequenciação de *P. falciparum*, usando como sondas as sequências dos *Walker A*, *Walker B* e Assinatura ABC da proteína Pgh1 (PFE1150w) de *P. falciparum*.

2- Com as sequências seleccionadas por BLAST, utilizou-se o **CDART** *Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) para identificar os domínios conservados disponíveis na mesma. Quando ambiguidades eram detectadas, as sequências foram posicionadas nas sub-famílias ABC, para pesquisar por analogia na base de proteínas com função atribuída da **SwissProt** ([www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot)).

##### 3- SOSUI, TMHMM e HMMTOP

A previsão do número e localização das hélices transmembranares nas sequências de PfMRP1 e PfMRP2, foi efectuada recorrendo a 3 aplicações distintas SOSUI ([www.bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/](http://www.bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/)), TMHMM ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) e HMMTOP ([www.enzim.hu/hmmtop/](http://www.enzim.hu/hmmtop/)). Adicionamos à análise proteínas das quais existe informação experimental, acerca da sua topologia membranar, para permitir um termo de comparação.

#### II.3.2 - Sequenciação dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* a partir de cDNA

##### a) Amplificação por PCR dos fragmentos dos genes a sequenciar

Para a sequenciação total dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2*, foram desenhados 11 e 12 pares de *primers* respectivamente (Tabela II.2). Os primers foram desenhados com base na sequência do clone 3D7, declarada no PlasmoDB ([www.plasmoDB.org](http://www.plasmoDB.org)) para cada gene.

## Metodologia

Os fragmentos (11 para *pfmrp1* e 12 para *pfmrp2*) de cerca de 600 pares de bases (bp) cada, foram amplificados por PCR com os *primers* e condições de amplificação descritos na Tabela II.2. Os *primers* foram sintetizados pela *MWG Genomic Synthesis* (USA), conforme sequencia fornecida por nós.

**Tabela II.2 - Sequência dos *primers* e condições de amplificação por PCR dos fragmentos dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2*.** PF - *primer* directo; PR – *primer* reverso.

| <i>pfmrp1</i>        | Sequência dos <i>Primers</i><br>(5'-3') | Mistura de reacção   |
|----------------------|---|--|
| S1mrp1F              | ATGACGACATATAAAGAAAATGTTGG              | <i>H<sub>2</sub>O</i> .....até 20µl<br><i>Tampão</i> .....1X<br><i>MgCl</i> .....23,5 mM<br><i>dNTP's</i> .....200 µM<br><i>PF</i> .....300nM<br><i>PR</i> .....300nM<br><i>TaqPol</i> .....025U/µl<br><i>cDNA</i> ----- |
| S1mrp1R              | GAAGCTCTTTTGCATTTTATTTTC                |  |
| S2mrp1F              | GTGGTAGTGATGATAATGTTTTCC                |  |
| S2mrp1R              | TTGAATTTTACCAAGTTTATTTAAAAG             |  |
| S3mrp1F              | GCTTTATACAGTGCAATGATAC                  |  |
| S3mrp1R              | CTTCTCATGATGATGGTACATC                  |  |
| S4mrp1F              | GTAGTGGATAAGACATTTTACAAAATG             |  |
| S4mrp1R              | GAGATTTTAATATGACACATGGTAATTTG           |  |
| S5mrp1F              | ATCAGGAAAAAGTGCATTTTCCATTC              |  |
| S5mrp1R              | GATATATTACATCTTTAGATCCTTCC              |  |
| S6mrp1F              | GAAAATTACCTTCAAAAATGTTTAAATGG           |  |
| S6mrp1R              | GGAGCATATGAATAAAAATAATAAGG              |  |
| S7mrp1F              | GGGAATACGGAGAGTGTTC                     |  |
| S7mrp1R              | GTCTTTTAACTATGATGAGTATTATTC             |  |
| S8mrp1F              | CTTCAGTAGTAATATTTATGCTTATATC            |  |
| S8mrp1R              | CATCTATAGTAATGCATTGTCTGG                |  |
| S9mrp1F              | CAAAGGCTGTATTTATCATGTCATAC              |  |
| S9mrp1R              | GGATAAGATATCTGCAATGTCCG                 |  |
| S10mrp1F             | GGAAAAATGAATTAATGTAATAACAACAC           |  |
| S10mrp1R             | GTTTCATGCTCTAAAATGAATGG                 |  |
| S11mrp1F             | GATCCATATAATAATTTACAGATGATG             |  |
| S11mrp1R             | TTAGTCGTCCATTTCTAACAAAATGTG             |  |
| <b><i>pfmrp2</i></b> |   |  |
| S1mrp2F              | ATGATGAGACGGAGAAGCG                     | 92°C - 3 min<br>92°C – 1 min sec<br>50°C - 30 sec<br>72°C – 1min sec<br>72°C – 3 min <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">                     ← 35 x                 </div>                                |
| S1mrp2R              | GCCCTCCTTTGCTATTATGAT                   |  |
| S2mrp2F              | GTGTTGTTCCGATTATAGTCAT                  |  |
| S2mrp2R              | CGACATGTTTAAACGTGTACAG                  |  |
| S3mrp2F              | GCTCCGAATTTAATAAAGAAGAAAAACA            |  |
| S3mrp2R              | GTTCTTTAATCACACCCCT                     |  |
| S4mrp2F              | GTGAATTAAGAGTAATAAAACCG                 |  |
| S4mrp2R              | CAAGACAGAAAAGGGTGGTAT                   |  |
| S5mrp2F              | GTAGGTGAAAGTAATAATCACTAT                |  |
| S5mrp2R              | CTGCACAGAGGTCTAATGAT                    |  |
| S6mrp2F              | CTGCACAGAGGTCTAATGAT                    |  |
| S6mrp2R              | GGAACTATATGCACCGTGTA                    |  |
| S7mrp2F              | GAACAAGTCAAAATCTATGTTAAGTC              |  |
| S7mrp2R              | CCATTTACTCGTTCAATACAGAAGAA              |  |
| S8mrp2F              | GCGGAGATATAAAATACCACAAAT                |  |
| S8mrp2R              | GGAAGACCTCTAATTATTGTTATTATT             |  |
| S9mrp2F              | GGAATATCAAGTTAGAAACATTTTG               |  |
| S9mrp2R              | GCATCACATGCACCCTTAT                     |  |
| S10mrp2F             | GATGTAAGAAGCACAAAGAGG                   |  |
| S10mrp2R             | CCTGGTTCGTATGATCCGA                     |  |
| S11mrp2F             | GCAGGATGCAAATTTATTTAAATCTG              |  |
| S11mrp2R             | GGAATATTAGAACATTTATAGATCCAT             |  |
| S12mrp2F             | GGTGTATTACCACAATCATCTTTTG               |  |
| S12mrp2R             | GCTTCAAGAAAAACAATTAATTTGA               |  |

## Metodologia

### b) Análise de sequências

Os fragmentos resultantes das amplificações por PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% (II.2.6) para verificar a presença de banda única. Para garantir a qualidade da sequenciação, os produtos de PCR foram purificados com o kit *Quiaquick PCR Purification* (Qiagen), cujo princípio consiste em reter o DNA numa coluna de resina, libertando-o dos restantes componentes da mistura, nomeadamente das pequenas sequências dos *primers*. Este DNA é eluído da resina através da passagem de água na coluna induzida por centrifugação. Os produtos assim obtidos foram diluídos e sequenciados. As reacções de sequenciação foram efectuadas pela *Macrogen DNA Sequencing Service* ([www.nucleics.com/DNA\\_sequencing\\_support/sequencing-service/macrogen](http://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/sequencing-service/macrogen)) na Coreia. Todos os fragmentos foram sequenciados quer na cadeia codificante 5'→3', quer na sua complementar, para confirmação dos resultados. A análise das sequências nucleotídicas obtidas foi efectuada através de alinhamentos entre a sequência resultante e a sequência disponível, no PlasmDB ([WWW.plasmDB.org](http://WWW.plasmDB.org)) tendo esta análise sido efectuada com apoio da aplicação MultAlin ([www.bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin](http://www.bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin)) gratuitamente disponível *on line*.

### II.3.3 – Identificação por PCR das inserções/delecções na sequência do gene *pfmrp2*

Para detectar a presença das inserções/delecções, foram amplificados por PCR fragmentos da sequência do gene. Os *primers* desenhados hibridam em locais que flanqueiam esta região (Tabela II.3). Os produtos de PCR obtidos, foram visualizados em gel de agarose 2% (nas condições descritas em II.2.6). A presença das inserções/delecções foi determinada por comparação com os fragmentos de PCR obtidos a partir dos clones 3D7 e Dd2.

**Tabela II.3 - Sequência dos *primers* e condições de PCR para amplificação do fragmento do gene *pfmrp2* que inclui as inserções/delecções. bps - pares de bases.**

| Inserção/Delecção* | Localização* | <i>Primers</i>     | Mistura de reacção  | Condições de PCR   |
|--------------------|--------------|--------------------|---|--|
| inserção de 18 bps | 779          | S2mrp2F<br>S2mrp2R | H <sub>2</sub> O.....até 20 µl<br>Tampão.....1X<br>MgCl <sub>2</sub> .....23,5 mM | 92°C - 3 min<br>92°C - 1 min<br>50°C - 1 min<br>72°C - 1 min<br>72°C - 3 min |
| inserção de 72 bps | 1947         | S4mrp2F<br>S4mrp2R | dNTPs.....200 µM<br>pfgcsF .....300 nM<br>pfgcsR .....300 nM                      | }35X   |
| delecção de 15 bps | 3573         | S7mrp2F<br>S7mrp2R | TaqPol.....0,025U/µl<br>DNA.....ng  |  |

\* relativamente à sequência do gene no clone 3D7



### II.3.4 - Identificação das mutações pontuais nos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* por PCR-RFLP

O PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*), consiste em amplificar o fragmento de DNA que contem a mutação, digerir o fragmento com uma endonuclease (enzima de restrição) que reconheça especificamente o palindroma<sup>45</sup> que inclui a mutação.

Para a identificação de cada uma das mutações, foi amplificado por PCR o correspondente fragmento do gene, os primers e condições de PCR encontram-se descritos na Tabela II.4. As mutações contidas em cada um dos fragmentos amplificados por PCR, foram identificados pela digestão dos mesmos com enzimas de restrição, que reconhecem especificamente os palindromas originados ou eliminados por determinada mutação (Tabela II.4).

**Tabela II.4 - Fragmentos amplificados e enzimas de restrição, para identificação das mutações pontuais dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2*.**

| Gene          | Alteração     | Primer*                           | Enzima         | Palindroma   |
|---------------|---------------|-----------------------------------|----------------|--|
| <i>pfmrp1</i> | <i>C573T</i>  | S2mrp1F                           | <i>HpyCH4V</i> | 5'... T G <sup>▼</sup> C A ... 3'  |
|               |               | S2mrp1R                           |                | 3'... A C <sub>▲</sub> G T ... 5'  |
|               | <i>T1311G</i> | S3mrp1F                           | <i>HpyCH4V</i> | 5'... T G <sup>▼</sup> C A ... 3'  |
| S3mrp1R       |               | 3'... A C <sub>▲</sub> G T ... 5' |                |  |
|               | <i>T4170A</i> | S9mrp1F<br>S9mrp1R                | <i>DraI</i>    | 5'... T T T <sup>▼</sup> A A A ... 3'<br>3'... A A A <sub>▲</sub> T T T ... 5'                               |
| <i>pfmrp2</i> | <i>A1910G</i> | S4mrp2F<br>S4mrp2R                | <i>BccI</i>    | 5'... C C A T C (N) <sub>4</sub> <sup>▼</sup> ... 3'<br>3'... G G T A G (N) <sub>5</sub> <sub>▲</sub> ... 5' |

\*Os primers e condições de PCR usados, foram idênticos aos descritos para a sequenciação total do gene (ver Tabela II.3); *HpyCH4V* e *BccI*, New England BioLabs; *DraI*, Fermentas.

Todas as digestões enzimáticas foram realizadas de acordo com os protocolos dos fornecedores dos reagentes. Usualmente, estes consistiram na adição de 1 unidade de enzima para a digestão de aproximadamente 50 ng/μl de DNA com o respectivo tampão, numa diluição final de 1/10. A incubação da mistura de reacção foi efectuada durante 4 a 12 horas, dependendo da eficiência de corte de cada enzima. Os produtos de digestão foram visualizados em gel de agarose (conforme II.2.6).

<sup>45</sup> Palindroma - sequencia de nucleotidos reconhecida especificamente por determinada endonuclease, que permite restrição nesse local do DNA

## Metodologia

### II.3.4 - Detecção por PCR das repetições na sequência do gene *pfγ-gcs*

Para determinar o número de repetições presentes, foi amplificado por PCR um fragmento da sequência do gene *pfγ-gcs* onde ocorrem as repetições (em número variável). Foram desenhados primers para locais que flanqueiam esta região (Tabela II.5). Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em gel de agarose 2% (nas condições descritas em II.2.6). O número de repetições foi estimado por comparação com os fragmentos de PCR obtidos (nas mesmas condições de PCR) a partir dos clones de *P. falciparum* 3D7, HB3, Dd2 e K1 (os quais possuem um número conhecido de repetições).

**Tabela II.5 - Sequência dos primers e condições de PCR para amplificação do fragmento do gene *pfγ-gcs* que inclui as sequências repetidas.**

| Primers       | Sequência dos Primers<br>(3' – 5')  | Mistura de reacção  | Condições de PCR   |
|---------------|-------------------------------------|---|--|
| <b>pfγcsF</b> | CGAAGAAGGAGAAGTAGAAGAAGAAGACG       | H <sub>2</sub> O.....até 20 µl<br>Tampão.....1X<br>MgCl <sub>2</sub> .....23,5 mM<br>dNTPs.....200 µM<br>pfγcsF .....300 nM<br>pfγcsR .....300 nM<br>TaqPol.....0,025U/µl<br>DNA.....ng | 92°C - 3 min<br>92°C - 1min<br>54°C - 1min<br>72°C - 1min<br>72°C - 3min |
| <b>pfγcsR</b> | GGATAATACACCAAGAAGCTGTAATGATTACAATA |   | 29 X   |

### II.3.5 - Identificação do número de cópias do genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1*

O número de cópias dos genes *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2* foi determinado por PCR em tempo real usando SYBR Green nos clones 3D7, Dd2 e nos isolados. Para determinar o número de cópias dos genes foi usado o método  $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$  (ver II.3.7.4) usando o gene *pfβ-actin1* como controlo interno e o número de cópias do gene *pfmdr1* determinado no clone 3D7 (1 cópia (Wellems *et al.*, 1990), como amostra calibrador. Em cada PCR foi amplificada uma amostra de DNA do clone Dd2, o qual possui 4 cópias do gene *pfmdr1* (Wellems *et al.*, 1990) servindo esta de validação da reacção. Para as amplificações com SYBR Green, foi usado o kit *qPCR™ Core Kit for SYBER® Green I* (Eurogentec). As reacções de PCR foram realizadas num equipamento *ABI PRISM 5700 Sequence Detector* da PE Applied Biosystems. Foram realizados ensaios independentes e cada um deles em triplicado. As condições de reacção e os primers encontram-se na Tabela II.6.

## Metodologia

**Tabela II.6 - Sequência dos primers para determinação do número de cópias dos genes *pfmdr1*, *pfmrp1*, *pfmrp2*.** PF - primer directo; PR - primer reverso; SB - SYBR Green.

| Gene              | Sequência dos Primers*<br>(3' - 5')                       | Mistura de reacção**  | Condições de PCR                                       |
|-------------------|---|---|--|
| <i>pfmrp1</i>     | PF-GGAACTTCGATGTGCCATAT<br>PR-TACATGTTTCGTTAGATGAATTTTT   | H <sub>2</sub> O.....até 20µl<br>Tampão.....1X<br>MgCl <sub>2</sub> .....3,5 mM<br>dNTP's.....200 µM<br>PF.....300nM<br>PR.....300nM<br>SB.....1/6000<br>TaqGold.....0,025U/µl<br>cDNA..... | 95°C - 1min<br>95°C - 15sec<br>60°C - 1min } 40 ciclos |
| <i>pfmrp2</i>     | PF-AAATATGGAGGTCACCGTTATG<br>PR-ATGATGACCATAGTGAAGAGGG    |   |  |
| <i>pfmdr1</i>     | PF-CTTATGTATTACTTGCCTTTTCCG<br>PR-CGTGTATTTGCTGTAAGAGCTAG |   |  |
| <i>pfβ-actin1</i> | PF-TGTTGACAACGGATCAGG<br>PR-GGAACGAGGTGCATCAT             |   |  |

\*os primers para análise dos genes *pfβ-actin1*, *pfmrp1* e *pfmrp2* são os mesmos usados para o estudo da expressão genica em III.4.4.5

### II.3.6 - Estudo *in vitro*, da susceptibilidade, de isolados de *P. falciparum* aos fármacos cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino

#### II.3.6.1 - Selecção de isolados de *P. falciparum*

A selecção de isolados de *P. falciparum*, a partir de indivíduos com sinais clínicos, foi baseada na observação de esfregaços sanguíneos, fixados com metanol e corados com Giemsa (Merck) a 20%, cujas parasitémias foram determinadas segundo o procedimento descrito em II.2.1.1 A amostra de sangue para o esfregaço, foi colhida por punção digital, efectuada com lancetas. Após confirmação, por microscopia óptica, de infecção por *P. falciparum*, efectuou-se uma entrevista com cada paciente, na base de um inquérito com os critérios de inclusão predefinidos pela OMS, relativos a testes de susceptibilidade *in vitro* (Tabelas II.7 e Tabelas II.8). Este trabalho foi efectuado com apoio clínico.

**Tabela II.7 - Períodos de segurança relativamente à toma de antimaláricos.**

| Antimalárico                      | Período (dias) |
|-----------------------------------|----------------|
| Quinino, artemisinina e derivados | 7              |
| 4 - aminoquinoleínas              | 14             |
| Pirimetamina e/ou sulfaminas      | 28             |
| Mefloquina                        | 56             |

Aos indivíduos passíveis de inclusão no estudo, foram explicados os objectivos do trabalho e obtido consentimento informado. Este estudo não incluiu crianças com idades inferiores a um ano, sendo a aprovação para inclusão no estudo de menores de dezoito

## Metodologia

---

anos dada pelos pais. Para este estudo foram obtidas autorizações éticas das instituições envolvidas, bem como de todos os participantes.

**Tabela II.8 - Critérios de inclusão para aplicação de testes de susceptibilidade, segundo MARK III da OMS.**

| Critérios  |
|--|
| ▶ Infecção por <i>P. falciparum</i>                                      |
| ▶ Parasitémia entre 1 000 – 80 000 parasitas / $\mu$ l de sangue         |
| ▶ Respeitar os períodos de toma dos antimaláricos ( <b>Tabela II.7</b> ) |
| ▶ Não possuir sinais clínicos de outras infecções                        |

### II.3.6.2 - Colheita e armazenamento de isolados de *Plasmodium falciparum*

Foi recolhido sangue venoso de cada indivíduo (cerca de 2 ml), em *Monovettes* com EDTA (Sarstedt). Do volume total de sangue venoso colhido 50 – 100  $\mu$ l foram colocados em papel de filtro Whatman nº 4, identificados e secos à temperatura ambiente, posteriormente foram acondicionados individualmente em embalagens plásticas e armazenados à temperatura ambiente em contentores com sílica gel. Todos os doentes seleccionados foram tratados, de acordo com os protocolos de saúde locais, imediatamente após a colheita de sangue venoso.

### II.3.6.3 - Avaliação da susceptibilidade *in vitro* de isolados de *Plasmodium falciparum*

A partir do sangue resultante das colheitas efectuadas conforme descrito em II.3.5.2., realizaram-se testes de susceptibilidade *in vitro* a antimaláricos, de acordo com a metodologia descrita seguidamente.

#### a) Preparação das soluções de fármacos

As soluções concentradas (*stock*) dos fármacos, cloroquina, amodiaquina, mefloquina e quinino, foram preparadas em RPMI incompleto (ANEXO 1), esterilizadas por filtração (filtros 0,2  $\mu$ m, Millipore). As concentrações pretendidas foram obtidas a partir destas soluções *stock* por diluições seriadas em RPMI completo (ANEXO 1), tal como apresentadas na Tabela II.9. As soluções obtidas foram previamente testadas em clones de referência de *P. falciparum* (clone 3D7 e Dd2), cuja susceptibilidade aos referidos antimaláricos é conhecida (Oduola *et al.*, 1988; Rosario, 1981).

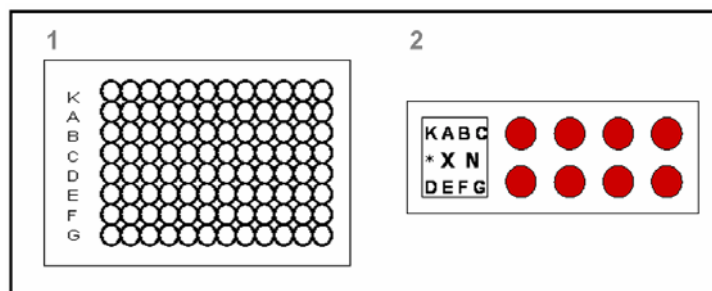
## Metodologia

**Tabela II.9 - Concentrações de antimalárico, usadas nos ensaios de susceptibilidade *in vitro* dos isolados de *P. falciparum*.**

| Fármaco             | Diluições (nM) |     |    |     |     |     |      |      |
|---------------------|----------------|-----|----|-----|-----|-----|------|------|
|                     | A              | B   | C  | D   | E   | F   | G    | H    |
| Amodiaquina (Sigma) | 0              | 2.5 | 5  | 10  | 20  | 40  | 80   | 160  |
| Cloroquina (Sigma)  | 0              | 10  | 20 | 40  | 80  | 160 | 320  | 640  |
| Mefloquina (Mepha)  | 0              | 20  | 40 | 80  | 160 | 320 | 640  | 1280 |
| Quinino (Fluka)     | 0              | 40  | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | 2560 |

### b) Testes *in vitro* de susceptibilidade a antimaláricos segundo a metodologia MARK III da OMS

Estes testes *in vitro* permitem a determinação dos perfis de susceptibilidade a um painel diverso de antimaláricos e foram padronizados pela OMS (MARK III).



**Figura II.4 - Fotografia de gotas espessas realizadas a partir da microcultura *in vitro* para avaliação da susceptibilidade a antimaláricos segundo o teste MARK III da OMS.** 1 Placa de micro-cultura; K controlo (sem fármaco); A; B; C; D; E; F; G correspondem a concentrações crescentes de antimalárico; 2 Lâmina com as gotas espessas correspondentes a cada concentração de fármaco a testar, \* – área de identificação da lâmina, X referênciando o isolado, N – fármaco.

Em cada “poço” das placas de poliestireno (Nunclon), foram colocados 90 µl de cada solução de fármaco, conforme descrito na Figura II.4 1. Foram depois colocados em cada “poço” 10 µl de sangue infectado de cada isolado. Mantêm-se estas culturas nas condições descritas em II.2.1. Decorridas 24 – 30 h, despreza-se o sobrenadante de cada “poço”, e com o *pellet* de cada micro cultura são efectuadas gotas espessas (Figura II.4 2) em lâmina, que depois de secas durante 24 h, são fixadas com acetona e coradas com Giemsa 1%, durante 1 hora.

### c) Leitura dos resultados dos ensaios de susceptibilidade *in vitro* MARK III

A leitura dos micro-testes é efectuada pela contagem do número de esquizontes, com 3 ou mais núcleos (viáveis), num total de 200 parasitas. Assegura-se de que a cultura

## Metodologia

---

controlo apresente um número visível de esquizontes (superior a 10%), confirmando o crescimento do parasita nas condições de cultura em que decorreram os ensaios. Todos os testes com contaminação bacteriana ou por fungos, ou sem crescimento visível dos parasitas nos controlos (sem fármaco), foram eliminados do estudo.

O resultado da leitura dos micro-testes, pode ser apresentado na forma de um valor da concentração mínima de fármaco que inibe o desenvolvimento de 99% dos parasitas até esquizontes (IC99 ou MIC). Assim, nos estudos no terreno ou em estudos epidemiológicos iniciais, que serviram para a comparação entre regiões geográficas distintas, utilizou-se o padrão IC99 (Tabela II.10).

**Tabela II.10 - Valores de IC99 indicativos de resistência relativamente a cada antimalárico segundo a metodologia MARK III – OMS.**

| Fármaco     | IC99      |
|-------------|-----------|
| Cloroquina  | ≥ 80 nM   |
| Mefloquina  | ≥ 320 nM  |
| Quinino     | ≥ 2560 nM |
| Amodiaquina | ≥ 40 nM   |

### **II.3.7 - Estudo da associação dos polimorfismos dos genes *pfy-gcs*, *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2* e a resposta *in vitro* de isolados de pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* aos fármacos cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino**

O teste de *Fisher* é utilizado para o número de variáveis e o tipo de resposta pretendida, bem como pela dimensão da amostra destes ensaios. O teste de *Fisher* permite calcular o valor da probabilidade exacta para a determinação da associação entre duas variáveis, correspondendo aqui à resposta resistente/sensível (R/S) aos antimaláricos e aos polimorfismos detectados. Os dados foram agrupados numa tabela de contingência de duas entradas e o teste foi realizado com o apoio informático *on line* em [www.physics.csbsju.edu/stats/fisher.form.html](http://www.physics.csbsju.edu/stats/fisher.form.html), com um intervalo de confiança de 95, de onde resultam associações estatisticamente significativas quando o valor de  $P \leq 0,05$ . As infecções com mais de um tipo de *P. falciparum* não foram incluídas no cálculo da associação de cada genótipo ao fenótipo do isolado.

### **II.3.8 - Expressão de *pfmrp1* e *pfmrp2* e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum* na presença e ausência de fármaco**

Estes estudos foram efectuados com o objectivo de estudar o perfil de expressão dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* que codificam para proteínas do tipo MRP (cuja caracterização constituiu um dos objectivos deste trabalho) e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo em *P. falciparum*, listadas seguidamente: *pfγ-gcs* (gama-glutamylcisteína sintetase), *pfgr* (glutatião reductase), *pfg6pd* (glucose-6-fosfato desidrogenase), *pfgps* (glutatião peroxidase), *pfgst* (glutatião S-transferase), *pftrxr* (tioredoxina reductase), *pftrx-px1* (tioredoxina peroxidase 1) e *pfFe-sod* (Fe-superoxidismutase).

#### **a) Determinação do valor de IC50 relativo aos clones 3D7 e Dd2 em resposta à presença de cloroquina e mefloquina**

Para avaliar a susceptibilidade *in vitro* dos clones 3D7 e Dd2 *P. falciparum* aos fármacos cloroquina e mefloquina, procedemos conforme descrito em II.3.5.3. O cálculo do IC50 foi determinado por ajustamento de uma regressão não linear recorrendo à aplicação *GraphPad Prism 4.0*.

#### **b) Micro-cultura de parasitas na presença e ausência de cloroquina ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum***

Os clones de *P. falciparum* 3D7 (sensível á cloroquina, CQS) e Dd2 (resistente á cloroquina, CQR) foram mantidos em cultura nas condições descritas em II.2.1 e sincronizadas conforme descrito em II.2.1.2. Seguidamente, foram estabelecidas microculturas de 240 µl cada com 1% de parasitémia, em placas de 96 poços (Nunclon), mantida durante 52h, o meio de cultura foi substituído de 24/24h. De 2/2h foram adicionados 7,5 µl de uma solução de cloroquina (de forma a obter o valor de IC50 para cada clone), incubadas durante 2h, o mesmo volume de meio RPMI foi adicionado a uma segunda microcultura (controlo sem fármaco). Decorridas as 2h de incubação, as microculturas com fármaco e sem fármaco foram recolhidas, centrifugadas a 900xg, removidos 140µl de sobrenadante, adicionados 100µl de PBS e 200µl do tampão *Nucleic Acid Purification Lysis Solution* (Applied Biosystems). Esta mistura foi seguidamente armazenada a -80°C. De cada microcultura, no momento da recolha, foi

efectuado um esfregaço o qual foi fixado e corado com giemsa e com DAPI, para avaliação do desenvolvimento dos parasitas. O processo, foi repetido para cada um dos dois clones, em 3 ensaios.

Esta parte do trabalho foi realizada em Lisboa no Laboratório de Malária do CMDT LA/IHMT.

### **d) Extracção de mRNA e síntese de cDNA**

A extracção de mRNA, síntese de cDNA e reacções de PCR em tempo real foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular IV da Universidade Complutense de Madrid, Espanha.

A extracção de mRNA e síntese de cDNA das 318 amostras processadas em III.4.4.5.6., foi realizada usando o equipamento *ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Preperation* (Applied Biosystems) com placas *Total RNA Purification Tray* (Applied Biosystems) e a solução de extracção de mRNA *AbsoluteRNA Wash Solution* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. O mRNA foi retrotranscrito, usando *random primers*<sup>46</sup> e o conjunto de reagentes *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems) segundo as instruções do fabricante.

### **II.3.8.1 - Quantificação relativa da expressão dos genes por RT-PCR usando o método dos C<sub>T</sub>s comparativos (2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>)**

As reacções de PCR em tempo real foram realizadas num equipamento *ABI PRISM 7000 Sequence Detector* da PE Applied Biosystems recorrendo ao kit de amplificação *TaqMan universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG* (Applied Biosystems). Foram realizados ensaios independentes e cada um deles em triplicado. As condições de reacção, os *primers* e os *beacons* encontram-se na Tabela II.11.

A quantificação relativa da expressão dos genes estudados neste trabalho foi efectuada pelo método 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>. A quantificação relativa, descreve a alteração da expressão de um determinado gene em circunstancias diferentes. Pode ser em relação a um controlo não tratado ou ao longo do tempo. Não sendo necessário determinar o número de transcritos do gene mas apenas a variação da quantidade de transcritos do gene em condições

---

<sup>46</sup> *Random primers* - refere-se a oligonucleotidos (*primers*) de 6 a 8 bps com sequencia aleatória, assim todos os transcritos têm identica probabilidade servir de molde à síntese de cDNA (Livak & Schmittgen, 2001). De grande utilidade na síntese de cDNA para estudos expressão relativa de genes, de forma a evitar o enriquecimento da estimativa das quantidades relativas de mRNA.



## Metodologia

---

diferentes (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Zakrajsek, 2000; Winer *et al.*, 1999). Como controlo interno da quantidade total de mRNA, foram utilizados genes de expressão constitutiva, *pfb-actin1* (Tabela II.6) e *18S* (Tabela II.11). Esta abordagem foi assim considerada adequada aos objectivos do presente estudo e o modelo matemático escolhido foi  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , descrito em pormenor em (Livak & Schmittgen, 2001). Este modelo permite determinar a variação de expressão ( $N$ ) de um gene pela equação **A**;

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (\text{equação A})$$

em que;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{contolo interno}})_{\chi} - (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{contolo interno}})_{\gamma} \quad (\text{equação B})$$

onde  $\chi$  amostra (na qual se está estudar a variação de expressão do gene alvo) e  $\gamma$  amostra calibrador (em relação á qual se está estudar a variação de expressão do gene alvo). A aplicação deste modelo implica o cumprimento dos seguintes pressupostos:

- a) a reacção de PCR de cada gene deve ter eficiência próxima de 100%.
- b) a eficiência das reacções de PCR do gene alvo e controlo interno devem ser idênticas.

## Metodologia

**Tabela II.11 - Sequência dos *primers* e *beacons* para estudo da expressão dos genes de resposta ao stress oxidativo e *pfmrp1* e *pfmrp2*.**

| Gene<br>código de acesso*     | Sequência dos <i>Primers</i> e <i>Beacons</i><br>(5'-3')  | Mistura de reacção                                       |
|-------------------------------|---|--|
| <i>pfγ-gcs</i><br>PFI0925w    | PF - AGATGCTATGTTTTTGGTATGAGTATGT<br>PR - ACTAGCCGTTATTGCACCACTT<br>B-AACAATTAACCATGTCTTTTCCAAC   | H <sub>2</sub> O.....5µl<br>Master Mix...12.5µl          |
| <i>pfgr</i><br>PF14_0192      | PF - AGTGGAGGAATGGCTGCAG<br>PR - TGTCGAAAAATCCCGTTTAGG<br>B-AGCAAGGCATAACGCAA                     | PF.....300nM<br>PR.....300nM<br><i>Beacon</i> .....200nM |
| <i>pfgst</i><br>PF14_0187     | PF - AACGGTGATGCTTTTGTGAA<br>PR - AATTGGAGATTTGATATTAGCTCA<br>B-AAGAAAAGGATACTCCTTTTGAGCAAGTA     | cDNA.....5µl   |
| <i>pfgpx</i><br>PFL0595c      | PF - AATTGTGATTCGATGCATGATG<br>PR - TTGAAAAATTTCTCGTCGATAAA<br>B-CGTTAAAAAGTATCGGATGGAATT         | <b>Condições de PCR</b>                                  |
| <i>pfmrp1</i><br>PFA0590w     | PF - AAGAAAGTCACTGGGGTTATTC<br>PR - TCGTAAAAGGGAATACGGAGA<br>B-TGTTTGATGAAGTGAACCTTAATCATGTAAACA  | 50°C - 2 min<br>95°C - 10 min                            |
| <i>pfmrp2</i><br>PFL1410c     | PF - AGCCACATAAACGATTTGTCAA<br>PR - TTAACGTGTACAGGCTCCGA<br>B-TGTTTCGAGCATGGATAGCAACACC           | 57°C - 1min<br>95°C - 30sec } 29 X<br>45°C - 29sec       |
| <i>pftrxr</i><br>PFI1170c     | PF - TTGTAATAATTCCTCAATATTT<br>PR - AATTAGCGCCCGTGGC<br>B-GCTGTAGGAGACGTAGCTGAAAATGTCCC**         |  |
| <i>pf2-CysPx</i><br>PF14_0368 | PF - TGCTGTACAACACCACGAACA<br>PR - AGGTAGCCATGAAACCATCAGA<br>B-GAGATGTTTGCCAGCAAACCTGG            |  |
| <i>pfg6pd</i><br>PF14_0511    | PF - GAACTCCAGGAAAAACAAGTCAAG<br>PR - AAAGAGGTATTTGGACTTGTCAAAA<br>B-TCTTAAATATCTTTTGGATCATCAGGCC |  |
| <i>pfFe-sod</i><br>PF08_0071  | PF - CAACGCTGCTCAAATATGGA<br>PR - TGTGGTGGTGAGCCTCATG<br>B-TACTTTTTACTGGGATTCTATGGACCT            |  |
| <i>18S</i><br>M19172          | PF - TGACTACGTCCTGCCCTT<br>PR - CCGATTGAAAGATATGATGAATTGT<br>B-ACACCGCCCGTCGCTCC                  |  |

\*código de acesso da sequência registada no PlasmDB; \*\* os nucleótidos sublinhados correspondem a alterações à sequência do gene introduzidas para aumentar a eficiência do beacon. PF - *primer* directo, PR - *primer* reverso, B - *beacon*)

### a) Cálculo da eficiência da reacção de RT-PCR de cada gene

O calculo da eficiência das reacções de PCR em tempo real para cada gene, foi realizado com bases na variação dos valores de C<sub>T</sub> em função da diluição da amostra, foram usadas as seguintes diluições seriadas de DNA: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>. Foi construída uma curva de calibração para cada gene (exemplificada na Figura II.9),

## Metodologia

---

calculado o seu declive ( $m$ ) e a partir deste a eficiência ( $E$ ) pela equação:  $E=10(-1/m)$ , em que  $E=2$  corresponde a uma eficiência de 100% (Livak & Schmittgen, 2001).

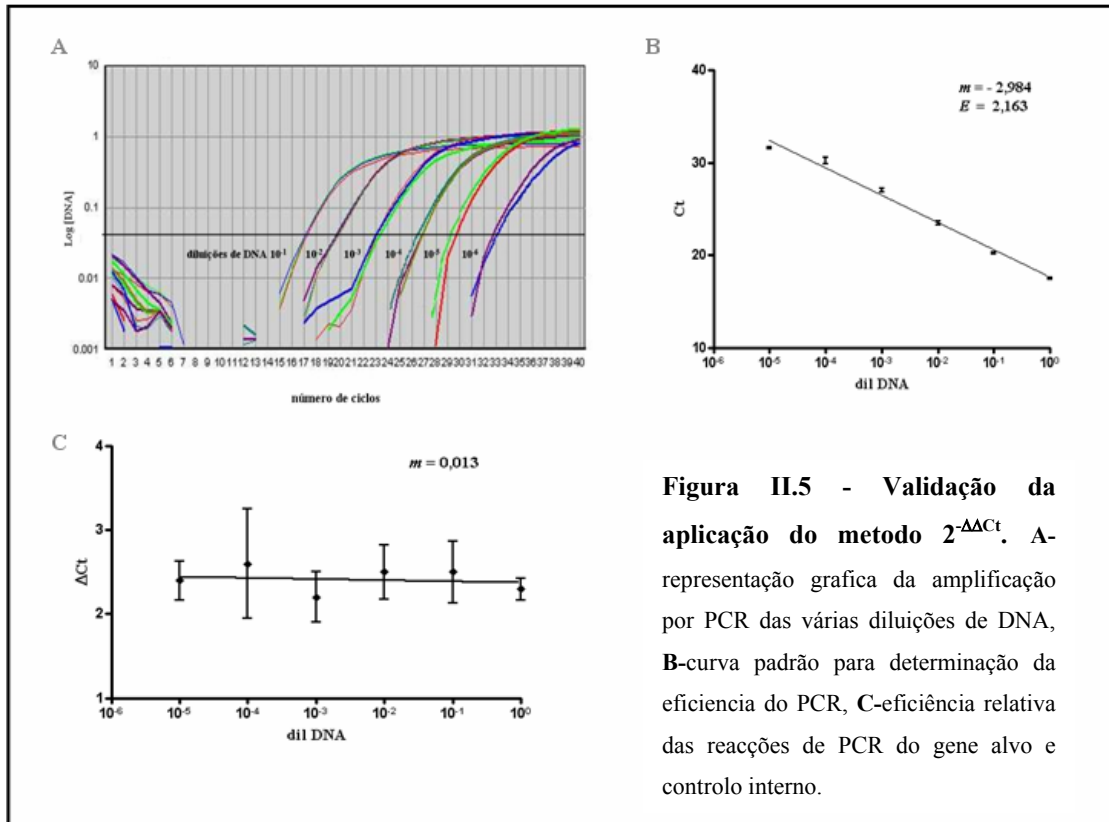
As concentrações dos *primers*, foram sujeitas a uma etapa prévia de optimização. Nos métodos em que foram usadas sondas TaqMan e beacons foi fixada a concentração da sonda ou beacon em 200nM<sup>47</sup> e testadas as seguintes concentrações de *primers*: 50, 100 e 300nM. As mesmas concentrações de *primers* foram testadas no caso em que foi usado o método SYBR Green. Foram escolhidas as concentrações de *primers* e sonda a que correspondiam os menores valores de  $C_T$  e os maiores valores de  $\Delta Rn$  (Figura II.2). Após a decisão sobre as concentrações óptimas dos *primers*, procedeu-se à optimização da concentração da sonda. Foram testadas as seguintes concentrações: 50, 100 e 200nM.

### **b) Cálculo da eficiência da reacção de RT-PCR do gene alvo e em relação ao gene controlo interno**

O segundo pressuposto para aplicação do método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , refere-se à semelhança entre as eficiências de reacção de amplificação, dos genes alvo e de referência. A partir da curva de calibração de ambos os genes, alvo e controlo (referida em II.3.7.4.1), foi calculada a media dos  $C_T$  e determinada a diferença de  $C_T$  pela equação:  $\Delta C_T (C_{T, \text{gene alvo}} - C_{T, \text{gene controlo}})$ . O valor de  $m$  da recta de regressão, associada à representação gráfica dos valores  $\Delta C_T$  vs diluições da amostra (Figura II.5), deve ser inferior a 0,1 (consideramos aceitáveis valores de  $m$  entre 0 e 0,1) para que as eficiências das reacções de PCR em tempo real do gene alvo e controlo interno sejam consideradas similares.

---

<sup>47</sup> A escolha da concentração da sonda e beacon em 200nM para o ensaio da optimização dos *primers* foi feita de acordo com as recomendações do protocolo: *Sequence Detection Systems Quantitative Assay Design and Optimization*, PE Biosystems.



**Figura II.5 - Validação da aplicação do método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .** A- representação gráfica da amplificação por PCR das várias diluições de DNA, B-curva padrão para determinação da eficiência do PCR, C-eficiência relativa das reacções de PCR do gene alvo e controlo interno.

### II.3.8.1.1 - Análise de resultados relativos à expressão

Considerando que os valores utilizados no tratamento dos resultados correspondem à média dos triplicados realizados, a precisão e a reprodutibilidade intra-ensaio do PCR em tempo real é fundamental. Estes parâmetros foram avaliados pela determinação do desvio padrão (DP), apresentado pelas 3 réplicas de cada ensaio, relativamente à média dos valores de  $C_T$ . O desvio padrão associado a cada conjunto de triplicados, não pode apresentar um valor superior a 0,38 (Livak & Schmittgen, 2001) sendo eliminadas as determinações cujo desvio padrão seja superior a este valor.

**a) Cálculo do coeficiente de correlação de *Pearson* entre os perfis de expressão obtidos para os clones 3D7 e Dd2 dos genes de enzimas de resposta ao stress *pfmrp1* e *pfmrp2*.**

À semelhança de outros autores (Llinas *et al.*, 2006a; Le Roch *et al.*, 2003a; Bozdech *et al.*, 2003) e para amostras de dimensões e condições experimentais comparáveis, assumimos que a nossa amostra segue uma distribuição aproximada à Gaussiana (esta aproximação foi também verificada pelo teste de Kruskal-Wallis). O coeficiente de

## Metodologia

---

*Pearson*, foi determinado recorrendo à aplicação GraphPad PRISM<sup>®</sup> versão 4.0, dado que não assumimos previamente qual o sentido (positiva ou negativa) da correlação, usamos o teste *two-tail P value* para determinar o valor do coeficiente de Pearson *r* e *P*.

### **b) Regulação dos genes em estudo no ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum***

Consideramos que o gene é regulado quando os valores de *p* da ANOVA foram  $P < 0,050$  (para  $\alpha=0,05$ ) e se verificou alteração da amplitude de expressão de pelo menos 1,5 vezes ( $N_{\text{fold}} \geq 1,5$ ) entre estadios (critérios idênticos aplicados por (Le Roch *et al.*, 2003a). Os parâmetros da ANOVA foram determinados recorrendo à aplicação GraphPad PRISM<sup>®</sup> versão 4.0.

### **II.3.8.2 - Análise da estabilidade do mRNA dos genes em estudo**

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular IV da Universidade Complutense de Madrid, Espanha, sob orientação do Professor Doutor José Manuel Bautista.

### **a) Micro-cultura de parasitas na presença e ausência de cloroquina ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum***

Os clones de *P. falciparum* 3D7 e Dd2 foram mantidos em cultura nas condições descritas em II.2.1. Seguidamente, foram estabelecidas 39 microculturas (assincrónicas) de 240 µl cada com 1% de parasitemia, em placas de 96 poços, mantidas durante 8h. Para cada clones utilizou-se uma placa distinta.

Recolheram-se 3 amostras da microcultura/clone, às 0h, centrifugadas a 900xg, removidos 140µl de sobrenadante, adicionados 100µl de PBS e 200µl do tampão *Nucleic Acid Purification Lysis Solution* (Applied Biosystems) congeladas separadamente a -80°C.

Logo a seguir, foi adicionada Actinomicina D (20 µg/ml) às 36 microculturas restantes, e 7,5 µl de uma solução de cloroquina (CQ) - distinta, que corresponde ao valor de IC50 da cada um dos clones utilizados - a apenas 18 destas. As culturas foram incubadas nas condições descritas em II.2.1. Decorridas a 1, 2, 4, 6 e 8h de incubação, foi recolhida uma amostra, em triplicado, de cada microcultura - tratada ou não com CQ – e tratadas

## Metodologia

---

como acima mencionado e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O processo, foi repetido para cada um dos dois clones, em 3 ensaios.

### **b) Extração de mRNA e síntese de cDNA**

A extração de mRNA, síntese de cDNA foi realizada conforme descrito em II.3.8 d).

### **c) Análise da estabilidade do mRNA dos genes em estudo**

A quantificação relativa da expressão dos genes por RT-PCR usando o método dos CTs comparativos ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ) foi realizada conforme descrito em II.3.8.4.

As curvas de degradação do mRNA foram obtidas considerando 100% a quantidade de mRNA de cada gene no tempo 0h (ou seja, imediatamente antes da adição de Actinomicina D), as restantes medições realizadas (1, 2, 4 e 8h após adição de Actinomicina D) foram transformadas em percentagens relativas ao tempo 0h. Aos valores em % foi ajustada uma curva do tipo exponencial de decaimento de uma fase, para determinar o valor da constante de decaimento  $K$ . A semi-vida do mRNA para cada gene na presença e ausência de cloroquina foi determinada pela formula  $t_{1/2}=\text{Ln}(2/K)$ .

### **II.3.9 – Produção de soros hiper imunes para detecção das proteínas codificadas pelos genes *pfmrp1* e *pfmrp2***

Esta parte do trabalho foi realizada no Molecular Parasitology and Molecular Epidemiology Department do Swiss Tropical Institute na Basileia, Suíça, sob supervisão do Professor Hans-Peter Beck.

#### **II.3.9.1 – Identificação *in silico* e amplificação por PCR dos fragmentos a clonar para cada gene**

A análise *in silico*, recorrendo a 3 algoritmos referidos em II.3.1, permitiu gerar os perfis de hidrofobicidade esperados para as proteínas codificadas pelos genes *pfmrp1* e *pfmrp2*. Os *primers* (Tabela II.12) foram desenhados de forma a amplificar 3 fragmentos (insertos a clonar) de cada gene, em locais onde não foi previsto por nenhum dos algoritmos a existência de regiões transmembranares das proteínas codificadas nem foram detectadas alterações da sequência.

## Metodologia

**Tabela II.12 - Sequência dos primers e condições de PCR para amplificação dos fragmentos a clonar do gene *pfmrp1* - MRP1A / MRP1B / MRP1C e de *pfmrp2* - MRP2A / MRP2B / MRP2C.**

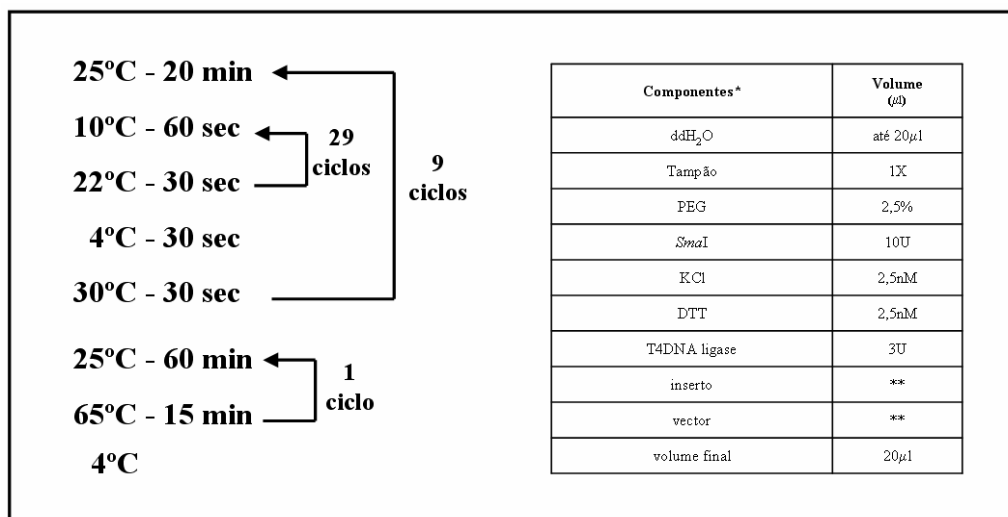
| <i>Fragmento</i> |                  | <b>Sequência dos Primers*</b>                | <b>Mistura de reacção**</b>      |
|------------------|------------------|--|----------------------------------|
|                  | <i>pfmrp1</i>    | <b>3' – 5'</b>                               |                                  |
| MRP1A            | Cmrp1AF          | <u>G</u> .ATG ACG ACA TAT AAA GAA AAT G      | ddH <sub>2</sub> O.....até 25 µl |
|                  | Cmrp1AR          | <u>CC</u> AAT TGA CCA TAA AAT ATT ATG        | Tampão.....1X                    |
| MRP1B            | Cmrp1BF          | <u>G</u> .ATA AAA AAT TAT TTT ATG TAC CG     | dNTPs.....200 µM                 |
|                  | Cmrp1BR          | <u>CC</u> .ATG GTC ATT ATC ACA TTT ATT ATC   | PF.....300 nM                    |
| MRP1C            | Cmrp1CF          | <u>G</u> .TTT GCT AAA ATT TCT AAT AAA G      | PR.....300 nM                    |
|                  | Cmrp1CR          | <u>CC</u> .GTT TAT TAC TTT TGA TG            | Pfu pol.....0,025U/µl            |
|                  | <i>pfmrp2</i>    | <b>3' – 5'</b>                               | <b>Condições de PCR</b>          |
| MRP2A            | Cmrp2AF          | <u>G</u> .ATC AGA ATG AGC AAA GCG ATT TAC    | 94°C - 3 min                     |
|                  | Cmrp 2AR         | <u>CCA</u> TAT TAT ATA TAC TAA TAT CGA ATA C | 94°C – 1min                      |
| MRP1B            | Cmrp 2BF         | <u>G</u> .AT GTT GTA GGT GAA AGT AAT AAT TC  | 52°C – 1min                      |
|                  | Cmrp 2BR         | <u>CC</u> .A TGT CCT TTT TCT TAA AGG ATA T   | 68°C – 1min                      |
| MRP1C            | Cmrp 2CF         | <u>G</u> .TGC TCC AAG ATG ATT AAA GAC        | } 29 ciclos                      |
|                  | Cmrp 2CR         | <u>CCT</u> TCA TAT TTA TTA TTT TTT CTA TC    |                                  |
|                  | <b>Plasmídeo</b> | <b>3' – 5'</b>                               |                                  |
|                  | pGEXF            | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG                      |                                  |
|                  | pGEXR            | CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG                      |                                  |

Os fragmentos foram amplificados com *Pfu-Polymerase*, uma polimerase que permite obter extremidades *blunt* (não coesivas), necessárias à clonagem por ciclos sucessivos de ligação e restrição (*Cycle Restriction Ligation*) (Figura II.6).

### II.3.9.2 - Clonagem dos fragmentos no vector pGEX-6P-1-His por CRL

Os produtos de PCR obtidos em II.3.6.1, foram purificados com o kit *Quiaquick PCR Purification* (Qiagen) e ligados ao vector por CRL. A CRL foi realizada em termociclador (Eppendorf), a mistura de reacção e as condições de restrição e ligação encontram-se descritas na Figura II.6.

## Metodologia



**Figura II.6 - Programa e componentes da mistura de CRL (Cycle Restriction Ligation) usados na clonagem de cada fragmento no plasmídeo pGEX-6P-1-His.** PEG – polietileno glicol; DTT – ditioneitol; \* à exceção da H<sub>2</sub>O bidestilada (ddH<sub>2</sub>O) e PEG (Sigma) todos os componentes da mistura são da NewEngland Biolabs.

A técnica de CRL, permite obter uma maior proporção de plasmídeos com o inserto ligado. Os plasmídeos, são linearizados por restrição do único local reconhecido pela *Sma*I, é aqui que se liga o inserto, inativado o local de corte. Nos ciclos seguintes os plasmídeos com inserto não sofrem restrição mas aqueles sem inserto voltam a ser cortados, aumentando as probabilidades de obter plasmídeos com inserto. Depois do ultimo ciclo as enzimas *Sma*I e T4DNA ligase são inativadas pela temperatura (65°C - 15min).

### II.3.9.3 – Transformação de *E.coli* JM 109/SURE® e seleção por PCR, das colónias contendo o inserto na orientação correcta

As bactérias electrocompetentes (descrito em II.2.8) foram descongeladas em gelo e 40μl de células misturadas gentilmente com 1μl de produto de CRL (descrito em II.3.6.2), esta mistura foi transferida para a *cuvette* de electroporação e incubada em gelo cerca de 1 min. A electroporação foi realizada num electroporador (*Easyject*® Equibrio) e aplicado um pulso de 2,5 kV, 25μF, 5msec e 201Ω.

Imediatamente depois do pulso, as células foram transferidas para 1ml de LB liquido e incubadas a 37°C com agitação orbital a 225 rpm durante 30 min, para permitir a expressão do gene de resistência à ampicilina. A partir desta cultura 100μl foram plaqueados em LB agar com ampicilina (100 μg/ml) e incubados a 37°C durante a noite. Apenas as células transformadas com o plasmídeo formaram colónias.



### II.3.9.4 – Selecção das colónias contendo o inserto na orientação correcta, por PCR

Cada colónia de bactérias obtida em II.3.6.3 foi recolhida com um palito estéril. Uma parte foi transferida para placa de LB agar com ampicilina (e incubada 37°C) e o resto da colónia, usado directamente para PCR. A orientação correcta do inserto foi verificada usando o *primer* directo (pGEXF) do plasmídeo e o *primer* reverso de cada fragmento. As condições de PCR e os *primers* encontram-se descritas na Tabela II.12. Os fragmentos resultantes foram verificados em gel de agarose nas condições descritas em II.2.6. Os produtos de PCR com o tamanho esperado foram purificados com o kit *Quiaquick PCR Purification* (Qiagen) e sequenciados nos dois sentidos, para garantir que correspondiam à sequência nucleotídica esperada.

#### a) Extração de DNA plasmídico dos clones *E.coli* JM 109/SURE® contendo o inserto na orientação correcta

Após confirmação da orientação e sequência correctas do inserto, os clones foram cultivados durante a noite em meio LB líquido com ampicilina (ANEXO 1) (37°C com agitação). A cultura obtida foi centrifugada a 4000 x g, 4°C, durante 15 min e o DNA plasmídico extraído com o kit CONCERT™ *Rapid Plasmid Miniprep System* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Sumariamente, consiste na lise da célula bacteriana e adsorção do DNA plasmídico à membrana de sílica das colunas fornecidas em conjunto com o *kit*, o DNA é depois eluído da membrana através da passagem de água na coluna por centrifugação.

### II.3.9.5 – Transformação de *E. coli* BL21 com o DNA plasmídico e selecção dos clones que expressavam as proteínas recombinantes MRP1A / MRP1B / MRP1C e MRP2A / MRP2B / MRP2

O DNA plasmídico extraído de cada clone (III.3.6.4) foi usado para transformar por electroporação *E. coli* BL21 (conforme descrito em II.3.6.3), a estirpe de bactérias onde foram expressadas as correspondentes proteínas recombinantes.

Cada clone foi cultivado em 500ml de LB líquido com ampicilina (ANEXO 1), a 37°C com agitação até atingir densidade O.D.<sub>600</sub> = 1,0. A expressão da proteína recombinante foi induzida por adição de 4ml de IPTG<sup>48</sup>, (100mM), durante 4 h a 37°C com agitação. Uma aliquota de cada cultura foi recolhida e cultivada em condições idênticas mas sem adição de IPTG para servir de controlo negativo de expressão.

---

<sup>48</sup> O IPTG é um indutor da transcrição genética que aumenta a quantidade da enzima T7 RNA polimerase, a qual se liga ao promotor T7, iniciando a transcrição do cDNA de interesse.

## Metodologia

---

De cada cultura (induzida e não induzida) foi recolhida uma alíquota (200µl), centrifugada (10000 x g, 1min) e rejeitado o sobrenadante. Os pellets foram ressuspensos em 40 µl em tampão de *Laemmli* (ANEXO 2), aquecidos a 95°C durante 5 min e aplicados em gel SDS-PAGE (ver II.2.11).

### **II.3.9.6 – Purificação das proteínas recombinantes a partir de cultura dos clones *E. coli* BL21 seleccionados**

As proteínas recombinantes obtidas em II.3.6.5, foram purificadas em colunas de resina de Níquel (*Ni-NTA*, Quiagen), seguindo as instruções do fabricante e eluídas da coluna por alteração do pH. As fracções recolhidas foram analisadas em gel SDS-PAGE (ver II.2.11) e quantificadas (II.2.10) antes de serem inoculadas em ratinhos para a produção do soro hiper imune correspondente.

### **II.3.9.7 – Inoculação de ratinhos para a produção de soro hiper imune contra as proteínas recombinantes**

Para obter os soros hiper imunes, foram inoculados 2 ratinhos (*Mus musculus* estirpe C57BL6) para cada clone, com as fracções das proteínas recombinantes obtidas em II.3.6.6. Cerca de 10µg de cada proteína foram inoculadas subcutaneamente em cada ratinho, passados 14 dias foi repetida a inoculação dos mesmos ratinhos com 10µg de proteína. Vinte e oito dias depois da 1ª imunização, os ratinhos foram sacrificados e o sangue (~1 ml) recolhido por punção cardíaca. Depois de coagulado, o sangue foi centrifugado a 4500 x g, 4 min, e o soro separado em alíquotas de 20µl cada e armazenado a -20°C.

### **II.3.9.8 – Detecção das proteínas PfMRP1 e PfMRP2**

#### **a) Extracção de proteínas totais de *P. falciparum* a partir de cultura *in vitro***

A extracção de proteínas totais de *Plasmodium falciparum* foi efectuada a partir de cultura *in vitro* conforme descrito em II.2.9.

#### **b) Detecção das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 por *Western Blot***

Prepara-se um gel SDS-PAGE (ANEXO 3). Diluem-se as amostras de proteínas de 1:2 em tampão de *Laemmli*, e submetem-se estas amostras à temperatura de 96°C/ 5 mn.

## Metodologia

---

Carregam-se as amostras no gel ( $\approx 40\mu\text{l}$ / poço) que se submete a uma voltagem de 40 V, até a frente do corante sair do gel de empacotamento, aumentando-se a voltagem para 120 V, até todo o corante sair do gel de separação.

As proteínas do gel são transferidas (por um período de 2 h a 200 mA) a 4°C para membranas PVDF.

Bloqueia-se a membrana à temperatura ambiente durante pelo menos 2 h com 5% de leite em pó magro em tampão de neutralização e agitação. Lava-se a membrana 2 X /10 minutos com tampão de neutralização e agitação.

Aplica-se o soro hiper imune específico (1° Ac) diluído (1:500) em tampão de neutralização, em volume suficiente para cobrir toda a membrana, com incubação à temperatura ambiente durante 1 h, com agitação.

Retira-se por decantação a solução do 1°Ac e lava-se a membrana 2 X /10 minutos com tampão de neutralização e agitação. Decanta-se e aplica-se o 2° Ac diluído em tampão de neutralização (1:2 000), em volume suficiente para cobrir toda a membrana. Incuba-se à temperatura ambiente durante 1h, com agitação.

Após retirar a solução do 2°Ac lava-se a membrana 2 X / 10 minutos com tampão de neutralização e agitação e 1x /10 minutos com tampão de revelação com  $\text{MgCl}_2$ .

Finalmente, retira - se este e aplica-se uma solução de BCIP/NBT (5-boromo-4-cloro-3indol fosfato p-toloidina/p-nitro cloreto azul de tetrazolium) (Color Development Solution, BIORAD) em tampão de revelação (1/1000 v/v) em volume suficiente para cobrir toda a membrana. Aguarda-se durante 5 minutos até aparecimento das bandas, e interrompe-se a reacção com  $\text{H}_2\text{O}$ .

### **c) Detecção de *P. falciparum* em eritrócitos infectados pela técnica de imunofluorescência IFA (*immunofluorescence assay*).**

As lâminas para detecção dos parasitas por IFA preparadas recorrendo aos dois métodos de fixação, com acetona e com para-formaldeído, foram incubadas com os soros hiper imunes seguindo idêntico protocolo. As lamina foram bloqueada com uma solução de PBS 1% BSA, incubadas à temperatura ambiente em câmara húmida durante 15min. Seguidamente foram lavadas 1 vez com PBS e incubadas à temperatura ambiente, em câmara húmida, com o soro hiper imune obtido em II.3.6.7, durante 60min. Foram lavadas 5 vezes com PBS e incubadas 60min à temperatura ambiente, em câmara húmida, com uma mistura de anticorpo anti-ratinho conjugado com Cy3 (rodamina) (QUIGEN), numa diluição de 1/2000 e corante DAPI numa diluição de 1/100. Lavadas

## Metodologia

---

5 vezes com PBS e montadas com meio de montagem (1ml de Tris 1M pH=8,0 e 9ml de Glicerol).

A detecção dos parasitas em eritrócitos infectados pela técnica de IFA foi também efectuada em esfregaços de cultura assíncrona de *P. falciparum*. As lâminas com esfregaços para detecção dos parasitas por IFA preparadas por fixação com acetona e preparadas por fixação com para-formaldeído, foram incubadas (conforme descrito acima) com os soros hiper imunes MRP1A e MRP2A. A observação das lâminas e fotografias foram efectuadas com filtro 2600 nm para captar emissão da rodamina (vermelho) e com o filtro de 3600 nm para captar a emissão do DAPI (azul).



### III.1 – Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC, nomeadamente da sub-família MRP/CFTR no genoma de *Plasmodium falciparum*

#### III.1.1 – Identificação *in silico* de sequências de genes candidatos a proteínas da família ABC no genoma de *P. falciparum*

No decorrer de trabalho anterior<sup>49</sup>, identificámos um gene codificante para uma proteína da sub-família MRP/CFTR em *P. falciparum*, o qual designamos *pfmrp1*. O trabalho resultou na identificação de um *locus* referenciado como PFMAL1P3, correspondendo actualmente a mesma sequência ao código PFA0590w do PlasmoDB ([www.plasmodb.org](http://www.plasmodb.org)). O gene está localizado no cromossoma 1 de *P. falciparum*.

Ampliando o âmbito do estudo, obtiveram-se agora 37 ORFs, contendo locais de ligação ao ATP, das quais 22 apresentam características compatíveis com as proteínas da super-família ABC (ANEXO 4). Para posicionar cada sequência numa determinada sub-família ABC, cada uma das 22 sequências foi inicialmente comparada com as sequências de domínios conservados disponíveis na base *Conserved Domain* e *CDART: Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). As sequências para as quais este procedimento produziu ambiguidades, foram posicionadas nas sub-famílias a que pertencem as proteínas que lhes são mais semelhantes, quando comparadas com a base de proteínas *SwissProt* (proteínas com função atribuída; [www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot)). Desta forma as sequências foram distribuídas pelas diferentes sub-famílias ABC (Tabela III.14). Foram encontradas sequências compatíveis com a maioria das sub-famílias de ABCs exceptuando a sub-família ABCD (transportadores envolvidos no processamento de ácidos gordos de cadeia longa no peroxissoma (Shani & Valle, 1998). As 22 ORFs identificadas foram assim posicionadas em 8 sub-famílias de proteínas ABCs; ABCA, MDR/TAP, MRP/CFTR, ABCE, GCN20, *White*, SMC e NAP (*Non-intrinsic ABC protein*), (descritas em humanos, plantas ou leveduras).

A previsão da presença de segmentos transmembranares (TMD), foi efectuada recorrendo ao estudo dos perfis de hidrofobicidade calculados pelo modelo matemático de Kyte Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982).

---

<sup>49</sup> Título: "Estudos de biologia molecular aplicada à resistência de *Plasmodium falciparum* à cloroquina", realizado na Unidade de Investigação e Ensino de Malária do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa, no ano de 2002.

## Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC

---

Das 22 sequências identificadas, 11 apresentam segmentos transmembranares e as outras 11 correspondem a proteínas solúveis. Nas sequências **Pgh1** (PFE1150w) **Pgh2** (PF14\_0455), PFC0875w, PF11\_0466, PFC0125w, PFL0495c, PF13\_0271, PF13\_0218, **PfMRP1** (PFA0590w), PFL1410c e PF14\_0244 os perfis de hidrofobicidade são compatíveis com a presença de segmentos transmembranares. Nas sequências **PfGCN20** (PF11\_0225), MAL13P1.344, PF08\_0078, F11\_0317, MAL13P1.96, PFD0685c, PFE0450w, PF11\_0249, PFE1255w, PF14\_0133 e PF14\_0321, os perfis de hidrofobicidade não são compatíveis com a presença de segmentos transmembranares, correspondem previsivelmente a proteínas solúveis (ANEXO 5).

## Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC

**Tabela III.1 - Sequências de genes candidatos a proteínas da família ABC no genoma de *Plasmodium falciparum*.** Na primeira coluna refere-se a designação correspondente à classificação HUGO<sup>50</sup>- A, B, C, D, E e F (Dean & Allikmets, 2001a) ID, código de acesso à sequência na base de dados; a.a. número de aminoácidos da sequência e Chr., Cromossoma. \**Non-intrinsic ABC protein*.

| Sub-família ABC   | Domínios conservados <sup>51</sup>   | Proteína (ID)        | a.a.    | Topologia                   | Chr. |
|---|--|----------------------|---------|-----------------------------|------|
| ABCA  | ABC1 Transportador de diversos compostos lipídicos (membrana plasmática).  | PfABC1<br>PFC0875w   | 3133    | [TMD-ABC] <sub>2</sub>      | III  |
| ABCB<br>(MDR/TAP)   | MTABC3 (também designado ABCB6) transportador expresso (geralmente) na membrana mitocondrial cuja função fisiológica envolve a homeostase do Ferro.  | Pgh1<br>PFE1150w     | 1419    | [TMD-ABC] <sub>2</sub>      | V    |
|   |  | PfMDR3<br>PF11_0466  | 872     | TMD-ABC                     | XI   |
|   |  | PfMDR4<br>PFC0125w   | 1366    | TMD-ABC                     | III  |
|   |  | PfMDR5<br>PFL0495c   | 855     | TMD-ABC                     | XII  |
|   | ATM1 Transportador expresso na membrana mitocondrial, cuja inativação resulta na acumulação excessiva de Ferro na mitocôndria, inativação dos citocromos, lesões por oxidação no DNA mitocondrial e níveis diminuídos de proteínas com Fe no citoplasma. | Pgh2<br>PF14_0455    | 1024    | TMD-ABC                     | XIV  |
|   |  | PfMDR6<br>PF13_0271  | 1049    | TMD-ABC                     | XIII |
| MsbA Transportador de açúcares, iões, péptidos, fosfolípidos e moléculas mais complexas (como lipopolissacarídeos e substâncias bactericidas em bactérias) (membrana plasmática). | PfMDR7<br>PF13_0218  | 925                  | TMD-ABC | XIII                        |      |
| ABCC<br>(MRP/CFTR)  | MRP ( <i>multidrug resistance associated protein</i> ), transportadores de GSSG e diversas substâncias xenobióticas conjugadas ou não com GSH (ex. fármacos) (membrana plasmática).  | PfMRP1<br>PFA0590w   | 1822    | TMD0-[TMD-ABC] <sub>2</sub> | I    |
|   |  | PfMRP2<br>PFL1410c   | 2109*   | TMD0-[TMD-ABC] <sub>2</sub> | XII  |
| ABCE  | Inibidor da RNase L (RLI) Parte do complexo ribossômico tradução (citoplasma).   | PfRLI<br>MAL13P1.344 | 619     | [ABC] <sub>2</sub>          | XIII |
| ABCF<br>(GCN20)   | EF-3 Factor de regulação da tradução; regula a síntese proteica ao nível do alongamento da cadeia de péptidos no ribossoma (citoplasma).   | PfGCN20<br>PF11_0225 | 815     | [ABC] <sub>2</sub>          | XI   |
|   |  | PfABCF1<br>PF08_0078 | 1419    | [ABC] <sub>2</sub>          | VIII |
| ABCG<br>(White)   | EPDR Transporte de precursores do pigmento do olho e de alguns metabolitos da clorofila. Está também associado à regulação dos mecanismos de transporte de lípidos e à resistência pleiotrópica a fármacos (membrana plasmática).                        | PfABCG1<br>PF14_0244 | 660     | ABC-TMD                     | XIV  |
| SMC   | SMC Manutenção da estrutura e coesão dos cromossomas durante a replicação e reparação de lesões no DNA (núcleo).   | PfSMC1<br>F11_0317   | 1818    | ABC                         | XI   |
|   |  | PfSMC2<br>MAL13P1.96 | 1218    | ABC                         | XIII |
|   |  | PfSMC3<br>PFD0685c   | 1193    | ABC                         | IV   |
|   |  | PfSMC4<br>PFE0450w   | 1708    | ABC                         | V    |
|   |  | PfSMC5<br>PF11_0249  | 1268    | ABC                         | XI   |
|   |  | PfSMC6<br>PFE1255w   | 1849    | ABC                         | V    |
| NAP*  | SufC parte do complexo multiproteico SufABCDE envolvido na síntese das proteínas de ferro/enxofre (Fe/S); em procariotas associado à membrana citoplasmática; em parasitas e plantas associado às membranas internas dos plastídeos)                     | PfYcf16<br>PF14_0133 | 347     | ABC                         | XIV  |
|   | CbiO componente de ligação ao ATP do complexo multiproteico CbiMNQO envolvido no transporte de Cobalto, em bactérias, archaea e eucariotas. Associado à membrana citoplasmática.   | PfCbiO<br>PF14_0321  | 171     | ABC                         | XIV  |

<sup>50</sup> The Human Genome Organisation em [www.hugo-international.org](http://www.hugo-international.org).

<sup>51</sup> Domínios conservados identificados por Blast nas bases Conserved Domain e CDART: *Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* ou por homologia com as proteínas da base SwissProt.



### III.1.2 – Pesquisa de homologias das sequências das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 com proteínas da sub-família MRP/CFTR de outros organismos

Foram identificadas duas sequências de proteínas, presumivelmente codificando transportadores da sub-família MRP/CFTR, PfMRP1 e PfMRP2.

A sequência completa de a.a. destas proteínas, foi comparada por BLAST com a base de dados *SwissProt*. (acedida em 15/01/07). Desta pesquisa resultou uma listagem de varias proteínas, classificadas como transportadores ABC, ordenadas pelo grau decrescente de semelhança com cada uma das duas proteínas em estudo. Esta listagem, inclui proteínas da sub-família MRP/CFRT de organismos filogeneticamente tão distantes como: Homem (*Homo sapiens*), leveduras (*Sacharomices cerevisiae*), murganhos (*Mus musculus*), plantas (*Arabidopsis thaliana*) ou tatu (*Dasyopus novemcinctus*). Da referida listagem seleccionamos as seis proteínas com maior grau de semelhança com PfMRP1 (ATMRP2, YBT1, MRP8, BPT1, YCF1 e MRP1) e com PfMRP2 (ATMRP11, MRP8, YOR1, YBT1, CFTR e MRP2), das quais se conhece a função (Tabela III.2).

As duas sequências nas quais foram detectados domínios funcionais compatíveis com as proteínas da sub-família MRP/CFTR (ABCC) em *P. falciparum*, foram analisadas ao nível da estrutura primária no sentido de: **a)** estabelecer o grau de semelhança entre as proteínas codificadas pelos genes *pfmrp1* (PfMRP1) e *pfmrp2* (PfMRP2) e proteínas de outros organismos, já identificadas e caracterizadas funcionalmente; **b)** identificar características próprias da sub-família MRP/CFTR.

## Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC

**Tabela III.2 - Comparação da sequência completa de aminoácidos de PfMRP1 e PfMRP2, com proteínas da base de dados SwissProt.** As 6 proteínas listadas, correspondem àquelas com maior grau de semelhança com a sequência em estudo, por ordem decrescente de homologia.

| Proteína<br><i>P. falciparum</i> | Proteínas<br>semelhantes | Sub-família<br>ABC | Função <sup>52</sup>   | Organismo              | a.a. | Prot. ID |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------|--|------------------------|------|----------|
| <b>PfMRP1</b><br><br>(1822 a.a.) | AtMRP2                   | MRP/CFTR           | Transporte de conjugados de GSH e GSSH vacúolo tonoplasto (Geisler <i>et al.</i> , 2004)   | <i>A. thaliana</i>     | 1623 | Q42093   |
|                                  | YBT1                     | MRP/CFTR           | Transporte de ácidos biliares vacuolar (Kolaczowski <i>et al.</i> , 1996)  | <i>S. cerevisiae</i>   | 1661 | P32386   |
|                                  | AtMRP1                   | MRP/CFTR           | Transporte de conjugados de GSH e GSSG. Localiza-se na membrana do vacúolo (tonoplasto) (Li <i>et al.</i> , 1997)  | <i>H. sapiens</i>      | 1622 | Q96J66   |
|                                  | BPT1                     | MRP/CFTR           | Transportador de bilirubina não conjugada e detoxificação de metais pesados por conjugação com glutatião (Sharma <i>et al.</i> , 2002; Petrovic <i>et al.</i> , 2000)  | <i>S. cerevisiae</i>   | 1559 | P14772   |
|                                  | YCFI                     | MRP/CFTR           | Transporte substâncias orgânicas conjugadas com GSH (Tommasini <i>et al.</i> , 1996; Li <i>et al.</i> , 1996) e metais pesados (ex. Cádmi) conjugados com GSH (Li <i>et al.</i> , 1997)  | <i>S. cerevisiae</i>   | 1515 | P39109   |
|                                  | MRP1                     | MRP/CFTR           | Transporte de aniões orgânicos conjugados com GSH, GSSG e resposta celular ao stress oxidativo (Cole <i>et al.</i> , 1992b). Não está completamente esclarecido o mecanismo pelo qual a presença de GSH potencia o transporte de conjugados pela MRP1 (Deeley <i>et al.</i> , 2006). | <i>H. sapiens</i>      | 1531 | P33527   |
| <b>PfMRP2</b><br><br>(2109 a.a.) | ATMRP11                  | MRP/CFTR           | Transporte de conjugados de GSH e GSSH (Kolukisaoglu <i>et al.</i> , 2002)   | <i>A. thaliana</i>     | 1194 | Q9SKX0   |
|                                  | YOR1                     | MRP/CFTR           | Permease associada à resistência pleiotrópica a fármacos (ex. oligomicina) (Le Crom <i>et al.</i> , 2002; Katzmann <i>et al.</i> , 1995).  | <i>S. cerevisiae</i>   | 1477 | P53049   |
|                                  | YBT1                     | MRP/CFTR           | Transporte de ácidos biliares (Goffeau <i>et al.</i> , 1996).  | <i>S. cerevisiae</i>   | 1661 | P32386   |
|                                  | MRP8                     | MRP/CFTR           | Transporte de ácidos biliares e importação de conjugados lipofílicos de glutatião (Tammur <i>et al.</i> , 2001)  | <i>H. sapiens</i>      | 1382 | Q96J66   |
|                                  | MmCFTR                   | MRP/CFTR           | Canal de Cloro (Tata <i>et al.</i> , 1991).  | <i>M. musculus</i>     | 1476 | P26361   |
|                                  | DnCFTR*                  | MRP/CFTR           | Canal de Cloro (Antonellis, A. <i>et al</i> 2006)  | <i>D. novemcinctus</i> | 1482 | Q07E42   |

As regiões de ligação ao ATP (NBD1 e NBD2) em PfMRP1 e PfMRP2 foram identificadas comparando, por alinhamento, cada uma das sequências com as seis proteínas de diferentes organismos que lhes eram mais semelhantes (ANEXO 6). Os resultados de cada alinhamento encontram-se na Figura III.1 e Figura III.2, onde estão assinaladas características da super-família ABC como, a assinatura ABC, os *Walker A* e *Walker B*, *Q-loop*, *D-loop* e *H-loop*. As sequências foram truncadas, sendo apresentados apenas os NBD1 e NBD2 de cada proteína.

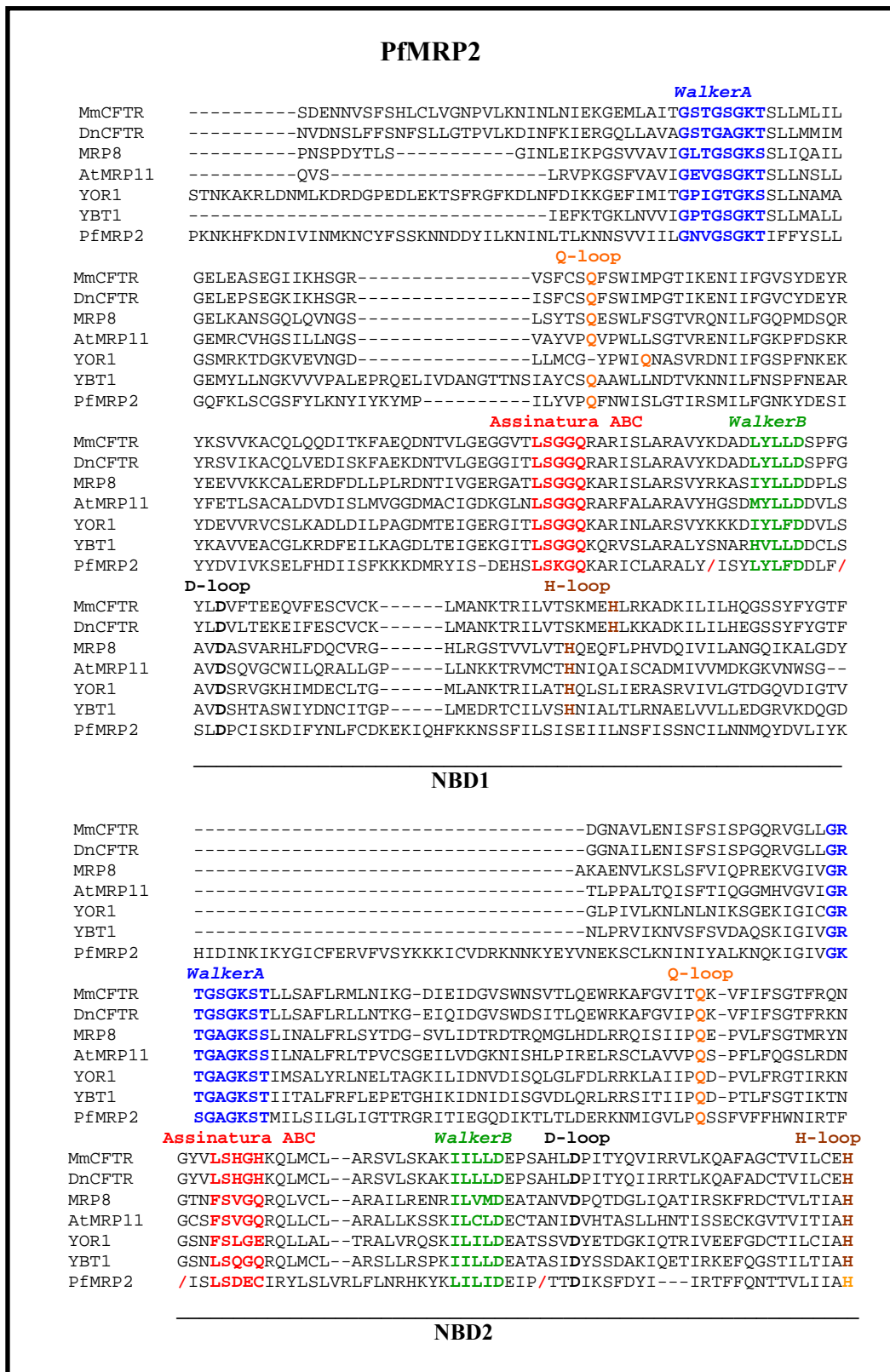
<sup>52</sup> Função biológica atribuída por algumas publicações

# Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC



**Figura III.1 - Comparação da sequência de a.a. dos NBDs de PfMRP1 de *P. falciparum*, com as seis proteínas com o maior grau de semelhança ao nível da estrutura primária identificadas pelo BLAST. As sequências foram truncadas nos locais assinalados com traços oblíquos a vermelho. O alinhamento das sequências dos NBD (nucleotide binding domain) 1 e 2 foi gerado pelo ClustalW.**

## Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC



**Figura III.2 - Comparação da sequência de a.a. dos NBDs de PfMRP2 de *P. falciparum*, com as seis proteínas com o maior grau de semelhança ao nível da estrutura primária identificadas pelo BLAST. As sequências foram truncadas nos locais assinalados com traços oblíquos a vermelho. O alinhamento das sequências dos NBD (nucleotide binding domain) 1 e 2 foi gerado pelo *ClustalW*.**

## Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC

Nos transportadores MDR/TAP os dois NBDs são semelhantes entre si, enquanto que no os NBDs dos membros da sub-família MRP/CFTR são distintos (Borst & Genest, 2006). Esta característica foi identificada nas sequências em estudo PfMRP1 e PfMRP2 e na sequência da Pgh1 de *P. falciparum*. Os valores de *scor* resultantes da comparação das sequências aminoacídicas dos NBD1 e NBD2 de PfMRP1 foi 17,0732 para PfMRP2 14,0097 e para Pgh1 22,4176 (ANEXO 7).

A previsão do número e localização das hélices transmembranares nas sequências de PfMRP1 e PfMRP2, foi efectuada recorrendo a 3 aplicações distintas SOSUI, TMHMM e HMMTOP. Adicionámos à análise, proteínas das quais existe informação experimental acerca da sua topologia membranar, para permitir um termo de comparação (Tabela III.3). Os resultados das aplicações diferem entre si, são no entanto orientativos para o desenvolvimento do nosso trabalho, nomeadamente na escolha dos fragmentos a usar posteriormente para a produção de anticorpos para estudos de localização celular e *Western Blot* (ver secção III.4.4 dos Resultados). A aplicação HMMTOP permite introduzir condições como por ex. o NBD da proteína deve ter localização intracelular (ou luminal). Esta condição foi imposta nesta análise permitindo prever a localização da porção N-proximal da proteína, que no caso da sub-família MDR/TAP é intra-celular e no caso da MRP/CFTR é na maior parte dos casos extra-celular o que foi concordante com a nossa análise para PfMRP1 e PfMRP2 (Tabela III.3).

**Tabela III.3 - Previsão do número e orientação das hélices transmembranares, nas sequências de PfMRP1 e PfMRP2.** (TM – hélice transmembranar; \* proteínas de *H. sapiens*).

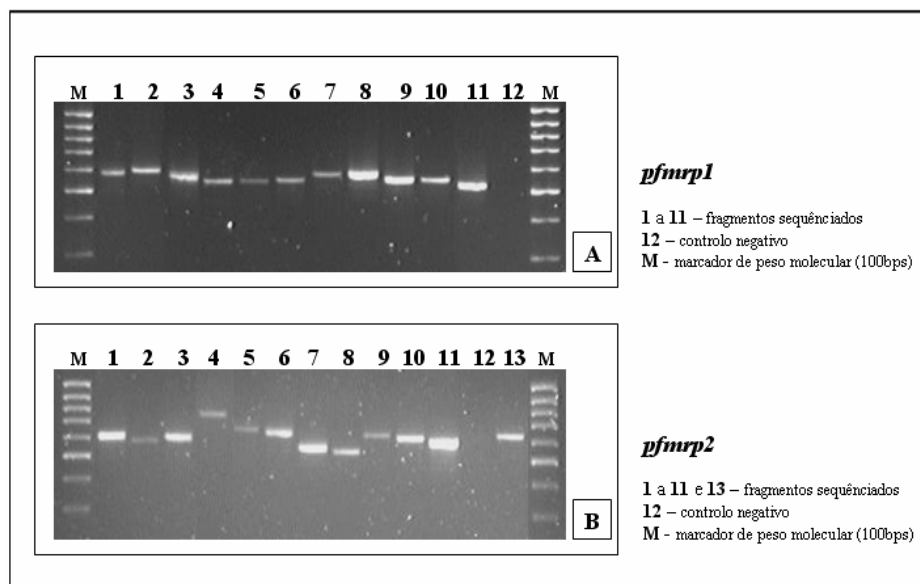
| Proteína | SOSUI | TMHMM |                        | HMMTOP |                        |
|----------|-------|-------|------------------------|--------|------------------------|
|          | TM    | TM    | Extremidade N-proximal | TM     | Extremidade N-proximal |
| PfMRP1   | 13    | 11    | Externa                | 13     | Externa                |
| PfMRP2   | 11    | 11    | Externa                | 9      | Externa                |
| MRP1*    | 17    | 16    | Externa                | 17     | Externa                |
| Pgh1     | 10    | 11    | Interna                | 11     | Interna                |
| MDR1*    | 11    | 10    | Interna                | 12     | Interna                |

### III.1.3 - Sequenciação dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* em *P. falciparum*

Os genes *pfmrp1* e *pfmrp2* foram sequenciados a partir de cDNA dos clones 3D7 e Dd2. Todos os fragmentos resultantes das amplificações por PCR foram purificados e

## Identificação e clonagem de genes codificantes de transportadores ABC

visualizados em gel de agarose (2%) antes de serem enviados para sequenciação. O resultado deste procedimento está exemplificado na Figura III.3.



**Figura III.3 - Resultado da amplificação por PCR a partir de cDNA, após purificação, dos fragmentos dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* a sequenciar.**

### III.1.4 - Análise de seqüências

As seqüências dos diferentes fragmentos sequenciados, foram alinhadas e comparadas com a seqüência das ORFs PFA0590w (*pfmrp1*) e PFL1410c (*pfmrp2*) correspondentes ao clone 3D7, depositadas em [www.plasmodb.org](http://www.plasmodb.org).

#### *pfmrp1* (PFA0590w)

A ORF correspondente a *pfmrp1* possui apenas um exão de 5 469 pares de bases. A composição em AT da ORF é de aproximadamente 78%, percentagem próxima da composição genômica em bases do *P. falciparum* (82%) (Pollack *et al.*, 1982). A região a montante (*upstream*) do codão de iniciação (ATG), apresenta múltiplos codões STOP em todas as grelhas de leitura, o que indica que esta região muito provavelmente não é traduzida e que a ORF representa um gene. Este codifica uma proteína ABC de 1822 a.a, com uma massa molecular prevista de 214.5 kDa. Foram identificadas quatro alterações pontuais (apenas um nucleótido) entre as seqüências do gene *pfmrp1* dos clones 3D7 e Dd2, os resultados encontram-se na Tabela III.4. As 4 alterações resultam em alteração do a.a. codificado (ANEXO 8).

**Tabela III.4 - Alterações identificadas na sequência do gene *pfmrp1* nos clones 3D7 e Dd2. a.a aminoácido.**

| <i>pfmrp1</i> |                            |       |            |       |
|---------------|----------------------------|-------|------------|-------|
|               | 3D7                        |       | Dd2        |       |
|               | nucleótido                 | a.a   | nucleótido | a.a   |
|               | <i>alterações pontuais</i> | 571c  | 191H       | 571t  |
|               | 1309t                      | 437S  | 1309g      | 437A  |
|               | 2626a                      | 876V  | 2626g      | 876I  |
|               | 4167t                      | 1390I | 4167a      | 1390F |

***pfmrp2* (PFL1410c)**

A ORF correspondente a *pfmrp2*, possui apenas um exão de 6331bp em 3D7 e 6525 bp em Dd2 a sua composição em AT (76,4% em 3D7 e 76,4% em Dd2) é também próxima da composição genómica em bases do *P. falciparum* (82%) (Pollack *et al.*, 1982). A região a montante (*upstream*) do codão de iniciação (ATG), apresenta múltiplos codões STOP em todas as grelhas de leitura, o que indica que esta região muito provavelmente não é traduzida e que as ORFs representam um gene. Estas codificam proteínas ABC de 1109 a.a, no clone 3D7 e 2133 a.a. no clone Dd2, com uma massa molecular prevista<sup>53</sup> de 248,33 kDa e 251,37 kDa, respectivamente.

Foram identificadas por sequenciação, na sequência do gene *pfmrp2* do clone 3D7 e Dd2, oito alterações pontuais (apenas um nucleótido), resultados na Tabela III.5 e inserções/delecções resultados na Tabela III.5. Duas alterações pontuais são sinónimas, não se traduzindo em alteração do a.a. e as restantes seis alteram o a.a. codificado (ANEXO 9).

---

<sup>53</sup> Massa molecular calculada em <http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/>

**Tabela III.5 - Alterações pontuais identificadas na sequência do gene *pfmrp2* nos clones 3D7 e Dd2. a.a. aminoácido**

| <i>pfmrp2</i>  |            |        |            |        |
|----------------|------------|--------|------------|--------|
|                | 3D7        |        | Dd2        |        |
| alteração      | nucleótido | a.a    | nucleótido | a.a    |
| a → g<br>D → G | 1892a      | 631D   | 1910g      | 637G   |
| a → g<br>N → D | 1936a      | 646N   | 1954g      | 652D   |
| a → t<br>K → I | 2141a      | 714K   | 2231t      | 744I   |
| a → g<br>T → T | 2940a      | 980T*  | 3012g      | 1004T* |
| t → c<br>D → D | 3414t      | 1138D* | 3597c      | 1168D* |
| g → a<br>D → N | 3550g      | 1184D  | 3640a      | 1214N  |
| t → a<br>S → T | 4579t      | 1527S  | 4654a      | 1551T  |
| c → a<br>L → I | 4591c      | 1531L  | 4666a      | 1556I  |

As inserções/deleções não resultam em alteração da grelha de leitura e correspondem a variações do número de repetições de determinada sequência (ANEXO 10). A sequência, o número de a.a. e o número de vezes que cada sequência se repete no gene *pfmrp2* nos clones 3D7 e Dd2, encontram-se descritas na Tabela III.6.

**Tabela III.6 - Número de repetições de cada sequência inserida/delectada na sequência do gene *pfmrp2* nos clones 3D7 e Dd2. a.a. aminoácido em que se encontra a alteração na sequência. *N*<sub>2</sub> número de repetições da sequência.**

| <i>pfmrp2</i>             |                   |             |                       |                   |             |                       |
|---------------------------|-------------------|-------------|-----------------------|-------------------|-------------|-----------------------|
|                           | 3D7               |             |                       | Dd2               |             |                       |
| <i>Sequência repetida</i> | <i>nucleótido</i> | <i>a.a.</i> | <i>N</i> <sub>2</sub> | <i>nucleótido</i> | <i>a.a.</i> | <i>N</i> <sub>2</sub> |
| NDENDQ                    | 779               | 260         | 1                     | 779               | 260         | 2                     |
| NDYVDDYV                  | 1947              | 649         | 1                     | 1965              | 655         | 4                     |
| DNNN                      | 3591              | 1197        | 9                     | 3663              | 1221        | 8                     |

Por definição, um polimorfismo corresponde à ocorrência simultânea de variações alélicas nos genomas de uma dada população (Lewin, 1989). Considerando os genomas dos clones 3D7 e Dd2 como pertencentes à população de *P. falciparum*, utilizaremos o termo polimorfismo para designar as diferenças detectadas nas sequências dos genes em estudo entre os dois clones.



### III.2 - Estudo da associação dos polimorfismos dos genes *pfy-gcs*, *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2* e a resposta *in vitro* de isolados de pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* aos fármacos cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino.

Foram estudadas amostras de sangue de pacientes com malária por *P. falciparum*, recolhidas em República Democrática de São Tomé e Príncipe (STP), República de Angola e Tailândia.

#### III.2.1 - Caracterização fenotípica dos isolados de *Plasmodium falciparum* recolhidos na STP, Angola e Tailândia

Os resultados relativos à resposta *in vitro* a antimaláricos, constituem parte de um estudo alargado que incluiu a análise da resposta *in vitro* a antimaláricos, e a sua relação com outros marcadores moleculares de resistência (*pfert* e *pfmdr1*)<sup>54</sup>.

Os testes de susceptibilidade *in vitro* à cloroquina, mefloquina, quinino e amodiaquina realizados aos isolados colhidos nas regiões em estudo, Angola, São Tomé e Príncipe e Tailândia, permitiram identificar os isolados sensíveis e resistentes. A prevalência de resistência *in vitro* a cada fármaco em cada região, encontra-se descrita na Tabela III.7.

**Tabela III.7 - Prevalência de isolados resistentes *in vitro* aos diferentes antimaláricos em Angola, Tailândia e STP.** CQ – cloroquina, MEF– mefloquina, QN – quinino, AMQ – amodiaquina.

|                  | CQ                    | MEF                   | QN                    | AMQ                   |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Angola</b>    | <b>96%</b><br>(65/68) | <b>34%</b><br>(14/41) | <b>33%</b><br>(14/43) | -                     |
| <b>Tailândia</b> | <b>96%</b><br>(50/52) | <b>62%</b><br>(32/52) | <b>0%</b>             | <b>58%</b><br>(18/31) |
| <b>STP*</b>      | <b>92%</b><br>(60/65) | -                     | -                     | -                     |

\*Em STP, apenas foi testado um fármaco, por dificuldades técnicas, referentes à preparação dos fármacos.

#### Angola

---

<sup>54</sup> (Lopes *et al.*, 2002b; Lopes *et al.*, 2002a) e a dissertação para obtenção do grau de Doutor da Doutora Dinora Maria da Silva Lopes com o título “Resistência a Antimaláricos em *Plasmodium falciparum*: envolvimento dos genes *pfert* e *pfmdr1*”, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

No que respeita aos 109 isolados colhidos na República de Angola, a avaliação da resposta foi bem sucedida em 68 isolados para a cloroquina, 41 isolados para mefloquina e 43 para o quinino.

A análise dos resultados da fenotipagem dos isolados, provenientes da República de Angola, demonstrou que 14 dos isolados eram resistentes à cloroquina e mefloquina (CQ+MEF), 14 eram resistentes à cloroquina e ao quinino (CQ+QN), 10 eram resistentes à mefloquina e ao quinino (MEF+QN) e 10 eram resistentes aos fármacos (CQ+MEF+QN). Assim, em pelo menos 10 isolados verificamos resistência simultânea a mais de um fármaco, isto é, multiresistência.

### **Tailândia**

A avaliação da resposta *in vitro* efectuada a 52 isolados de *P. falciparum*, resultou na identificação de isolados susceptíveis (S): 2 para cloroquina, 20 para mefloquina e 0 para quinino; isolados resistentes (R): 50 para cloroquina, 32 para mefloquina e 52 para quinino. Para amodiaquina foram testados 31 isolados, dos quais 13 foram classificados como sensíveis e 18 como resistentes.

No que respeita a multiresistência na Tailândia, a análise dos resultados da fenotipagem, demonstrou que 31 dos isolados eram resistentes à cloroquina e mefloquina (CQ+MEF) e 7 eram resistentes à cloroquina e à amodiaquina (CQ+MEF), destes, 3 apresentaram também resistência à mefloquina (MEF) sendo portanto resistentes a 3 (CQ+MEF+AMQ) dos quatro antimaláricos estudados (CQ, MEF, AMQ e QN). Assim, em pelo menos 35 isolados detectamos resistência a dois fármacos e em 3 isolados resistência simultânea a três dos quatro estudados.

### **São Tomé e Príncipe**

Os isolados, incluídos neste estudo, são provenientes de seis localidades das duas ilhas deste arquipélago: São Tomé e Príncipe. Foram colhidas 85 amostras de sangue periférico de doentes sintomáticos, destes foram fenotipados *in vitro* com sucesso, 65. Permitindo identificar 5 isolados sensíveis e 60 resistentes, correspondendo a 92% de

prevalência de resistência à cloroquina. Em STP apenas foi avaliada resposta *in vitro* de *P. falciparum* para a cloroquina. Foram testados 65 isolados, sendo 5 isolados susceptíveis (S) e 60 resistentes (R).

### III.2.2 - Caracterização genotípica dos isolados em relação aos genes *pfmrp1*, *pfmrp2*, *pfy-gcs* e *pfmdr1* e a sua relação com o fenótipo de isolados de *P. falciparum* provenientes de regiões geográficas diferentes

No gene *pfmrp2* identificamos por sequenciação, 3 inserções/deleções entre as sequências do gene do clone 3D7 e Dd2 (Tabela III.6). As inserções/deleções correspondem a variações no número de repetições de determinada sequência (ANEXO 10).

(Sidhu *et al.*, 2006; Pickard *et al.*, 2003) Na Tabela III.8 encontra-se sumariada a caracterização efectuada para o estudo da associação dos polimorfismos dos genes *pfy-gcs*, *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2* e a resposta *in vitro* de isolados de pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* aos fármacos cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino. Em relação à prevalência das inserções/deleções, a prevalência das alterações pontuais e o número de cópias dos genes *pfy-gcs*, *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2*, os dados encontram-se sumariados nos ANEXOS 12, 13 e 14 respectivamente.

Devido a alguns problemas experimentais, na caracterização molecular dos genes, nem sempre se obtiveram resultados interpretáveis para todas as amostras fenotipadas. Assim, os valores de *n* da Tabela III.9 nem sempre são coincidentes com os valores da Tabela III.8, onde *n* se refere ao número de isolados fenotipados com sucesso. No estudo das frequências alélicas, a presença dos dois alelos no mesmo isolado, designado por infecção mista, corresponde à existência de pelo menos duas populações parasitárias distintas nessa amostra<sup>55</sup>, assim tendo como objectivo o estudo das frequências alélicas, neste estudo as infecções mistas foram excluídas, para evitar um aumento artificial da dimensão da amostra.

---

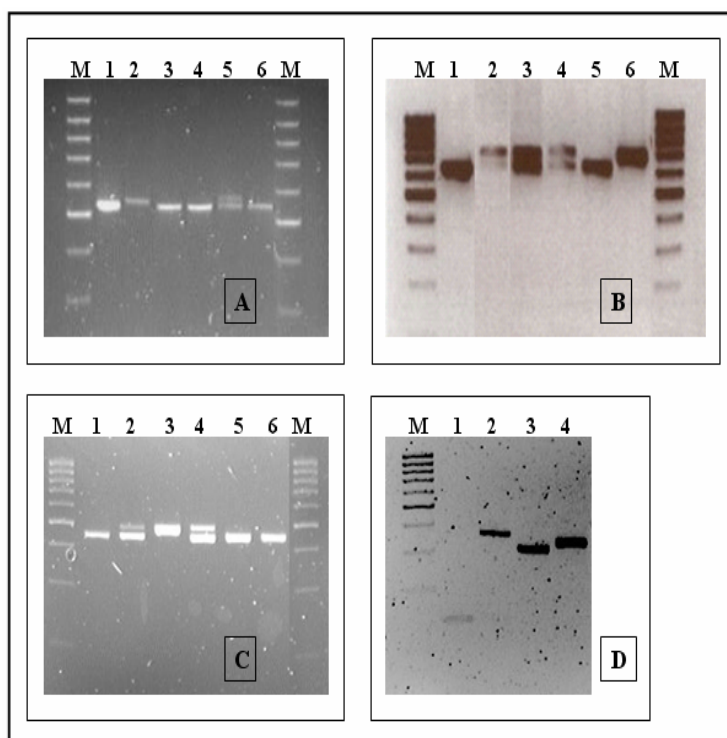
<sup>55</sup> Populações parasitárias de *P. falciparum* distintas.

**Tabela III.8 - Fármacos, genes e respectivas alterações de sequência incluídos neste estudo.** CQ–cloroquina; MEF–mefloquina; QN–quinino; AMQ–amodiaquina; n–número de isolados.

|           | Fármaco                                    | Alteração estudada            |                                |   |
|-----------|--|-------------------------------|--------------------------------|---|
|           |  | Alterações pontuais           | Inserções/deleções             | Número de cópias                              |
| Tailândia | CQ n=47<br>MEF n=47<br>QN n=47<br>AMQ n=10 | <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> | <i>pfmrp2</i> e <i>pfγ-gcs</i> | <i>pfmdr1</i> , <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> |
| Angola    | CQ n=44<br>MEF n=39<br>QN n=40             | <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> | <i>pfmrp2</i> e <i>pfγ-gcs</i> | <i>pfmdr1</i> , <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> |
| STP       | CQ n=35                                    | <i>pfmrp1</i> e <i>pfmrp2</i> | <i>pfmrp2</i> e <i>pfγ-gcs</i> | -   |

**a) Amplificação por PCR dos fragmentos para estudo da prevalência das inserções/deleções dos genes *pfmrp2* e *pfγ-gcs***

Para a determinação da prevalência das inserções/deleções dos genes *pfmrp2* (ANEXO 10) e *pfγ-gcs* (ANEXO11), foi efectuada amplificação dos fragmentos que incluem as mesmas e verificação dos respectivos tamanhos em gel de agarose (3%) por comparação com marcadores de peso molecular, resultados exemplificados na Figura III.4.



**Figura III.4 - Detecção por PCR das inserções/deleções nos genes *pfmrp2* e *pfγ-gcs* em clones e isolados fenotipados de *P. falciparum*.** Gel de agarose a 3%. A- polimorfismo 779 de *pfmrp2* (1-3D7, 2-Dd2, 3, 4 e 6 - isolados tipo 3D7 e 5- infecção mista tipo 3D7 e Dd2); B - polimorfismo 1947 de *pfmrp2* (1-3D7; 2, 3 e 4-infecção mista tipo 3D7 e Dd2; 5- isolado tipo 3D7; 6-isolado tipo Dd2); C - polimorfismo 3591 de *pfmrp2* (1-3D7, 2 e 4-infecção mista tipo 3D7 e Dd2; 3-3D7; 5 e 6-isolados tipo Dd2); D - polimorfismo 1542 de *pfγ-gcs* (1-3D7, 2-Dd2, 3-K1, 4-HB3); M - marcador de peso molecular (100bps).

Em STP foram identificadas infecções mistas nas posições estudadas (779, 1947 e 3591) do gene. Em Angola e na Tailândia apenas foram identificadas infecções mistas, na posição 1947.

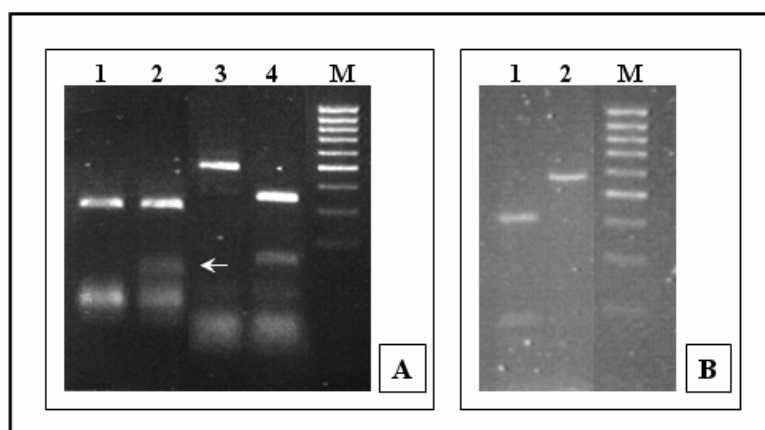
Em relação ao gene *pfy-gcs* foram identificadas infecções mistas nas regiões estudadas. Em STP foram detectados 2 isolados com uma amplificação de peso molecular superior ao apresentado pelo clone Dd2 (Figura III.4 D), os quais não foram incluídos no presente estudo.

### **b) PCR-RFLP para o estudo da frequência dos polimorfismos nos genes *pfmrp1* e *pfmrp2***

Cada um dos isolados foi caracterizado individualmente, relativamente aos polimorfismos dos genes *pfmrp1* (*H191Y*, *S347A* e *I1390F*) e *pfmrp2* (*D631G*), para determinação da prevalência das frequências alélicas. O estudo foi realizado através de PCR-RFLP, e verificação dos respectivos tamanhos dos fragmentos em gel de agarose (2%) por comparação com marcadores de peso molecular, resultados exemplificados nas Figura III.5 para *pfmrp1* e Figura III.6 para *pfmrp2*.

#### ***pfmrp1***

Os resultados apresentados na Figura III.5 são relativos à caracterização molecular do gene *pfmrp1* (*H191Y*, *S347A* e *I1390F*) nos clones 3D7 e Dd2, cujo genótipo foi confirmado por sequenciação. Estas amostras foram sempre utilizadas em paralelo, servindo como o controlo que permitiu classificar os isolados de genótipo desconhecido colectados durante o trabalho, utilizando a mesma metodologia.



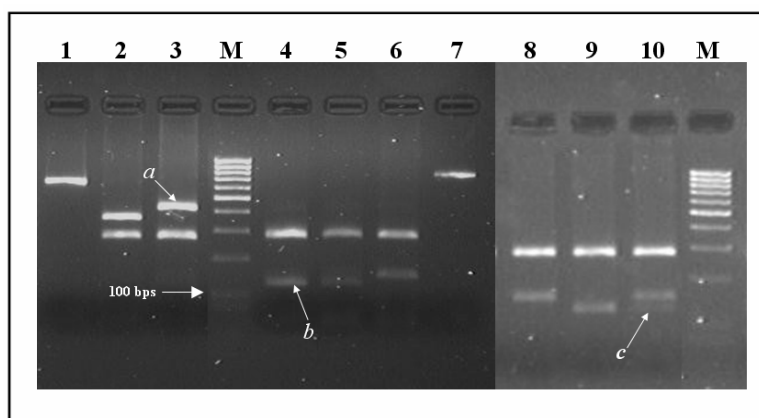
**Figura III.5 - Fotografias de géis exemplificativos da electroforese dos fragmentos obtidos por PCR-RFLP para a identificação dos polimorfismos de *pfmrp1*.** Gel de agarose a 2%. **A** identificação dos polimorfismos *H191Y* (1-3D7, 2-Dd2 a seta indica o fragmento discriminatório) e *S347A* (3-3D7, 4-Dd2) por digestão com *HpyCH4V*. **B** identificação do polimorfismo *I1390F* por digestão com *DraI* (1-3D7, 2-Dd2). **M**-marcador de peso molecular (100bps).

Na Tailândia, em relação aos polimorfismos do gene *pfmrp1* (*H191Y*, *S347A* e *I1390F*) a prevalência dos alelos do tipo Dd2 (*191Y*, *347A* e *1390F*) foi sempre superior a 87%. Em Angola todos os isolados (100%) continham o alelo do tipo 3D7 para os codões 191 e 347, e 95,5% dos isolados continha o alelo do tipo Dd2 para o codão 1390. Em STP todos os isolados (100%) continham o alelo do tipo 3D7 para o codão 347 (S), e a prevalência dos alelos do tipo Dd2 foi de 80% para *191Y* e 94% para *1390F*.

### *pfmrp2*

Os resultados apresentados na Figura III.6 são relativos à caracterização molecular do gene *pfmrp2* codão 631 (D631G), cujo genótipo foi igualmente confirmado por sequenciação. As amostras relativas a 3D7 e Dd2 foram sempre utilizadas em paralelo, servindo como o controlo para classificar os isolados de genótipo desconhecido. O fragmento amplificado (635 bps) para pesquisar o polimorfismo D631G do gene *pfmrp2*, possui um local monomórfico<sup>56</sup> para a endonuclease *BclI*. A restrição pela *BclI* do fragmento correspondente a 3D7 origina dois fragmentos, um com 276 bps e outro com 359. A restrição correspondente a Dd2 origina fragmentos com 276, 279 e 152 bps.

<sup>56</sup> correspondente à base 1963 da sequência de *pfmrp2* de 3D7 e à base 2053 de Dd2.



**Figura III.6 - Identificação do polimorfismo de *pfmrp2* por digestão com *BclI*, nos clones 3D7 e Dd2 e em isolados.** Gel de agarose a 2%. 1- 3D7 produto de PCR não digerido; 2- 3D7 produto de PCR digerido 631D; 6- Dd2 produto de PCR digerido 631G; 7- Dd2 produto de PCR não digerido; 3- isolado contendo codão 631D; 4, 5, 9- isolados contendo codão 631G; 8- isolados contendo codão 631G; 10 isolado representando infecção mista contendo codão 631G M- marcador de peso molecular (100 bps).

Os fragmentos de 276bp e 279bp não são discrimináveis em gel de agarose. O padrão de restrição que identifica a alteração no codão 631 de *pfmrp2*, de uma asparagina (D) para uma glicina (G) encontra-se exemplificado para os clones 3D7 e Dd2 nos poços 2 e 6 da Figura III.6 respectivamente.

O fragmento amplificado para pesquisar o polimorfismo D631G de *pfmrp2* inclui o local onde se repete a sequência NDYVDDYV, assim o perfil de restrição varia também com o número de repetições presentes (ANEXO 10).

O perfil de restrição apresentado no poço 3 da Figura III.6 corresponde a um isolado proveniente da Tailândia, e corresponde à presença de D no codão 631 (idêntico a 3D7), no entanto possui 5 repetições da sequência NDYVDDYV e não uma como ocorre em 3D7 (ANEXO 10), originando uma banda (assinalada na Figura III.6. com **a**) com peso molecular (455 bps), superior à presente no perfil de 3D7. O perfil de restrição apresentado nos poços 4, 5 e 8 da Figura III.6 correspondem a isolados provenientes também da Tailândia, e correspondem à presença de G no codão 631 (idêntico à Dd2), no entanto possuem 3 repetições da sequência NDYVDDYV e não 4 como ocorre em Dd2 (ANEXO 10), O que origina uma banda (assinalada na Figura III.6. com **b**) com peso molecular de 128 bps, inferior à presente no perfil de Dd2. Em relação ao gene *pfmrp2* em STP, foram identificadas 3 infecções mistas no que respeita à inserção/delecção na posição 1947.

**III.2.3 - Associação das alterações pontuais e inserções/deleções dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfy-gcs* com o fenótipo de amostras de *P. falciparum* provenientes das regiões geográficas diferentes**

Os resultados do estudo da associação das alterações pontuais e inserções/deleções dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfy-gcs* com o fenótipo de isolados de *P. falciparum* provenientes das regiões geográficas diferentes estão sumariados na Tabela III.9.

**Tabela III.9 - Associação das frequências das mutações pontuais dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* e das inserções/deleções dos genes *pfmrp2* e *pfy-gcs* com a resposta *in vitro* a diferentes fármacos em isolados de *P. falciparum* provenientes da Tailândia, Angola e STP. CQ - cloroquina, MEF - mefloquina, AMQ - amodiaquina QN – quinino. *n* – número de isolados estudados.**

|           |                        | Alterações Pontuais |              |               |               | Inserções/Deleções |       |                |      |
|-----------|------------------------|---------------------|--------------|---------------|---------------|--------------------|-------|----------------|------|
|           |                        | <i>pfmrp1</i>       |              |               | <i>pfmrp2</i> |                    |       | <i>pfy-gcs</i> |      |
| Fármaco   |                        | <i>H191Y</i>        | <i>S347A</i> | <i>I1390F</i> | <i>D631G</i>  | 779*               | 1947* | 3591*          | 1542 |
| Tailândia | CQ<br>( <i>n</i> =47)  | 1                   | 1            | 1             | 1             | 1                  | 1     | 1              | 1    |
|           | MEF<br>( <i>n</i> =47) | 0,013               | 0,047        | 1             | 0,340         | 0,001              | 0,517 | <0,001         | 1    |
|           | QN<br>( <i>n</i> =47)  | 1                   | 1            | 1             | 1             | 1                  | 1     | 1              | 1    |
|           | AMQ<br>( <i>n</i> =10) | 1                   | 0,799        | 1             | 1             | 1                  | 1     | 1              | 1    |
| Angola    | CQ<br>( <i>n</i> =44)  | 1                   | 1            | 0,533         | 0,570         | 1                  | 0,248 | 0,599          | 1    |
|           | MEF<br>( <i>n</i> =39) | 1                   | 1            | 1             | 1             | 1                  | 0,511 | 0,525          | 1    |
|           | QN<br>( <i>n</i> =40)  | 1                   | 1            | 0,527         | 1             | 0,299              | 0,156 | 0,315          | 1    |
| STP       | CQ<br>( <i>n</i> =35)  | 0,256               | 1            | 0,127         | 1             | 1                  | 0,355 | 1              | 1    |

\* referente à sequência do gene *pfmrp2* no clone 3D7

Nos resultados obtidos na análise global das 3 áreas endémicas estudadas, foi encontrada associação entre a resposta dos isolados provenientes da Tailândia à mefloquina e as mutações pontuais nos codões 191 (*H191Y*) e 347 (*S347A*) de *pfmrp1*

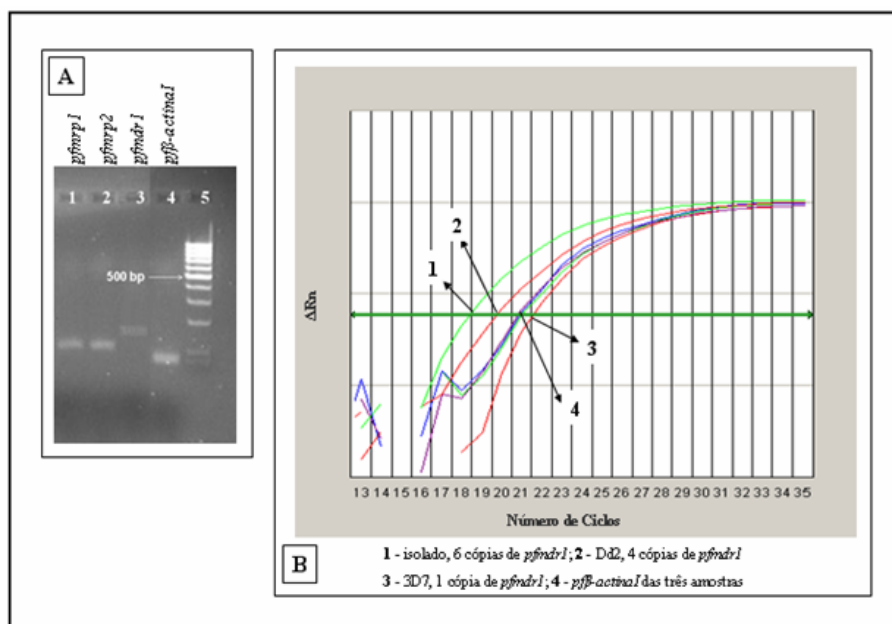


com valores de  $p=0,013$  e  $P=0,047$  respectivamente. Nos mesmos isolados e no que respeita ao gene *pfmrp2* foi também encontrada associação entre a resistência *in vitro* à mefloquina e a presença de apenas 1 repetição da sequência NDQNEQ a nível do codão 779 ( $p=0,001$ ) e de 8 repetições da sequência DNNN a nível do codão 3591 ( $p<0,001$ ).

### III.2.4 - Estudo da associação do número de cópias dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1* com a susceptibilidade *in vitro* de isolados de *P. falciparum* a antimaláricos

#### a) Identificação do número de cópias dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1*

A avaliação da especificidade das reacções de PCR foi efectuada através da amplificação dos fragmentos dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2*, *pfmdr1* e *pfβ-actinaI*, utilizando os primers específicos para cada um deles. Esta amplificação originou fragmentos únicos com o tamanho esperado, quando visualizados em gel de agarose (Figura III.7 A). A Figura III.7 B exemplifica as curvas obtidas por RT-PCR para o gene *pfmdr1* nos os clones 3D7, Dd2 e para um dos isolados provenientes da Tailândia. Foram realizados ensaios independentes, para a determinação do número de cópias de cada gene em cada isolado.



**Figura III.7 - Número de cópias dos genes *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2*, determinado por RT-PCR usando SYBR Green.** A fotografia do gel de agarose 3% correspondente à electroforese dos produtos dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2*, *pfmdr1* e *pfβ-actinaI* amplificados por RT-PCR. B curvas de RT-PCR exemplificativas dos resultados obtidos para a determinação do número de cópias de *pfmdr1* nos clones 3D7, Dd2 e em um dos isolados provenientes da Tailândia.

**Avaliação da aplicabilidade do método dos CTs comparativos ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) para a quantificação relativa dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1*.**

Os valores das eficiências das reacções *E*, calculados para a amplificação de fragmentos dos genes em estudo, encontram-se acima de 90%. O módulo dos valores do declive das rectas de correlação obtidos foram de  $0,013 \pm 0,007$ ,  $0,040 \pm 0,001$  e  $0,020 \pm 0,005$  para *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1* respectivamente (Tabela III.10), encontram-se dentro do intervalo de 0,0 a 0,1, sendo assim válido utilizar o gene *pfβ-actinaI* como controlo interno, para normalizar os resultados da quantificação relativa dos referidos genes pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

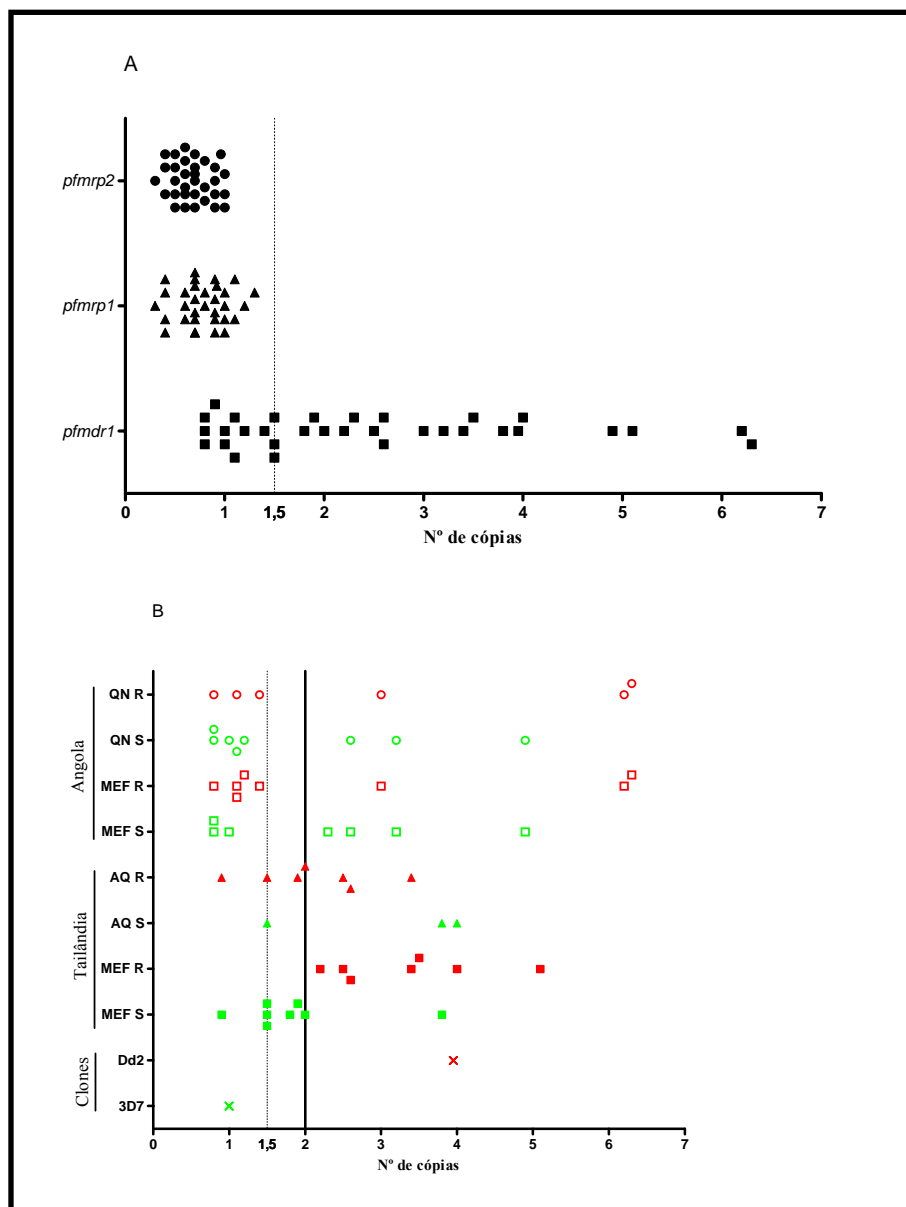
**Tabela III.10 - Parâmetros da amplificação por PCR em tempo real referentes à validação da utilização do método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para a quantificação relativa dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1* tendo como controlo interno o gene *pfβ-actinaI*.  $E = (10^{(-1/m)}) - 1$ ; \* modulo do valor do declive (*m*) da recta de regressão, associada à representação gráfica dos valores  $\Delta C_T$  (gene alvo/gene controlo interno) vs diluições da amostra.**

| Gene               | Eficiência da reacção de PCR   |          | Eficiência relativa      |
|--------------------|--------------------------------|----------|--------------------------|
|                    | Declive<br>(-3,60 < m < -3,10) | <i>E</i> | Declive<br>(0 < m < 0,1) |
| <i>pfmrp1</i>      | -3,501 ± 0,152                 | 93%      | 0,013 ± 0,007            |
| <i>pfmrp2</i>      | -3,440 ± 0,038                 | 95%      | 0,040 ± 0,001            |
| <i>pfmdr1</i>      | -3,435 ± 0,110                 | 96%      | 0,020 ± 0,005            |
| <i>pfβ-actinaI</i> | -3,370 ± 0,010                 | 98%      | -                        |

**b) Associação do número de cópias dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1* com a susceptibilidade de isolados de *P. falciparum* à mefloquina, amodiaquina, quinino e cloroquina**

Nos clones 3D7 e Dd2 bem como nos 30 isolados incluídos no estudo da associação do número de cópias dos genes com o fenótipo *in vitro*, todos possuíam apenas uma cópia dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2*. Para o gene *pfmdr1* foram detectados diferentes números de cópias do gene. Os resultados encontram-se nos gráficos da Figura III.9 e ANEXO 14. A linha descontinua dos gráficos da Figura III.8 permite separar visualmente, os isolados em que foi detectada mais de uma cópia (Nº de cópias  $\geq 1,5$  indica mais de uma cópia) do gene. Na generalidade e no que respeita ao gene *pfmdr1*, 9 (30%) isolados

tinham uma cópia, 17 (57%) tinham entre 2 a 4 cópias e 4 (13%) isolados tinham entre 5 a 6 cópias.



**Figura III.8 - Número de cópias dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1* nos isolados provenientes da Tailândia e de Angola. vermelho resistentes; verde sensível; AQ – amodiaquina; MEF – mefloquina; QN – quinino; S – sensível; R – resistente.**

### Angola

Nos isolados provenientes de Angola 8 (53%) tinham apenas uma cópia de *Pfmdr1*. Quatro (26%) tinham entre 2 a 4 cópias e 3 (20%) tinham entre 5 a 6 cópias. Da análise estatística realizada recorrendo ao teste de Fisher ([www.physics.csbsju.edu/stats/fisher.form](http://www.physics.csbsju.edu/stats/fisher.form)),

## Associação dos polimorfismos e resposta *in vitro* a antimaláricos

---

não se detectou associação entre o número de cópias do gene *pfmdr1* e a resposta aos fármacos mefloquina, quinino nem cloroquina, nestas amostra.

### **Tailândia**

Nos isolados provenientes da Tailândia apenas um tinha uma cópia de *pfmdr1*, 13 (87%) tinham entre 2 a 4 cópias e um entre 5 e 6 cópias do gene. Foi detectada associação significativa ( $p=0,007$ ) entre a presença de 2 ou mais cópias do gene *pfmdr1* e a resistência *in vitro* à mefloquina. O mesmo não se verificou para os restantes fármacos testados.

### III.3 - Expressão dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2* e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *Plasmodium falciparum* na presença e ausência de fármaco nos clones 3D7 e Dd2

Esta parte do trabalho teve como objectivo estudar o perfil de expressão dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* que codificam para proteínas do tipo MRP (cuja caracterização constituiu um dos objectivos deste trabalho) e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo em *P. falciparum*, listadas seguidamente: *pfγ-gcs* (gama-glutamilcisteína sintetase), *pfgr* (glutação reductase), *pfg6pd* (glucose-6-fosfato desidrogenase), *pfgpx* (glutação peroxidase), *pfgst* (glutação S-transferase), *pftrxR* (tioredoxina reductase), *pf2-CysPx* (tioredoxina peroxidase 1) e *pfFe-sod* (Fe-superoxidismutase).

Esta fase do trabalho teve como objectivos estudar o perfil de expressão dos 10 genes referidos, ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum*. Identificar eventuais diferenças ao nível da expressão dos mesmos genes, comparando parasitas sensíveis (3D7) e parasitas com susceptibilidade diminuída Dd2<sup>57</sup> na presença e ausência de cloroquina (em concentração correspondente ao IC50). Foi também avaliada a alteração da expressão de *pfmrp1* e *pfmrp2* na fase de trofozoíto maduro na presença e ausência de mefloquina (em concentração correspondente ao IC50).

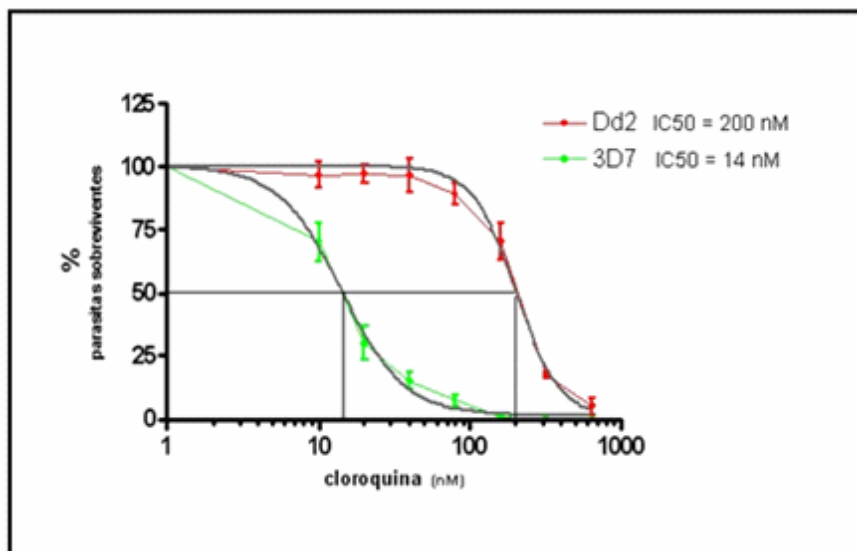
#### III.3.1 - Determinação do valor de IC50 relativo aos clones 3D7 e Dd2 em resposta à cloroquina e mefloquina

Tal como descrito no capítulo relativo aos materiais e métodos, para a realização dos estudos de expressão dos diferentes genes, foram utilizados os clones 3D7 e Dd2, seleccionados de acordo com o seu perfil de susceptibilidade aos fármacos cloroquina e mefloquina (ver Tabela II.2). Para os dois clones foram determinados os valores dos IC50, isto é, a dose de fármaco que inibe o desenvolvimento de 50% do total de parasitas.

---

<sup>57</sup> Durante a apresentação e análise dos nossos resultados, para simplificar a linguagem referiremos o clone Dd2 como “resistente”.

Os valores, representados nos gráficos da Figura III.9, são resultantes da média de pelo menos dois ensaios de micro-testes (segundo a metodologia MARK III, OMS) para cada fármaco e clone. Para cada ensaio foram efectuadas leituras independentes.



**Figura III.9 - Curvas de dose-resposta resultantes dos testes de susceptibilidade para a determinação dos IC50 dos clones 3D7 e Dd2 para a cloroquina.** Estão representados os valores, em percentagem, de parasitas sobreviventes, relativos a cada clone e fármaco. A linha a preto corresponde à curva de regressão não linear a partir da qual foram estimados os valores de IC50 respectivos.

Os valores de IC50 determinados para cada clone foram: cloroquina Dd2 - 200 nM com intervalo de variação de 168,5 a 240,7 nM, para  $\alpha=0,05$  e  $r^2 = 0,99$ ; cloroquina - 3D7 14 nM com intervalo de variação para  $\alpha=0,05$  de 12,4 a 16,3 nM e  $r^2 = 0,99$ .

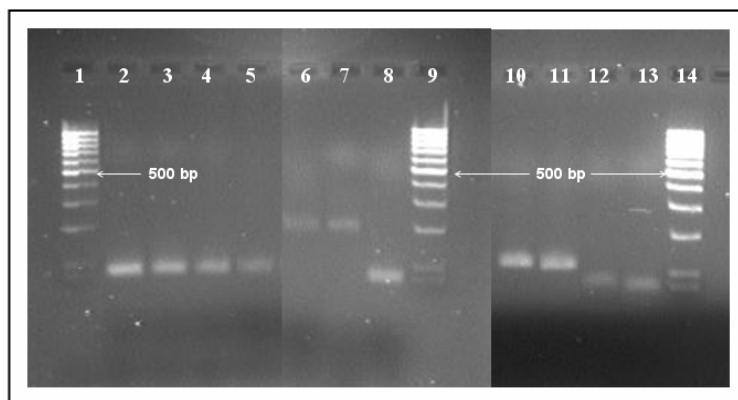
Para o presente trabalho, consideraremos Dd2 como um clone resistente à cloroquina, dado que apresenta um IC50 muito superior a 3D7.

### III.3.2 - Optimização das condições de PCR em tempo real para os estudos de expressão génica em *P. falciparum*

#### a) Avaliação da especificidade das reacções

A avaliação da especificidade das reacções de PCR foi efectuada através da amplificação dos genes *pfFe-sod*, *pfy-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-CysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1*, *pfmrp2* e do gene da sub-unidade ribossomal 18S (controlo interno) de *P.*

*falciparum* utilizando os primers específicos para cada um deles. Esta amplificação originou fragmentos únicos com o tamanho esperado, quando visualizados em gel de agarose (Figura III.10).



**Figura III.10 - Fotografia do gel correspondente à electroforese dos produtos dos 10 genes amplificados por PCR em tempo real.** Gel agarose (3%). Poços 1,9, e 14 marcador de peso molecular; 2 *pfgpx*, 3 *pfg6pd*, 4 *pf2-CysPx*, 5 *pfgr*, 6 *pfmrp2*, 7 *pfmrp1*, 8 *pfFe-sod*, 10 *pfγ-gcs*, 11 *pfgst*, 12 *pftrxR* e 13 *pf18S*. bp-pares de bases.

### b) Avaliação da aplicabilidade do método dos CTs comparativos ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) para a quantificação relativa da expressão dos diferentes genes

Para a quantificação relativa da expressão dos diferentes genes, foi escolhido o método de calculo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (ver II.3.8.1 Material e Métodos), a avaliação da aplicabilidade do método foi realizada de forma idêntica ao descrito anteriormente na página 102 dos resultados.

Os resultados obtidos relativamente ao estudo da eficiência das reacções de amplificação dos genes *pfFe-sod*, *pfγ-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-CysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* e à utilização do gene *pfRNA18S*, como controlo interno, encontram-se na Tabela III.11. Os valores das eficiências das reacções *E*, calculados para a amplificação de fragmentos dos genes em estudo, encontram-se acima de 90% (Tabela III.11), assim a utilização destas condições de PCR para a realização dos estudos de expressão é válida.

Tabela III.11 - Parâmetros da amplificação por PCR em tempo real referentes à validação da utilização do método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para o estudo da expressão dos genes *pfFe-sod*, *pf $\gamma$ -gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-CysPx*, *pf $\gamma$ 6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2*, tendo como controlo interno o gene *pfRNA18S*.

| Gene                               | Eficiência da reacção de PCR             |                                     |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|
|                                    | Declive<br>(-3,60 $\geq$ m $\leq$ -3,10) | E<br>(E= (10 <sup>(-1/m)</sup> )-1) |
| <i>pfFe-sod</i> *                  | -3,187 $\pm$ 0,0983                      | 103 (%)                             |
| <i>pf<math>\gamma</math>-gcs</i> * | -3,128 $\pm$ 0,1093                      | 104 (%)                             |
| <i>pfgr</i> *                      | -3,440 $\pm$ 0,1657                      | 98 (%)                              |
| <i>pfgst</i> *                     | -3,310 $\pm$ 0,1208                      | 100 (%)                             |
| <i>pfgpx</i> *                     | -3,375 $\pm$ 0,2307                      | 99(%)                               |
| <i>pftrxR</i> *                    | -3,686 $\pm$ 0,1610                      | 93 (%)                              |
| <i>pf2-CysPx</i> *                 | -3,161 $\pm$ 0,1104                      | 103 (%)                             |
| <i>pf<math>\gamma</math>6pd</i> *  | -3,123 $\pm$ 0,1857                      | 104 (%)                             |
| <i>pfmrp1</i>                      | -3,408 $\pm$ 0,030                       | 97%                                 |
| <i>pfmrp2</i>                      | -3,418 $\pm$ 0,121                       | 96%                                 |
| <i>pfRNA18S</i> *                  | -3,361 $\pm$ 0,025                       | 98%                                 |

\* Os valores de eficiência referentes à amplificação destes genes foram retirados de Bustamante L., 2005, tese de Doutoramento realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular IV da Universidade Complutense de Madrid.

### III.3.3 - Avaliação do desenvolvimento e sincronização das micro-culturas de parasitas dos clones 3D7 e Dd2, ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum*

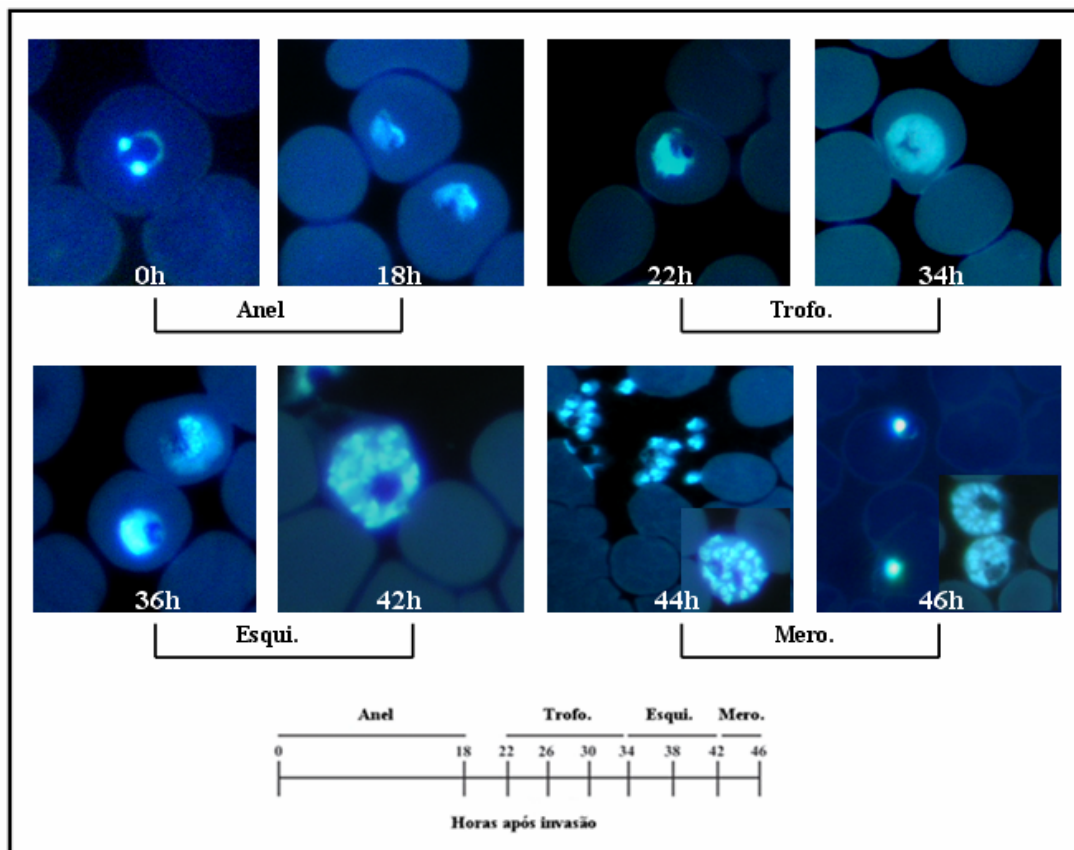
Tendo-se efectuado a optimização das reacções e validado o método de tratamento dos resultados, efectuou-se o estudo do perfil de expressão dos 10 genes ao longo do ciclo intra-eritrocitário, a partir de culturas *in vitro* de *P. falciparum* (clones 3D7 e Dd2) sincronizadas (ANEXO 15).

Procedemos também à avaliação do perfil de expressão dos mesmos genes, nos referidos clones, na presença de cloroquina (ANEXO 15), de forma a avaliar uma possível alteração nos níveis de expressão, induzida pela presença do antimalárico. A



sincronização manteve-se relativamente constante durante os períodos em que estes ensaios decorreram (mais de 85% de parasitas em sincronia, ou seja, em idêntico estadio de desenvolvimento). No decorrer do presente trabalho consideraremos que durante o ciclo intra-eritrocitário do parasita, os merozoítos sofrem diferenciação originando estadios de desenvolvimento: anel (0-22 h após invasão), trofozoíto (22-34 h após invasão) e esquizonte (34-46 h após invasão).

A partir das culturas *in vitro* dos clones 3D7 e Dd2 sincronizadas, foram efectuadas recolhas de material para extracção de RNA, de duas em duas horas, das 0h às 52h. Os parasitas foram cultivados em paralelo na presença e ausência de cloroquina. A observação por microscopia óptica, dos esfregaços sanguíneos realizados no momento de cada colheita, permitiu avaliar o grau de sincronização dos estadios do parasita. A Figura III.11 ilustra o grau de desenvolvimento dos parasitas em cultura, em cada um dos 27 momentos de colheita (0h às 52h).



**Figura III.11 - Monitorização da sincronia das culturas *in vitro* de *P. falciparum*.** As fotografias representam um dos momentos de colheita no início e final de cada estadio. **Trofo.** trofozoíto; **Esqui.** Esquizonte; **Mero.** merozoíto; Coloração com DAPI e observação por microscopia óptica de fluorescência (Olympus BX41) com luz ultravioleta (filtro U-RFL-T2-200) e com objectiva de imersão (ampliação 100x).

As culturas de 3D7 e Dd2 correspondentes aos ensaios com e sem cloroquina foram monitorizados de forma idêntica.

### III.3.4 - Quantificação relativa da expressão dos genes ao longo do ciclo de vida de *P. falciparum*

Foram realizados ensaios independentes com cada um dos clones de *P. falciparum*, Dd2 e 3D7. Para o estudo do perfil de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pfγ-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-cysPx*, *pfsg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intra-eritrocitário de ambos os clones de *P. falciparum* na ausência e presença de cloroquina.

#### III.3.4.1 – Expressão dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2* e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum* nos clones 3D7 e Dd2.

Os valores da quantidade relativa de mRNA obtidos por PCR em tempo real para cada gene em cada clone (ANEXO 16), foram transformados em valores logarítmicos de base 2, segundo a equação  $Nfold=2^{(Ct, alvo - Ct, contolo interno)Tx1 - (Ct, alvo - Ct, contolo interno)T\text{mínimo}}$  (Tx1 - cada um dos momentos de colheita de amostra, T mínimo - tempo em que se registou menor expressão para cada gene).

Os gráficos da Figura III.12 e Figura III.13, representam a amplitude de variação da expressão génica ao longo do ciclo intra-eritrocitário. As 4h assinaladas nos mesmos gráficos correspondem às 0h de colheita (ver foto da Figura III.11). Os resultados correspondem ao ensaio na ausência de cloroquina.

De uma maneira geral, a amplitude de variação (*Nfold*) da expressão dos genes ao longo do ciclo intra-eritrocitário de 3D7 é maior do que a observada em Dd2. Para o clone 3D7, os valores de *Nfold* obtidos variaram entre  $\approx 30$  (*pfmrp1*) e  $\approx 4$  (*pftrxR*), enquanto que para o clone Dd2 os valores de *Nfold* variaram entre  $\approx 8$  (*pftrxR*) e  $\approx 1$  (*pfgr*, *pfgst*, *pfgpx* e *pfmrp1*).

A variação da amplitude de expressão basal em ambos os clones permite-nos dividir os genes em 4 categorias distintas: os que se expressam mais na fase de anel e merozoíto

## Expressão dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e genes de resposta ao stress oxidativo

---

(AM), trofozoíto e esquizonte (TE), aqueles que se expressam mais no estadio de esquizonte e merozoíto (EM) e aqueles que apresentam um padrão errático (ausência de uma tendência clara ao longo do ciclo). Seguindo estas categorias agrupamos os genes da seguinte forma: em **3D7 AM** - *pfγ-gcs*, *pfg6pd* e *pfmrp2*; **TE** - *pfgr*, *pf2-cysPx* e *pfmrp1*; **EM** - *pfFe-sod*, *pfgpx* e *pftrxR*; **errático** - *pfgst* e em **Dd2 AM** - *pfγ-gcs*, *pfg6pd* e *pfmrp2*; **TE** - *pfgr*, *pf2-cysPx* e *pfmrp1*; **EM** - *pfgpx* e *pftrxR*; **errático** - *pfFe-sod* e *pfgst*.

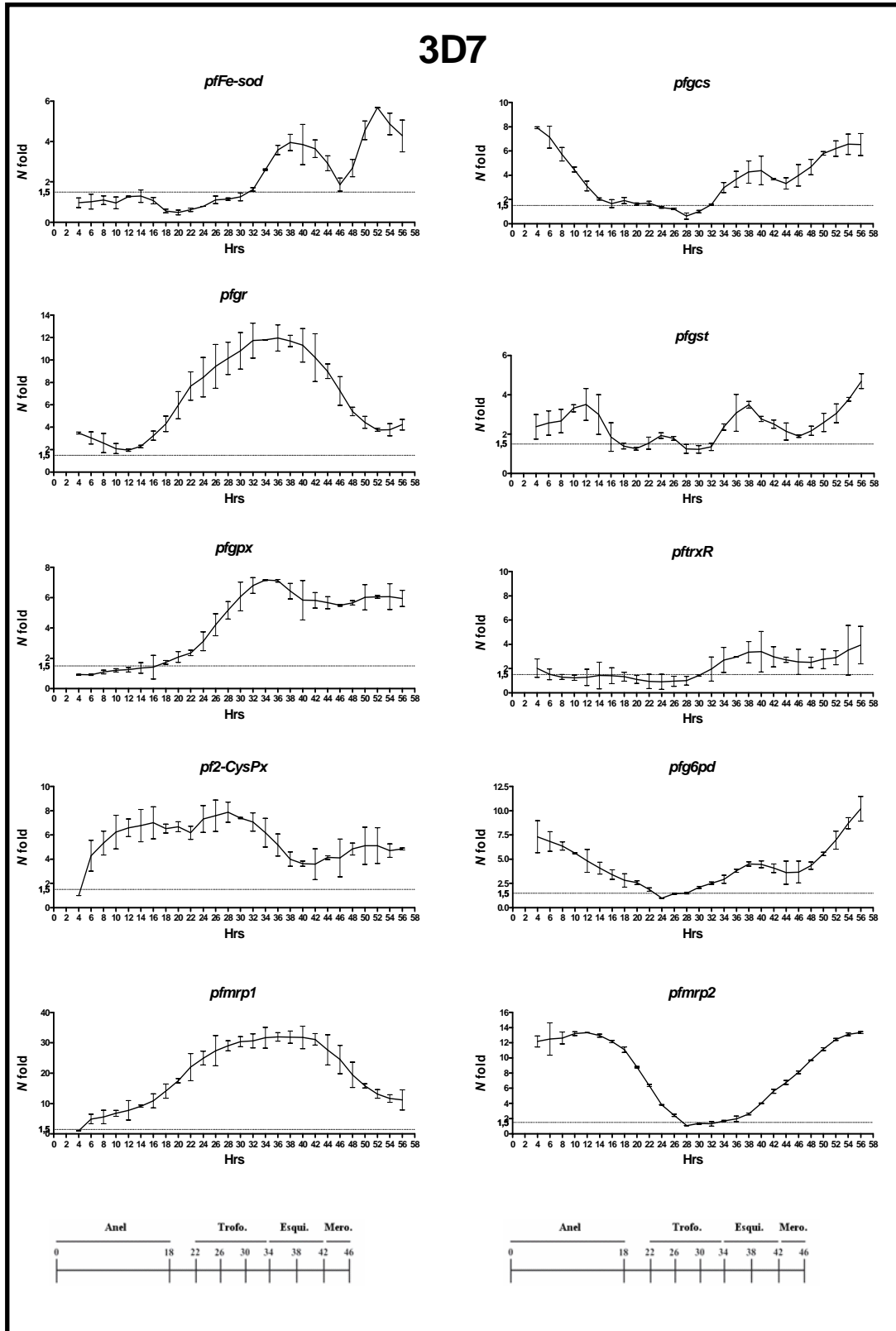


Figura III.12 - Perfil de expressão dos genes *pffFe-sod*, *pfg-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pptrxR*, *pf2-cysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone 3D7 de *P. falciparum*. Nfold expressão de mRNA (amplitude de variação da expressão génica) ao longo do ciclo em escala semilogarítmica. Hrs representa a hora após invasão. A linha tracejada indica a variação de expressão de 1,5 vezes. Anel (0-22 h), Trofo. trofozoíto (22-34 h), Esqui. esquizonte (34-42h). Mero. merozoíto (44-46h).

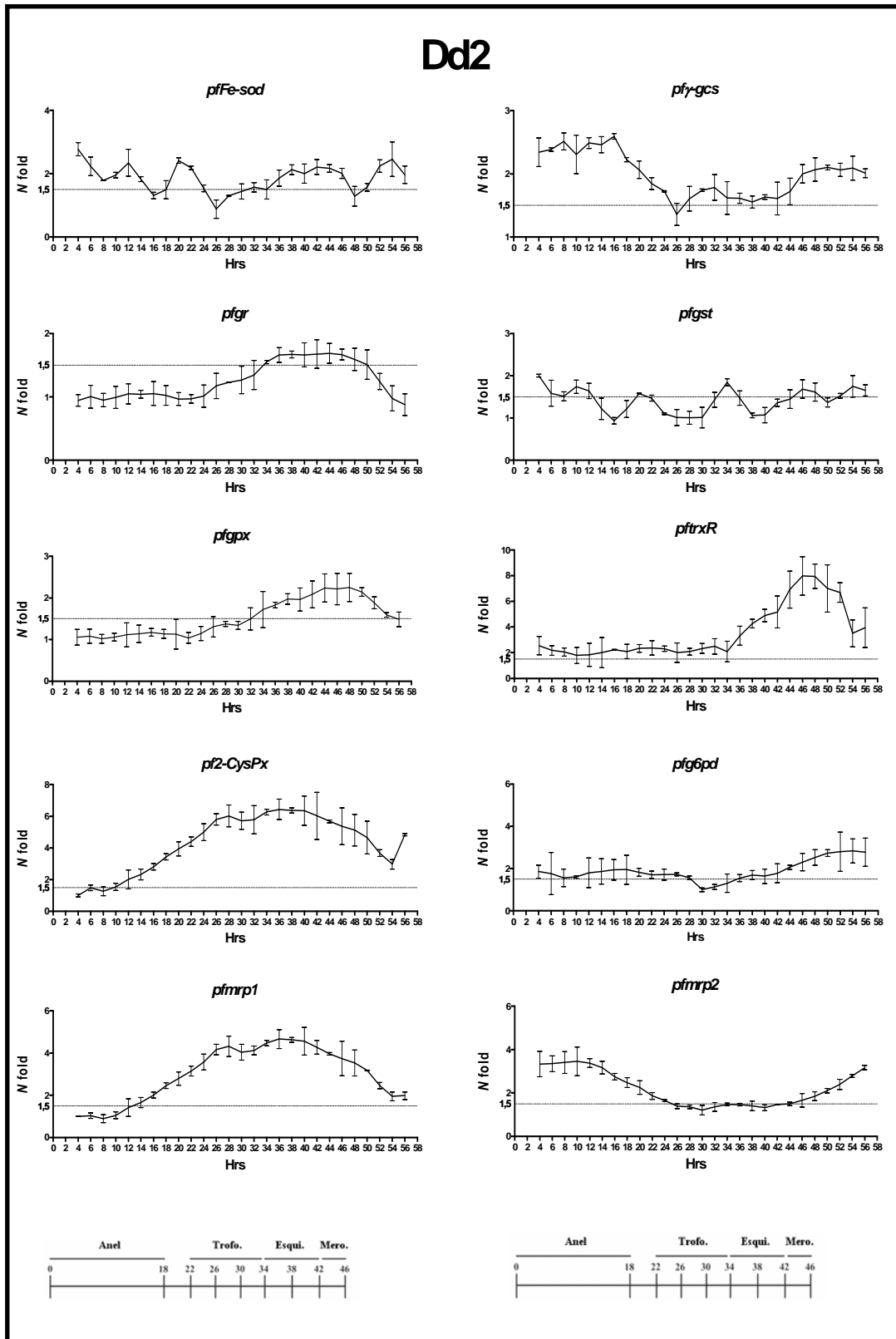
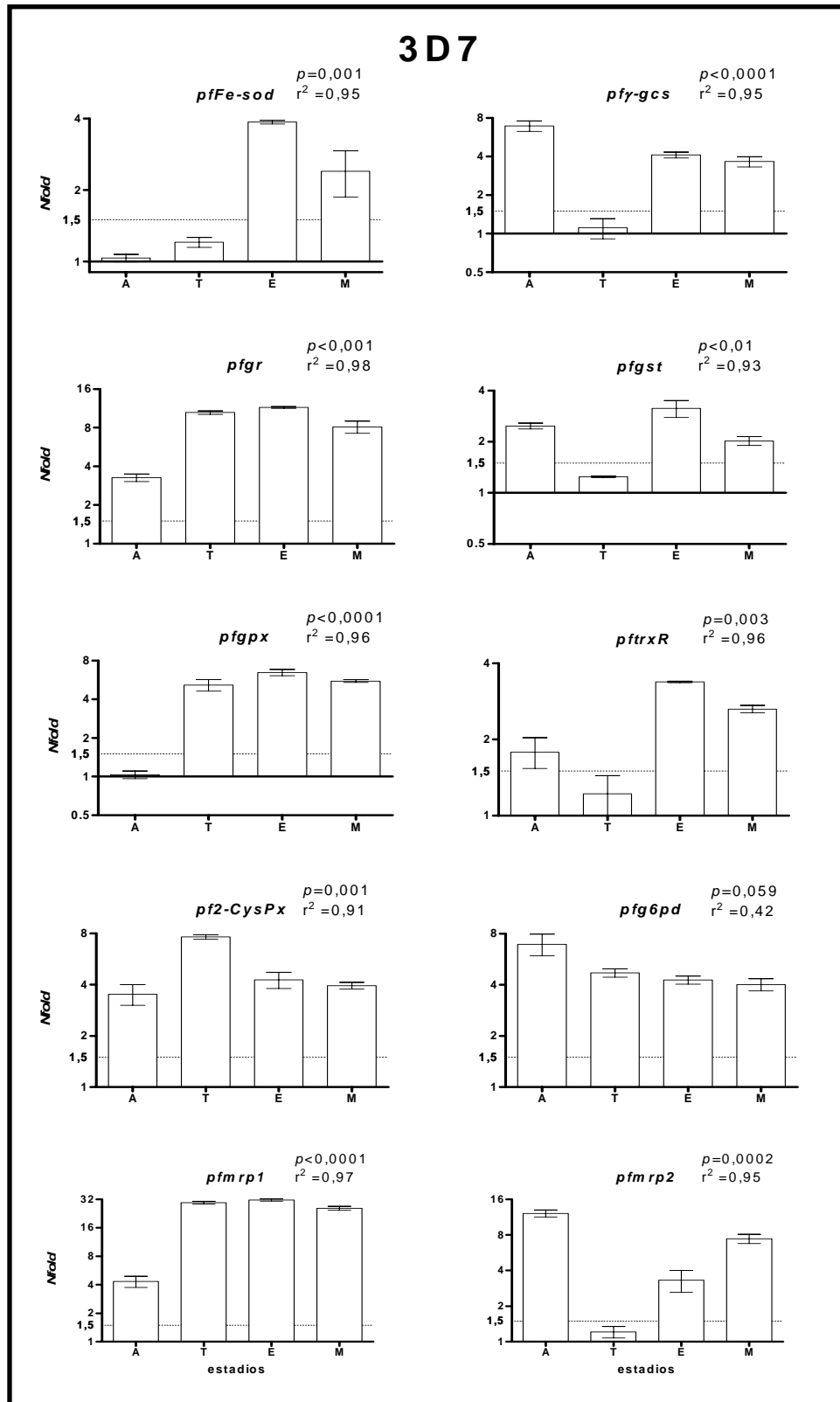


Figura III.13 - Perfil de expressão dos genes *pFfe-sod*, *pFy-gcs*, *pFgr*, *pFgst*, *pFgpx*, *pFtrxR*, *pF2-cysPx*, *pFg6pd*, *pFmrp1* e *pFmrp2* ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone Dd2 de *P. falciparum*. Nfold expressão de mRNA (amplitude de variação da expressão génica) ao longo do ciclo em escala semi-logarítmica. Hrs representa a hora após invasão. A linha tracejada indica a variação de expressão de 1,5 vezes. Anel (0-22 h), Trofo. trofozoítio (22-34 h), Esqui. esquizonte (34-42h). Mero. merozoítio (44-46h).

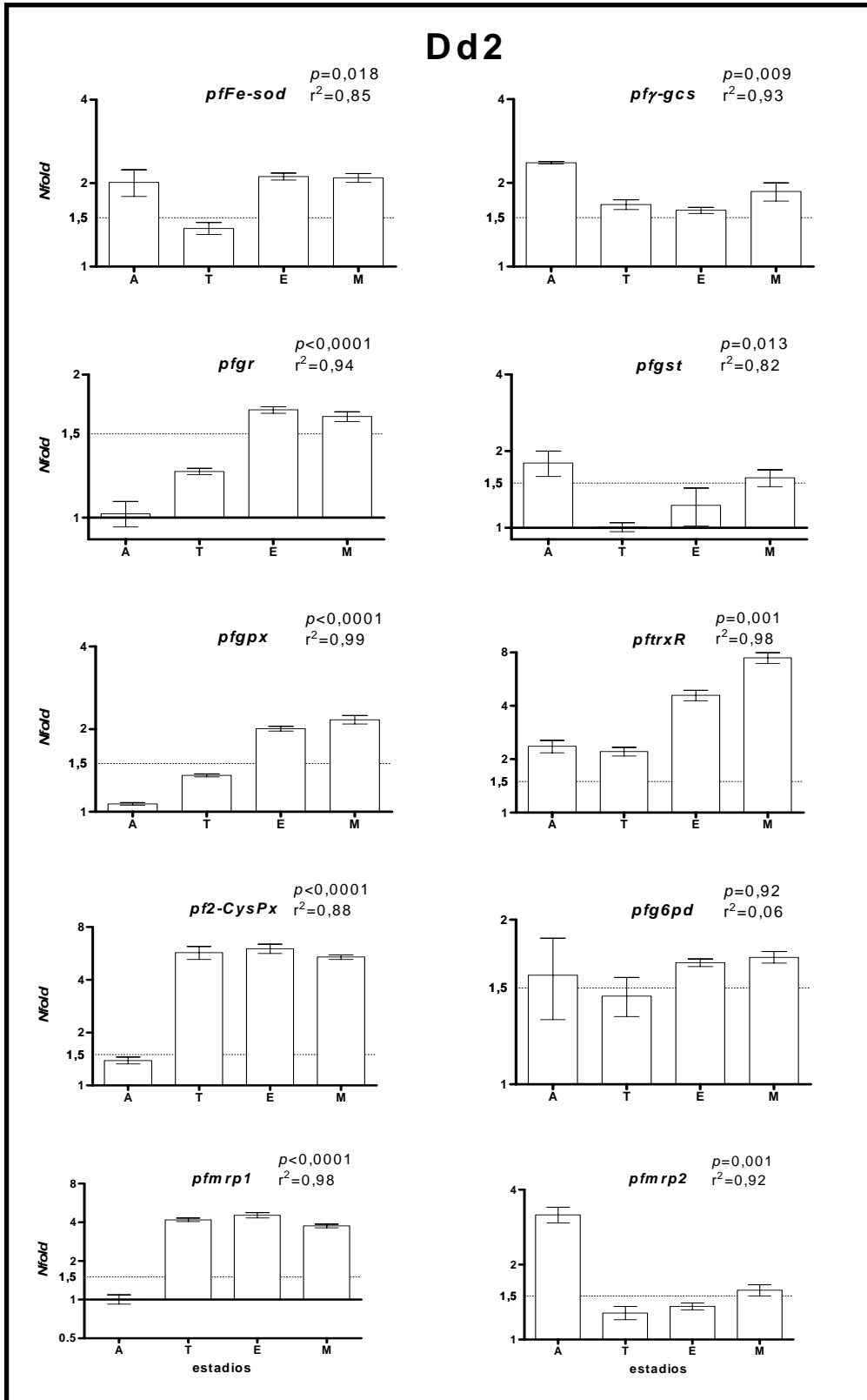
#### III.3.4.1.1 - Regulação dos genes em estudo, no ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum*

Para os estudos de regulação no ciclo, foram constituídos 4 grupos correspondentes aos estádios de desenvolvimento de *P. falciparum* (anel A, trofozoíto T, esquizonte E merozoíto M). Para cada gene consideramos um grupo, o conjunto de duas determinações consecutivas, da seguinte forma: A - 4 e 6h após invasão, T - 28 e 30h, E - 38 e 40h e M - 44 e 46 (Figura III.14 e Figura III.15). Consideramos que o gene é regulado quando os valores de  $p$  da análise de variâncias ANOVA foram  $P < 0,050$  (para  $\alpha = 0,05$ ) e se verificou alteração da amplitude de expressão de pelo menos 1,5 vezes ( $Nfold \geq 1,5$ ) entre estádios. Estas condições foram aplicadas a todos os genes. Os valores usados foram os resultantes dos ensaios *in vitro* na ausência de cloroquina para cada clone.

Na generalidade observamos regulação em todos os genes e em ambos os clones (Figura III.14 e Figura III.15), excepto para *pfg6pd*. Neste caso observamos uma alteração de expressão do gene superior a 1,5 vezes, no entanto os valores de  $p$  para 3D7 ( $p = 0,059$  e  $r^2 = 0,42$ ) e para Dd2 ( $p = 0,049$  e  $r^2 = 0,77$ ) estão no limite do valor para  $p$  ( $P < 0,050$ ) estipulado nos critérios predefinidos para considerar um gene regulado. Tendo em conta os valores de  $p$  da ANOVA deveríamos classificar este gene como possuindo expressão constitutiva.



**Figura III.14 - Alteração da amplitude de expressão dos diferentes genes entre estadios intra-eritrocitários do clone 3D7 de *P. falciparum*.** Nfold expressão de mRNA (amplitude de variação da expressão génica) em escala semi-logarítmica. Anéis A 4 e 6h após invasão, trofozoítos T 28 e 30h, esquizontes E 38 e 40h e merozoítos M 44 e 46h. A linha tracejada indica a variação de expressão de 1,5 vezes.



**Figura III.15 - Alteração da amplitude de expressão dos diferentes genes entre estádios intra-eritrocitários do clone Dd2 de *P. falciparum*.** Nfold expressão de mRNA (amplitude de variação da expressão génica) em escala semi-logarítmica. Anéis A 4 e 6h após invasão, trofozoítos T 28 e 30h, esquizontes E 38 e 40h e merozoítos M 44 e 46h. A linha tracejada indica a variação de expressão de 1,5 vezes.



Os parâmetros da ANOVA ( $p$  e  $r^2$ ) foram também calculados tendo em conta os 27 pontos do ciclo intra-eritrocitário para cada gene e em cada clone (ANEXO 16). Os valores foram concordantes (na generalidade) com os parâmetros determinados na análise entre estadios, excepto nos genes *pfFe-sod* e *pf $\gamma$ -gcs* no clone Dd2 (*pfFe-sod*  $p=0,427$ ,  $r^2=0,34$  e *pf $\gamma$ -gcs*  $p=0,771$ ,  $r^2=0,269$ ). Estas excepções são concordantes com os maiores valores de  $p$  (*pfFe-sod*  $p=0,043$  e *pf $\gamma$ -gcs*  $p=0,007$ ) e menores valores de  $r^2$  (*pfFe-sod*  $r^2=0,84$  e *pf $\gamma$ -gcs*  $r^2=0,94$ ) determinados entre estadios (Figura III.14 e Figura III.15). No que se refere ao gene *pf $\gamma$ 6pd*, os valores determinados tendo em conta os 27 pontos de colheita, geraram valores de  $p=0,0272$  ( $r^2=0,4729$ ) dentro dos limites dos critérios para considerar o gene regulado, mas mais elevados do que para os restantes genes.

### III.3.4.1.2 - Correlação dos perfis de expressão de cada gene em ambos os clones 3D7 e Dd2 ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum*

Foi determinado o coeficiente de correlação de *Pearson* em cada ponto de colheita para cada gene em ambos os clones 3D7 e Dd2, permitindo avaliar de forma indirecta o grau de sincronia entre os ciclos de ambos os clones. Isto, permitiu que as medições efectuadas fossem realizadas no mesmo estadio do parasita em ambos os ciclos. Bem como estabelecer comparações com dados de outros autores. Os valores desta correlação entre os clones 3D7 e Dd2 encontram-se na Tabela III.12 e os valores da correlação com outros autores no ANEXO 17.

Para amostras de dimensões e condições experimentais comparáveis, assumimos que a nossa amostra segue uma distribuição aproximada à Gaussiana. Dado que não assumimos previamente qual o sentido (positiva ou negativa) da correlação, usamos o teste *two-tail P value* para determinar o valor do coeficiente de *Pearson*  $r$  e  $P$ . A correlação entre os perfis de expressão obtidos para os clones 3D7 e Dd2, foi aceitável para todos os genes excepto para *pf $\gamma$ -gcs* e *pf2-CysPx*.

Tabela III.12 - Correlação entre os perfis de expressão obtidos para os clones 3D7 e Dd2 dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e transportadores (*pfmrp1* e *pfmrp2*). + correlação positiva; a. c. ausência de correlação.

| 3D7 / Dd2                        | P*     | Significância<br>( $\alpha=0,05$ ) |
|----------------------------------|--------|------------------------------------|
| <i>pfFe-sod</i>                  | 0,0263 | +                                  |
| <i>pf<math>\gamma</math>-gcs</i> | 0,5919 | a. c.                              |
| <i>pfgr</i>                      | 0,0024 | +                                  |
| <i>pfgst</i>                     | 0,0290 | +                                  |
| <i>pfgpx</i>                     | 0,0081 | +                                  |
| <i>pftrxR</i>                    | 0,0001 | +                                  |
| <i>pf2-CysPx</i>                 | 0,9393 | a. c.                              |
| <i>pfg6pd</i>                    | 0,0032 | +                                  |
| <i>pfmrp1</i>                    | 0,0001 | +                                  |
| <i>pfmrp2</i>                    | 0,0001 | +                                  |

\*Para valores de  $P < 0,05$  consideramos existência de correlação para  $\alpha=0,05$

Na generalidade existiu correlação positiva entre os perfis de expressão dos dois clones 3D7 e Dd2, no que respeita à abundância relativa de mRNA por PCR em tempo real. Isto contribui para o reforço da confiança de que as determinações reflectem condições biológicas.

### III.3.4.2 - Alteração da expressão dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e transportadores (*pfmrp1* e *pfmrp2*) ao longo do ciclo intra-eritrocitário nos clones 3D7 e Dd2 na presença de cloroquina

Esta fase do trabalho teve como objectivos identificar eventuais diferenças ao nível da expressão dos genes de resposta ao stress oxidativo e das prováveis bombas de efluxo codificadas pelos genes *pfmrp1* e *pfmrp2*, comparando parasitas sensíveis (3D7 CQS) e resistentes (Dd2 CQR) na presença (em concentração correspondente ao IC50 de cada clone) e ausência de CQ. A diferença de expressão dos genes em cultura sem CQ e na presença de CQ é dada pelo valor de *Nfold* (determinado segundo a equação  $N=2^{-(Ct,alvo - Ct,contolo\ interno) \cdot \chi - (Ct,alvo - Ct,contolo\ interno) \cdot \gamma}$  onde  $\chi$  corresponde à amostra tratada com CQ (IC50) e  $\gamma$  à amostra não tratada), nos clones 3D7 e Dd2. *Nfold* corresponde ao número de vezes que determinado gene se expressa mais ou menos, na amostra tratada do que

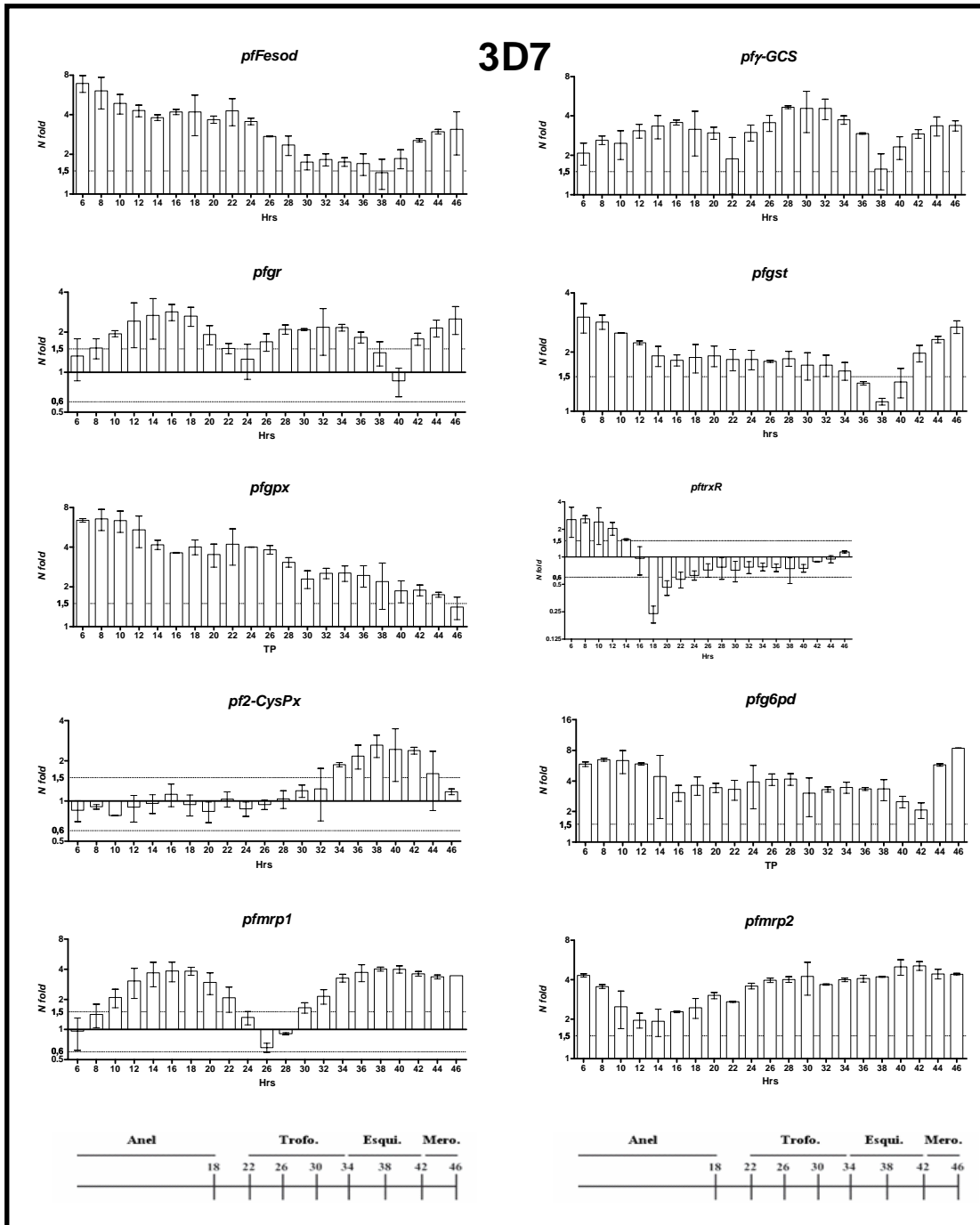
na amostra não tratada com a CQ. Para o presente estudo consideramos que existiu diferença de expressão quando o valor de *Nfold* é superior a 1,5. Os resultados dos valores de *Nfold* e os respectivos desvios padrão, encontram-se na Figura III 16 e Figura III 17

Para os 10 genes em estudo e em ambos os clones, ocorreu aumento significativo da expressão na presença de CQ. Sendo que a amplitude de variação de expressão dos genes é significativamente mais elevada no clone 3D7 (CQS) do que no Dd2 (CQR). Não foi verificada em geral diminuição significativa da expressão dos genes em presença de CQ.

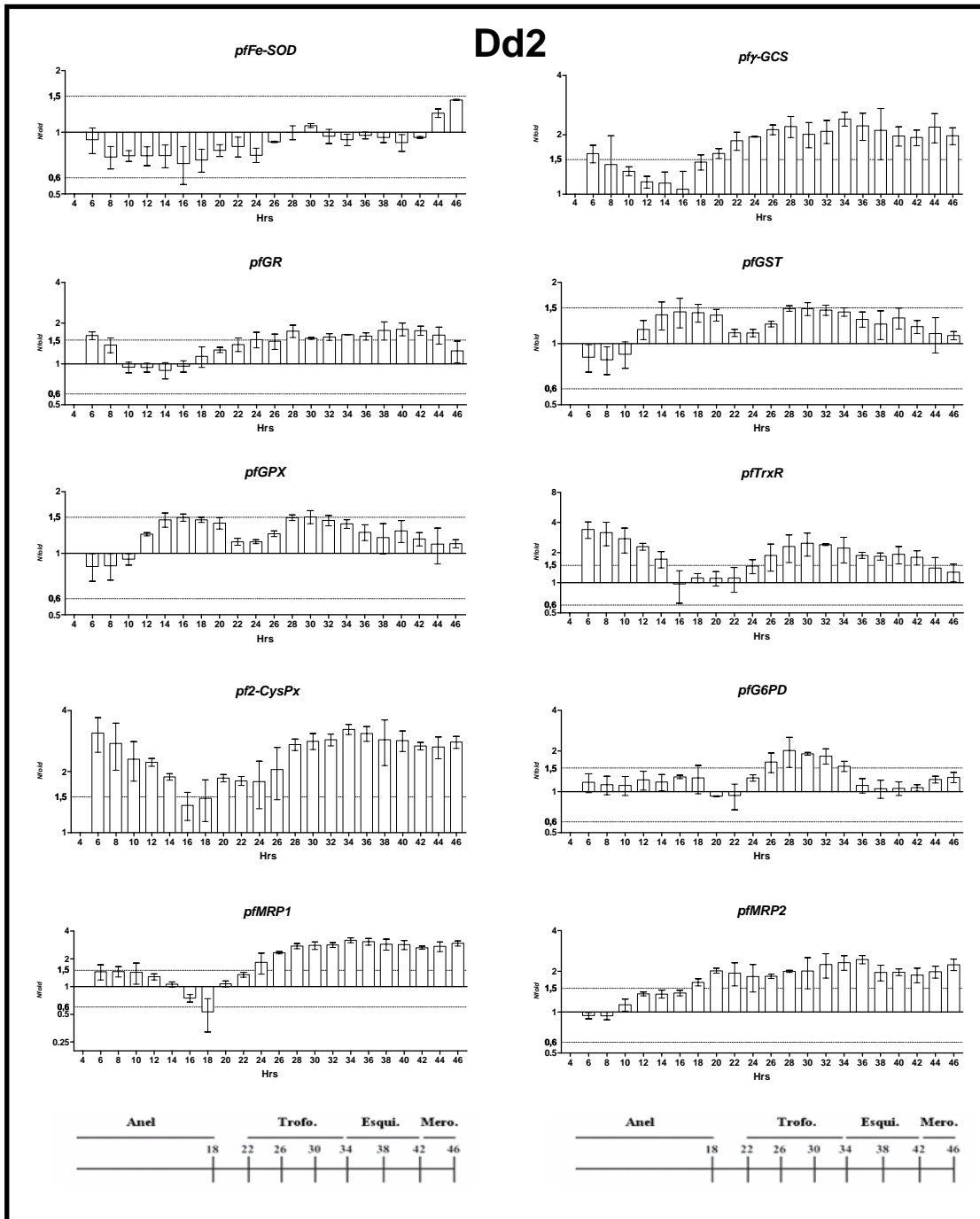
A variação da amplitude de expressão induzida pela CQ em ambos os clones parece seguir 4 padrões distintos; contínua (CT), descontínua (DT), difásica (DF) e trifásica (TF). Seguindo este padrão agrupamos os genes da seguinte forma: **CT** - *pfgpx* e *pfmrp2*; **DT** - *pftrxR*; **DF** - *pfFe-sod*, *pfgst*, *pf2-cysPx* e *pfmrp1*; **TF** - *pfγ-gcs*, *pfgr*, *pfg6pd*. No clone Dd2, *pfg6pd* comporta-se como contínua pois apesar de serem observáveis 3 fases distintas (em que a expressão aumenta), a amplitude de variação não atinge o nível de significância previamente estabelecido de 1,5 vezes.

### a) *pfFe-sod*

Para o clone 3D7 (CQS) os valores de *Nfold* indicam um aumento da expressão de *pfFe-sod* na fase de anel, o qual se mantém durante a fase de trofozoíto, decrescendo à medida que os trofozoítos passam ao estadio de esquizonte, onde obtivemos os valores mais baixos de alteração de expressão deste gene, na presença de CQ. A expressão aumenta de novo à medida que o parasita passa para o estadio de merozoíto (Figura III.16). Os valores de expressão variam entre 1,6 e  $\approx 9$  vezes mais na presença de CQ. Pelo contrário no clone Dd2 (CQR), não foi detectada alteração significativa da expressão de *pfFe-sod* em resposta à presença de CQ Figura III.17.



**Figura III.16 - Alteração da expressão dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone 3D7 na presença de cloroquina.** No eixo dos Y está representado em escala semi-logarítmica o valor de *N*fold (variação da expressão génica) ao longo do ciclo na presença de CQ. O valor 1 indica ausência de alteração da expressão por efeito da CQ. Os valores fora das linhas a tracejado (entre 0,6 e 1,5) indicam aumento ou diminuição da expressão. Hrs representa a hora após invasão. Anel (0-22 h), Trofo. trofozoíto (22-34 h), Esqui. esquizonte (34-42h). Mero. merozoíto (44-46h).



**Figura III.17 - Alteração da expressão dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone Dd2 na presença de cloroquina.** No eixo dos Y está representado em escala semi-logarítmica o valor de Nfold (variação da expressão génica) ao longo do ciclo na presença de CQ. O valor 1 indica ausência de alteração da expressão por efeito da CQ. Os valores fora das linhas a tracejado (entre 0,6 e 1,5) indicam aumento ou diminuição da expressão. Hrs representa a hora após invasão. Anel (0-22 h), Trofo. trofozoíto (22-34 h), Esqui. esquizonte (34-42h). Mero. merozoíto (44-46h).

### b) *pfy-gcs*

Em ambos os clones os valores de *Nfold* indicam um aumento da expressão de *pfy-gcs* ao longo de todo o ciclo intra-eritrocitário, excepto na fase de anel em Dd2 (Figura III.17). Embora a tendência seja a mesma, de aumento de expressão na presença de fármaco, a amplitude de variação é maior em 3D7 ( $\approx 4$  vezes) (Figura III.16) do que em Dd2 onde esta variação apenas ultrapassa pontualmente as duas vezes mais.

### c) *pfgr*

Os valores de *Nfold* indicam um aumento da expressão deste gene com um padrão idêntico ao de *pfy-gcs* para o clone 3D7 (Figura III.16), embora com menor amplitude. Para o clone Dd2 as variações de expressão atingem valores significativos apenas pontualmente, na fase de anel (Figura III.17). Embora se verifique uma tendência para o aumento de expressão na presença de fármaco, a amplitude de variação é maior em 3D7 ( $\approx 3$  vezes) do que em Dd2, onde esta variação ultrapassa as duas vezes mais, apenas pontualmente.

### d) *pfgst*

Para o clone 3D7 os valores de *Nfold* indicam um aumento da expressão de *pfgst* na fase de anel, o qual se mantém durante a fase de trofozoíto, decrescendo à medida que os trofozoítos passam ao estadio de esquizonte onde foram obtidos os valores mais baixos de alteração de expressão deste gene na presença de CQ. A expressão aumentou de novo à medida que o parasita passa para o estadio de merozoíto (Figura III.16). Os valores *Nfold* variam até  $\approx 3$  vezes, mas na generalidade não ultrapassam as duas vezes. Pelo contrário, no clone Dd2, não foi detectada alteração significativa da expressão de *pfgst* em resposta à presença de CQ (Figura III.17).

### e) *pfgpx*

Os valores de *Nfold* indicam um aumento da expressão de *pfgpx* na fase de anel, o qual se mantém durante a fase de trofozoíto, decrescendo à medida que os trofozoítos passam ao estadio de esquizonte onde obtivemos a menor amplitude de variação de expressão do referido gene na presença de CQ. A tendência da variação da expressão parece ser

decrecente à medida que o parasita se desenvolve atingindo um máximo na fase de anel de  $\approx 9$ , decrescendo para valores não significativos ( $\leq 1,5$ ) no final do ciclo intra-eritrocitário (Figura III.16). Pelo contrário no clone Dd2, não foi detectada alteração significativa da expressão de *pfgpx* em resposta à presença de CQ (Figura III.17).

### f) *pftrxR*

Para *pftrxR*, o padrão de expressão, bem como a amplitude de variação de *Nfold* é idêntica na fase de anel (até às 18h) em ambos os clones 3D7 e Dd2. Sendo maior a amplitude no início e decrescendo para o final da fase de anel (Figura III.16 e Figura III.17). Em 3D7 este decréscimo é mais acentuado parecendo indicar uma inibição da expressão do gene, tendência que se inverte (sem atingir níveis de significância) na fase de esquizonte maduro e merozoíto (Figura III.16). Em Dd2 a expressão de *pftrxR* sofre também uma diminuição significativa durante as primeiras horas de trofozoíto, aumentando depois durante a restante fase de trofozoíto ( $\approx 4$  vezes) e esquizonte ( $\approx 2$  vezes), no estadio de merozoíto a expressão do gene baixa para níveis basais (Figura III.17).

### g) *pf2-cysPx*

No clone Dd2 a expressão de *pf2-cysPx* está aumentada até  $\approx 3$  vezes, na fase de anel decrescendo à medida que os anéis se desenvolvem em trofozoítos. Na fase de trofozoíto os valores de *Nfold* mantêm-se entre 1,5 e 2. À medida que o parasita passa ao estadio de esquizonte a expressão aumenta para valores de  $N \approx 3$  vezes e mantêm-se durante a fase de esquizonte até ao final do ciclo (Figura III.17). No clone 3D7, apenas se regista um aumento de expressão da ordem das 2 vezes na fase de esquizonte, as variações de expressão nos restantes estadios mantêm-se abaixo do limiar de significância (Figura III.16).

### h) *pf66pd*

Para o clone 3D7 os valores de *Nfold* indicam um aumento da expressão de *pf66pd* na fase de anel que se mantêm em valores *Nfold*  $\approx 3$ , durante todo o estadio. Durante a fase de trofozoíto e esquizonte, também se regista um aumento de expressão relativamente constante e com valores de *Nfold*  $\approx 4$  (Figura III.16). No clone Dd2 a expressão deste

gene aumenta à medida que os esquizontes se desenvolvem, atingindo valores de *Nfold*  $\approx 2$  e decresce à medida que os esquizontes ficam maduros (Figura III.17).

### i) *pfmrp1*

Para o clone 3D7 os valores de *Nfold* indicam um aumento da expressão de *pfmrp1* durante o desenvolvimento dos anéis em trofozoítos. À medida que os trofozoítos se desenvolvem a expressão decresce a níveis de *Nfold*  $< 1,5$  e volta a subir quando os parasitas se diferenciam em esquizontes atingindo valores de *Nfold*  $\approx 4$ . A expressão baixa durante a diferenciação em merozoítos (Figura III.16). No clone Dd2 a expressão de *pfmrp1* mantém-se em valores de *Nfold*  $< 1,5$  (não varia pela presença de CQ) durante a fase de anel e trofozoíto jovem, quando os trofozoítos se desenvolvem, os níveis de expressão aumentam até os parasitas atingirem o estadió de esquizonte mantendo-se constantes (*Nfold*  $\approx 4$ ) (Figura III.17).

### j) *pfmrp2*

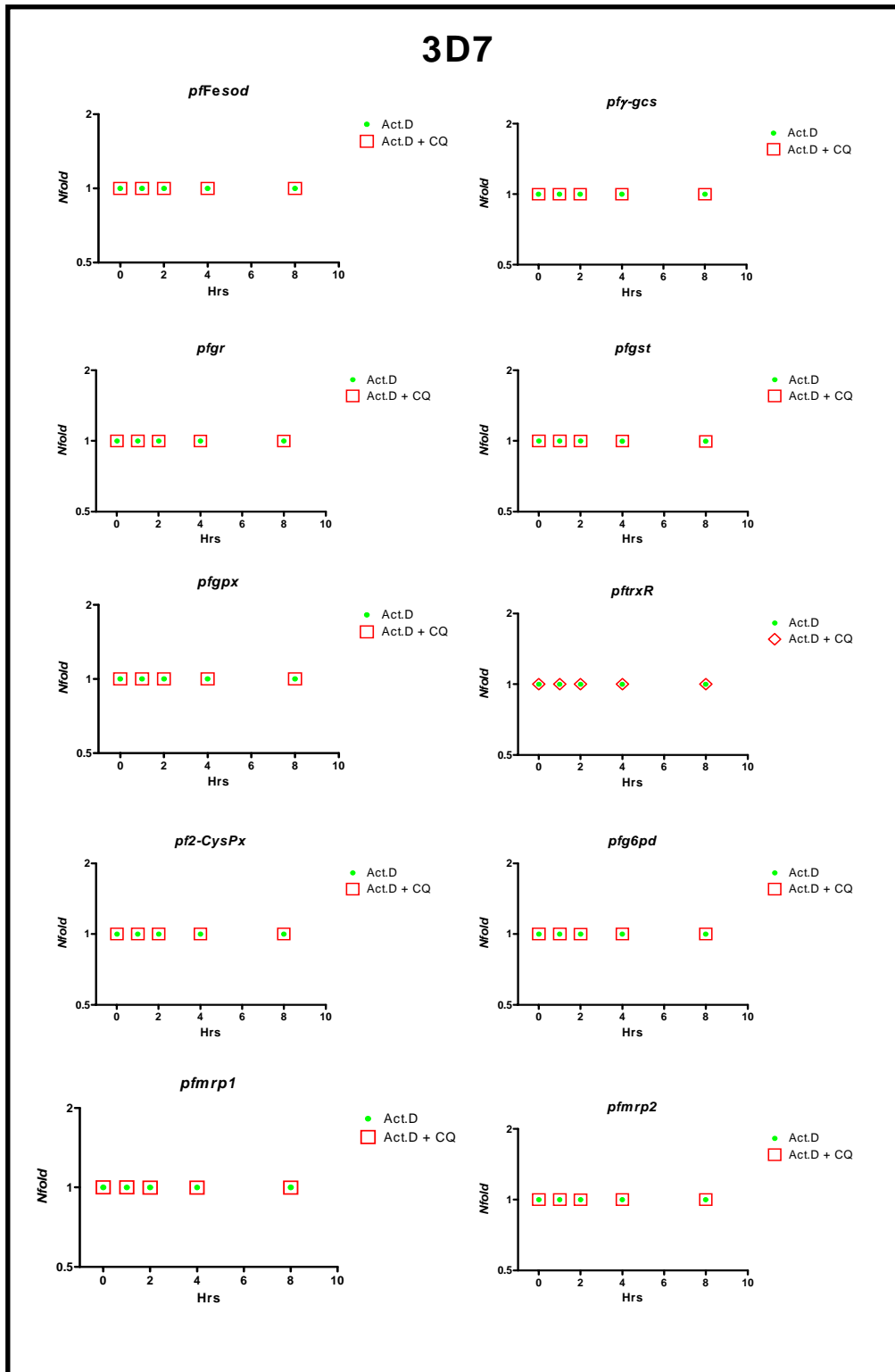
Na fase de anel do clone Dd2, não se regista aumento de expressão até se iniciar a diferenciação para trofozoíto, enquanto que no clone 3D7 na fase de anel a expressão está aumentada decrescendo de *Nfold*  $\approx 4$  para  $\approx 3$  (Figura III.16 e Figura III.17 respectivamente). A partir da fase de anel e em ambos os clones, embora a tendência de variação seja a mesma, a amplitude de variação é maior em 3D7 (entre  $\approx 3$  a 4 na fase de trofozoíto e entre  $\approx 4$  a 6 na fase de esquizonte) do que em Dd2 (entre  $\approx 1,5$  a 2 na fase de trofozoíto e entre  $\approx 2$  a 3 na fase de esquizonte) (Figura III.16 e Figura III.17 respectivamente).

### III.3.4.3 - Efeito da cloroquina na regulação da transcrição dos genes de enzimas de resposta ao *stress* oxidativo e dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2* nos clones 3D7 e Dd2

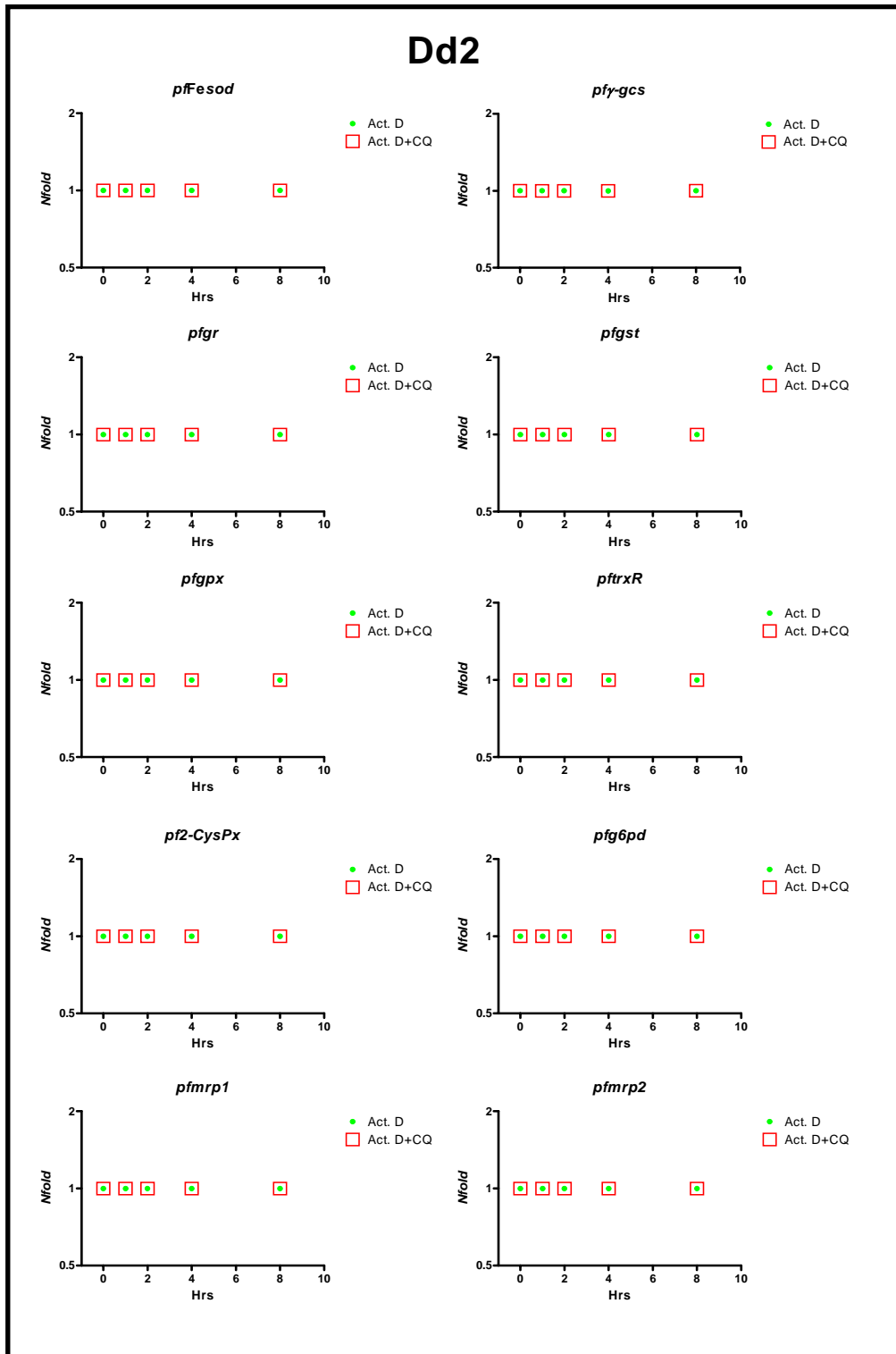
Para testar o efeito da cloroquina (CQ) na transcrição e conseqüente aumento da expressão, dos referidos genes, foi testada a influência da Actinomicina D (Act.D inibidor da transcrição) no efeito da CQ sobre a transcrição. Foram realizadas culturas de *P. falciparum* com Act.D, na presença e ausência de CQ. Na presença da Act.D, não



se verificou a indução da expressão dos genes pela CQ (ver Figura III.16 e Figura III.17), como podemos confirmar pela observação dos gráficos da Figura III.18 e Figura III.19. A expressão de cada gene e para cada clone, foi idêntica na presença de Act.D, ou Act.D + CQ. O que sugere que o efeito de regulação da CQ se processa a nível transcripcional. Estes resultados foram observados para todos os genes e em ambos os clones 3D7 e Dd2. Estas observações indicam que a CQ não modifica a velocidade de degradação do mRNA destes genes, ou seja, não aumenta a estabilidade do mRNA.



**Figura III.18 - Influência da Actinomicina D no efeito da cloroquina sobre a transcrição dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2* no clone 3D7.** Act.D, cultura só com Actinomicina D; Act.D + CQ, cultura com Actinomicina D e CQ. No eixo dos Y está representado em escala semi-logarítmica o valor de *Nfold* (variação da expressão génica). O valor 1 indica ausência de alteração da expressão.



**Figura III.19 - Influência da Actinomicina D no efeito da cloroquina sobre a transcrição dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2* no clone Dd2.** Act.D, cultura só com Actinomicina D; Act.D + CQ, cultura com Actinomicina D e CQ. No eixo dos Y está representado em escala semi-logarítmica o valor de *Nfold* (variação da expressão génica). O valor 1 indica ausência de alteração da expressão.

### III.4 - Detecção e localização celular das proteínas codificadas pelos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* nos clones 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*

Esta parte do trabalho, teve como objectivo detectar as proteínas PfMRP1 e PfMRP2 codificadas pelos genes *pfmrp1* e *pfmrp2*, por *Western Blot* e a sua localização celular por imunofluorescência (IFA). Assim, foram clonados fragmentos de cada um dos genes (*pfmrp1* e *pfmrp2*) num vector de expressão e produzidas desta forma, proteínas recombinantes com uma sequência de 6 histidinas. As proteínas recombinantes foram seguidamente inoculadas em roedores, para produção de soros hiper-ímmunes, os quais foram usados para detectar as proteínas PfMRP1 e PfMRP2 por *Western Blot* e IFA.

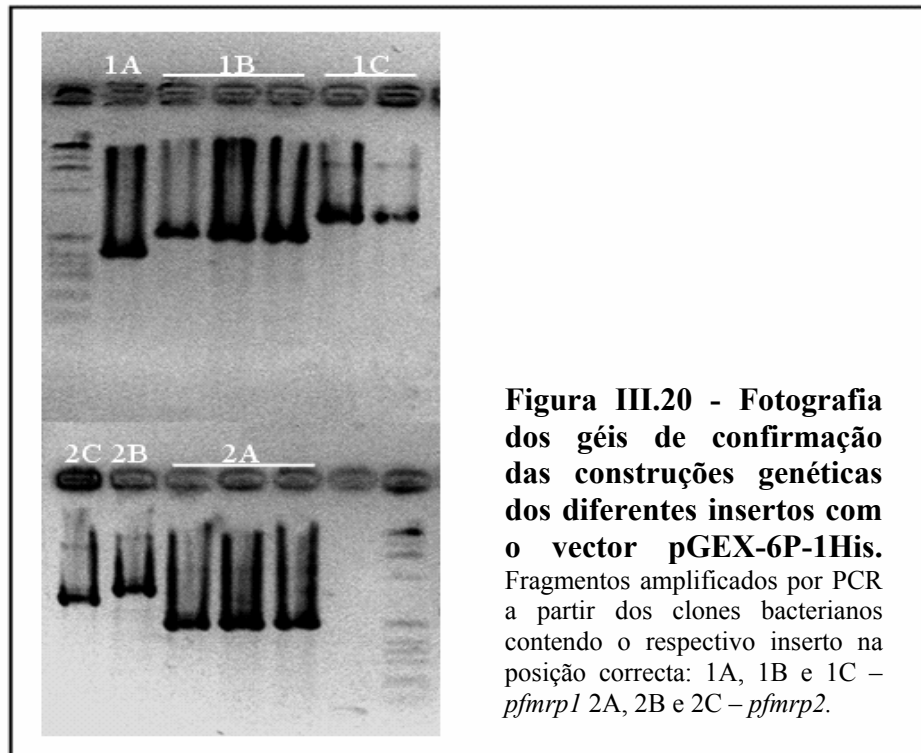
#### III.4.1 - Clonagem dos fragmentos de cada um dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* no vector de expressão pGEX-6P-1-His

As regiões transmembranares das proteínas, no seu estado nativo, encontram-se embebidas na membrana, não estando portanto acessíveis à detecção por anticorpos. O desenho dos *primers* para amplificar os 3 fragmentos a clonar em cada gene, teve em consideração a análise dos perfis de hidrofobicidade (ANEXO 5) e a presença de variações na sequência nucleotídica (ANEXO 8 e ANEXO 9). Desta forma, a aumentar a probabilidade de produzir proteínas recombinantes, que originam uma resposta antigénica adequada à posterior detecção das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 em parasitas (por IFA) e em extractos de proteínas (*Western Blot*).

A designação e tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) de cada inserto foram as seguintes; *pfmrp1* - 1A – 354 pb, 1B – 486 pb e 1C – 678 pb e para *pfmrp2* - 2A– 375 pb, 2B – 369 pb e 2C – 405 pb. Os fragmentos amplificados para confirmação das construções genéticas (Figura III.20), contêm 95 bps adicionais correspondentes ao plasmídeo.

Parte do produto de PCR visualizado no gel da Figura III.20, foi purificado e sequenciado para confirmação das respectivas sequências. Tendo-se verificado que a sequência do inserto, correspondia à esperada e estava clonado na orientação correcta, no vector de expressão.

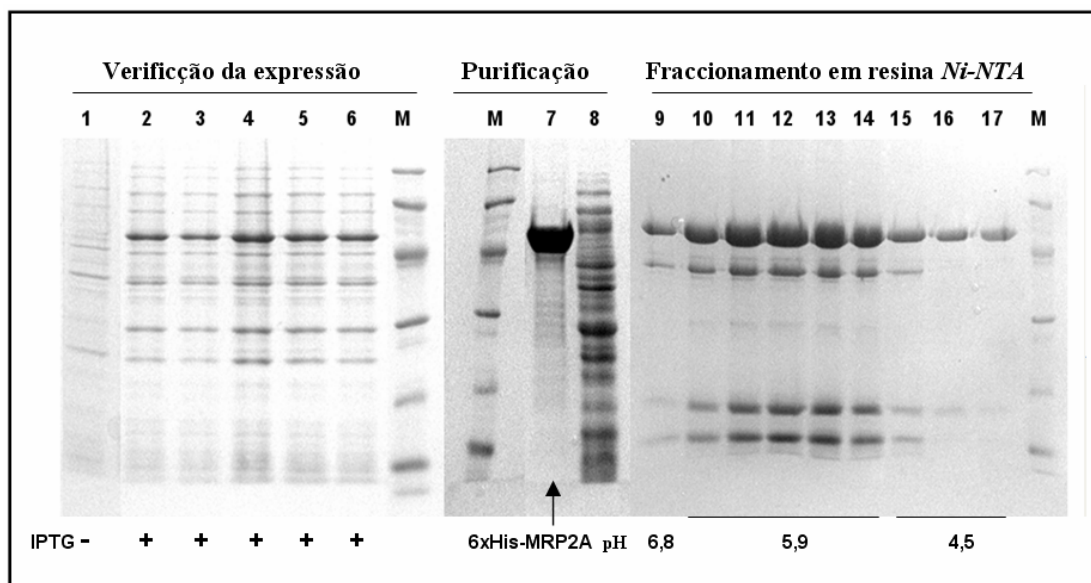
Estas construções genéticas foram usadas para transformar *E. coli* (BL21), onde foram produzidas as proteínas recombinantes.



#### III.4.2 - Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* (BL21)

Os clones bacterianos seleccionados, e foi induzida a expressão de proteínas. As proteínas totais foram extraídas, purificadas em resina de Níquel (*Ni-NTA*, Quiagen), e separadas por electroforese em gel SDS-PAGE, os resultados encontram-se na Figura III.21. Apenas se obtiveram resultados de expressão satisfatórios com os clones contendo a construção genética relativa a MRP1A e MRP2A.

As proteínas totais cuja expressão foi induzida em larga escala (2x 2l) foram extraídas e as proteínas recombinantes purificadas em coluna de resina de Níquel (*Ni-NTA*, Quiagen). Uma alíquota de cada fracção foi analisada em gel SDS-PAGE, os resultados encontram-se na Figura III.21, exemplificados para o clone MRP2A3.

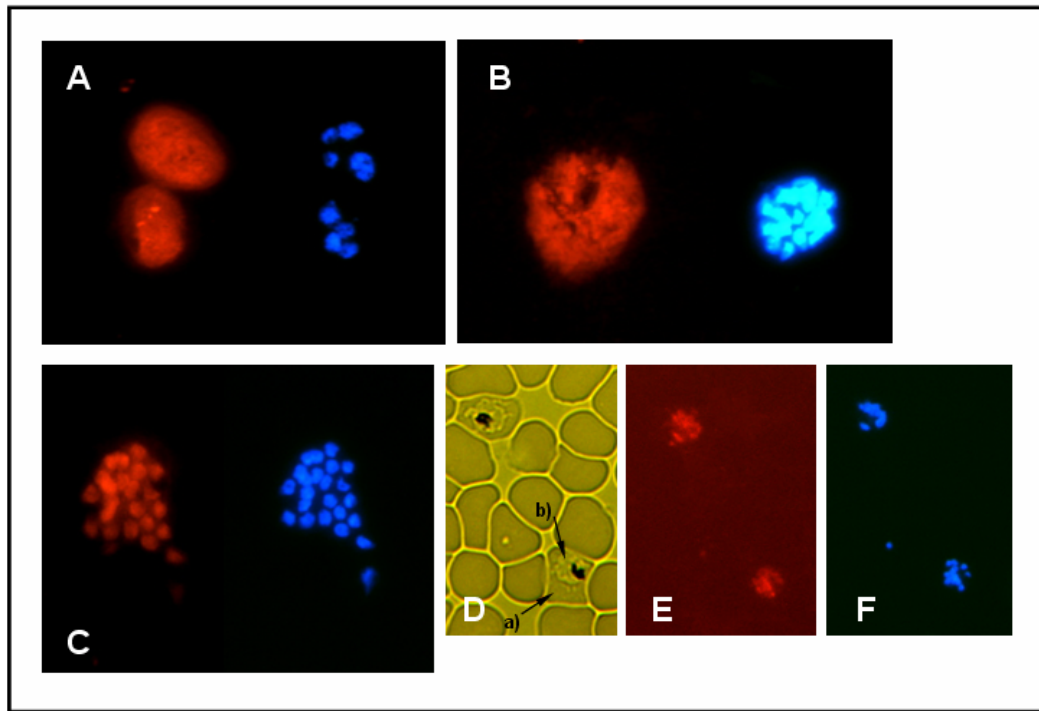


**Figura III.21 - Indução da expressão e purificação das proteínas recombinantes.** As fotografias correspondem aos géis SDS-PAGE relativos a 6xHis-MRP2A. 1 – clone MRP2A1 não induzido; 2 - clone MRP2A1; 3 - clone MRP2A2; 4 - clone MRP2A3; 5 - clone MRP2A4 e 6 - clone MRP2A5 induzidos; 7 – proteínas totais do clones MRP2A3 purificadas por resina de Níquel; 8 – sobrenadante resultante do processo de purificação das proteínas totais do clone MRP2A3, por resina de Níquel; 9 – uma das 3 fracção correspondentes ao pH 6,3 do tampão de eluição; 10 à 14 - fracções correspondentes a pH 5,9 do tampão de eluição; 15 à 17 - alíquotas correspondentes as 3 1<sup>as</sup> fracções recolhidas com tampão de eluição pH 4,5. **M** – marcador de peso molecular 97kDa a 14,4kDa.

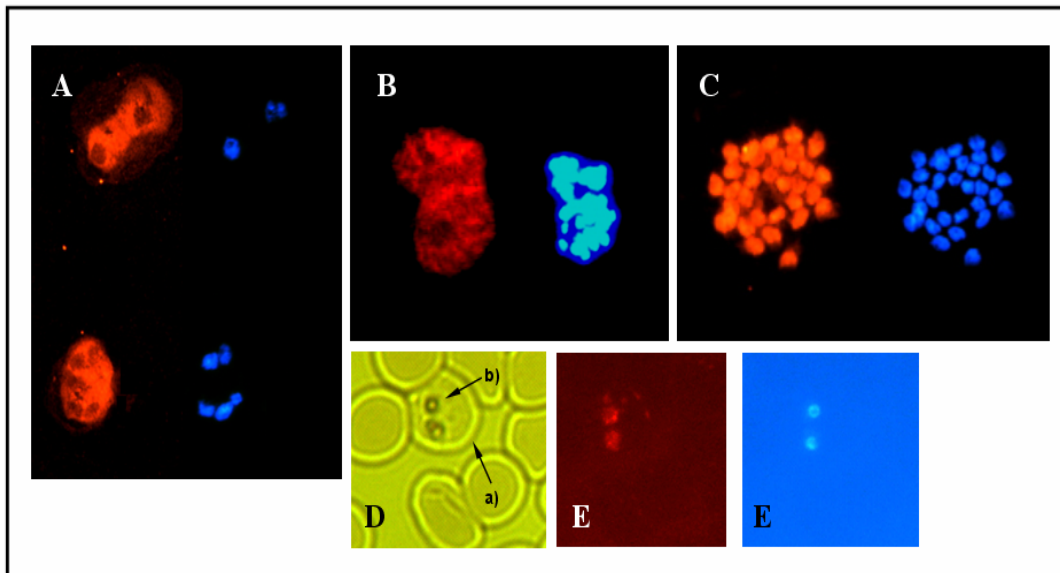
### III.4.3 - Detecção de *P. falciparum* em eritrócitos infectados pela técnica de imunofluorescência IFA (*immunofluorescence assay*) com os soros MRP1A e MRP2A

A detecção dos parasitas em eritrócitos infectados pela técnica de IFA foi efectuada em esfregaços de cultura assíncrona de *P. falciparum*. Os esfregaços foram fixados com acetona e/ou com paraformaldeído e incubadas com os soros hiper imunes MRP1A e MRP2A, para detecção dos parasitas. Com o segundo anticorpo foi adicionado corante específico de DNA, DAPI. Cada campo foi fotografado com filtro 2600 nm para captar emissão da rodamina (vermelho) e com o filtro de 3600 nm para captar a emissão do DAPI (azul). Os esfregaços fixados com acetona foram também observados com luz visível e fotografados (Figura III.22 e Figura III.23).

Não foi efectuada o estudo da localização sub-celular das proteínas estudadas, por falta de acesso a microscopia electrónica em tempo útil.



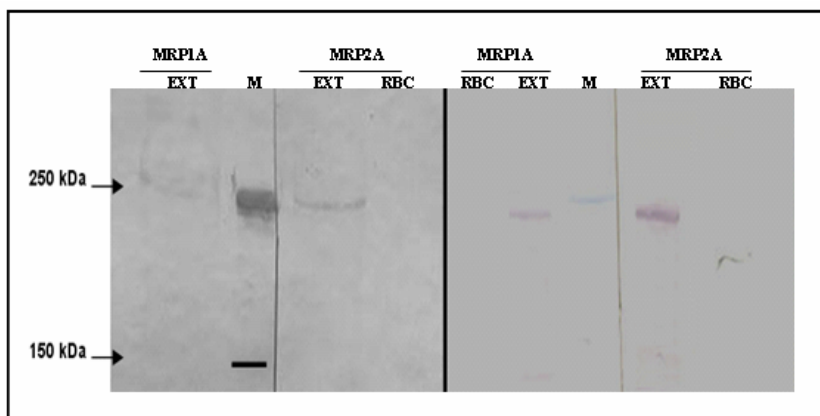
**Figura III.22 - Detecção por IFA dos parasitas *P. falciparum* em eritrócitos infectados, usando o soro hiper imune MRP1A.** A (trofozoítos), B (esquizonte) e C (merozoítos) fixação com paraformaldeído, D, E e F, (esquizontes) fixação com acetona; fotografias correspondentes à imunofluorescência usando soro hiper imune e marcação do 2º anticorpo com rodamina (Cy-3, vermelho); coloração do DNA com DAPI (azul); D microscopia de com luz visível (100X), a) eritrócito infectado b) parasita).



**Figura III.23 - Detecção por IFA dos parasitas *P. falciparum* em eritrócitos infectados, usando o soro hiper imune MRP2A.** A (trofozoítos), B (esquizontes) e C (merozoítos) fixação com paraformaldeído, D, E e F, (esquizontes) fixação com acetona; fotografias correspondentes à imunofluorescência usando soro hiper imune e marcação do 2º anticorpo com rodamina (Cy-3, vermelho); coloração do DNA com DAPI (azul); D microscopia de com luz visível (100X), a) eritrócito infectado b) parasita).

**III.4.4 – Detecção das proteínas *pfmrp1* e *pfmrp2* por *Western Blot* com os soros policlonais MRP1A e MRP2A, respectivamente.**

Extractos de proteínas totais foram obtidos a partir de culturas (conforme descrito em III.2.9) com parasitemia superior a 10%. Em cada poço do gel de SDS-PAGE (7%), foi carregado extracto de proteínas totais resultantes da lise de uma cultura *in vitro* de 3D7 com 10% de parasitemia obtida conforme descrito em III.2.1. Nos poços assinalados como RBC na Figura III.24, foi carregado o produto da lise de 500 µl de eritrócitos não infectados, obtido pelo mesmo método de extração usado para extrair as proteínas totais da cultura de *P. falciparum*.



**Figura III.24 - Detecção das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 por *western blot* em extracto de proteínas totais de *P. falciparum* com os soros hiper imunes MRP1A e MRP2A. EXT – extracto de proteínas totais de parasitas; M – marcador de peso molecular; RBC – eritrócitos não infectados.**

Os soros gerados especificamente contra as proteínas recombinantes MRP1A e MRP2A, reconheceram por *western blot* proteínas com pesos moleculares compatíveis com PfMRP1 e PfMRP2, em extractos totais de proteínas de culturas de *P. falciparum* (EXT. na Figura III.24) Os pesos moleculares esperados para PfMRP1 são 214 kDa e para PfMRP2 248 kDa. Os mesmos soros não reconheceram qualquer banda em extractos totais de eritrócitos não infectados (RBC na Figura III.24).





Esta investigação recaiu sobre 4 linhas de trabalho complementares, sendo a primeira identificação de genes candidatos a proteínas da família ABC, com relevância para transportadores de substâncias endo ou xenobióticas, a mecanismos de resistência a fármacos. Fez-se um estudo mais detalhado de 2 destes genes, utilizando quer em material de laboratório quer parasitas isolados de pacientes, para associação de mutações e de resposta aos fármacos, através de ensaios padronizados. Tentou-se identificar a localização celular das proteínas codificadas por esses genes e, finalmente, fez-se um estudo alargado da resposta dos genes codificantes de enzimas de resposta ao *stress* oxidativo em presença de um fármaco antimalárico, a cloroquina.

A discussão dos resultados obtidos, nestas linhas, revelou que novas linhas de investigação poderão ser desenvolvidas, as quais são sugeridas ao longo da discussão dos resultados.

### **IV.1 - Genes candidatos a proteínas da família ABC no genoma de *P. falciparum***

São conhecidas mais de mil proteínas pertencentes à super-família das proteínas ABC, assim designadas por possuírem os domínios de ligação ao ATP (*ATP Binding Cassete*) característicos. As funções fisiológicas das proteínas ABC incluem a participação na manutenção das funções da mitocôndria, na manutenção da homeostase das membranas, importação de lípidos e participam na resposta ao stress (Benabdelhak *et al.*, 2003). Contribuem para a reparação de DNA e tradução do mRNA, apresentação antigénica, captação de nutrientes, e o transporte de agentes citotóxicos através da membrana celular, resultando na redução da acumulação intracelular de agentes citotóxicos (Szakacs *et al.*, 2006; Piddock, 2006; Cascorbi, 2006; Pradines *et al.*, 2005)

Neste estudo, foram identificadas 22 sequências compatíveis com a maioria das sub-famílias de ABCs (Tabela III.1), exceptuando a sub-família ABCD (transportadores envolvidos no processamento de ácidos gordos de cadeia longa no peroxissoma (Shani & Valle, 1998). Das 22 ORFs identificadas em *P. falciparum*, 14 foram posicionadas em 6 das 7 sub-famílias de proteínas ABC, descritas em humanos (Dean & Allikmets, 2001a): ABCA, ABCB (MDR/TAP), ABCC (MRP/CFTR), ABCE, ABCF (GCN20),

ABCG (*White*). As restantes ORFs possuem características compatíveis com as sub-famílias SMC - *Structural Maintenance of Chromosomes* (Cobbe & Heck, 2006; Cobbe & Heck, 2004b; Cobbe & Heck, 2000) e NAP - *Non-intrinsic ABC protein*, esta última sub-família está descrita apenas em plantas (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a). Esta distribuição relativa das ORFs pelas sub-famílias, e a ausência de representante da sub-família ABCD, é semelhante à observada em *Toxoplasma gondii* (filo Apicomplexa tal como *P. falciparum*) um protozoário parasita intracelular, para o qual também não foi identificado representante para a sub-família ABCD (Sauvage *et al.*, 2006).

O número de genes codificantes de proteínas em *P. falciparum* (Carlton *et al.*, 2002) é comparável com o de organismos de vida livre como as leveduras, dado que em *Saccharomyces cerevisiae* estão identificadas 29 proteínas ABC (Decottignies & Goffeau, 1997) e em *Candida albicans*, 28 (Gaur *et al.*, 2005). É também comparável ao número de ABCs (24 genes) do protozoário (Gardner *et al.*, 2002a; Woods & Whitelaw, 2002) parasita intracelular *T. gondii* (Sauvage *et al.*, 2006).

Das 22 ORFs identificadas, 11 correspondem a proteínas transmembranares e as outras restantes proteínas solúveis.

**Sub-família ABCA (ou ABC1).** Os membros desta sub-família estão associados ao transporte de diversos compostos lipídicos e localizam-se na membrana plasmática (Cascorbi, 2006; Klein *et al.*, 1999b). Os transportadores ABCA são as proteínas ABC de maiores dimensões, ABCA13 de *H. sapiens* possui 5058 a.a. (Prades *et al.*, 2002), em *P. falciparum*, a única identificada, PfABCA1 foi também a proteína ABC identificada com maior número de a.a. 3133.

Os transportadores ABCA estão identificados em vertebrados, plantas, algas e bactérias. No parasita *T. gondii* e na levedura *S. cerevisiae* não se encontram identificadas sequências correspondentes a proteínas ABCA, tal como a ABCD atrás mencionados (Sauvage *et al.*, 2006; Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a). De uma maneira geral, nos organismos onde foi identificada esta sub-família inclui várias proteínas (Li *et al.*, 2007).

**Sub-família ABCB ou MDR/TAP.** A primeira proteína ABC a ser identificada foi o MDR1 humano, pelo facto de a sua expressão aumentada conferir um fenótipo de resistência a

múltiplos fármacos (reversível pelo verapamil) em células tumorais (Gottesman *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 1986; Dano, 1973).

A Pgh1 (MDR/TAP) foi a primeira proteína ABC a ser identificada em *P. falciparum*, por estar igualmente associada à resistência a múltiplos fármacos (reversível pelo verapamil) (Reed *et al.*, 2000b; Wellemes *et al.*, 1990). Para esta sub-família foram identificados 5 novos membros PfMDR3, PfMDR4, PfMDR5, PfMDR6, PfMDR7.

Em *P. falciparum* verificamos uma expansão da sub-família MDR/TAP de transportadores, em especial com domínios característicos de proteínas associadas à membrana mitocondrial e homeostase do Ferro. Das 22 ABCs identificadas, 11 (50%) possuem características compatíveis com funções de transporte, 7 das quais (31% do total) podem ser classificadas como pertencentes à sub-família MDR/TAP.

Das 7 MDR/TAP, apenas uma (PfMDR7), foi identificada como possuindo o domínio MsbA. Este foi inicialmente identificado no gene com o mesmo nome de *E. coli*, msbA (Karow & Georgopoulos, 1993), é caracteristicamente um transportador de açúcares, iões, péptidos, fosfolípidos e moléculas mais complexas (como lipopolissacaridos e substâncias bactericidas em bactérias) e localiza-se ao nível da membrana plasmática (Buchaklian & Klug, 2006; Zhou *et al.*, 2001; Allikmets *et al.*, 1993).

Nas restantes 6 sequências MDR/TAP de *P. falciparum*, foram identificados domínios de associação com a membrana mitocondrial e homeostase do Ferro. Em duas delas, PfMDR2 e PfMDR6, foi identificado o domínio ATM1. Recentemente, verificou-se que a presença de um codão *stop* no gene *pfmdr2* (codifica o transportador PfMDR2 de *P. falciparum*), (Rosenberg *et al.*, 2006) de um clone (FCR3) sensível a metais pesados (nomeadamente o Cádmio), originava uma proteína 188 a.a. mais pequena do que no clone resistente (Rosenberg *et al.*, 2006). Não se conhece nenhuma função fisiológica para o metal pesado Cádmio, no entanto estão identificados diversos mecanismos em diferentes organismos que permitem destoxificar este metal (Silver & Phung le, 2005; Broeks *et al.*, 1996; Szczyпка *et al.*, 1994; Papadopoulou *et al.*, 1994).

Em diferentes organismos (leveduras, invertebrados e vertebrados incluindo humanos) as proteínas que possuem este domínio, localizam-se na membrana mitocôndrial (Leighton & Schatz, 1995) e transportam precursores das proteínas de Fe/S da mitocôndria para o citoplasma (Kispal *et al.*, 1999; Kispal *et al.*, 1997). Em concordância está o facto de as 19 proteínas, caracterizadas funcionalmente em distintos organismos, com as quais PfMDR2 apresenta maior semelhança, possuírem localização na membrana mitocôndrial e função

associada ao metabolismo das proteínas de Fe/S. A localização sub-celular de PfMDR2 em *P. falciparum* está descrita na membrana plasmática e na membrana do vacúolo digestivo (Rubio & Cowman, 1994; Zalis *et al.*, 1993). No estudo de Rosemberg e colaboradores (Rosenberg *et al.*, 2006), não foi detectada acumulação de Cádmiio no vacúolo digestivo do parasita, como se esperava por analogia com as funções de HMT1 e AMT1 (proteínas semelhantes a PfMRP2) de *S. pombe*. Em *S. pombe* o transportador HMT1 é também responsável pela resistência desta levedura ao stress oxidativo (Iwaki *et al.*, 2005).

O domínio MTABC3 (*mammalian mitochondrial ABC protein 3*) (Mitsuhashi *et al.*, 2000) foi identificado em 4 ORFs de *P. falciparum*. Em mamíferos as proteínas que possuem este domínio localizam-se na membrana mitocondrial e são responsáveis pela homeostase do Fe, impedindo acumulação deste metal na mitocôndria (movimento intracelular de porfirinas) (Krishnamurthy *et al.*, 2006). Pgh1, a qual contem dois domínios MTABC3, tem vindo a ser associada à resistência a diversos antimaláricos, quer pela presença de mutações pontuais quer por aumento do número de cópias do gene (Valderramos & Fidock, 2006; Nelson *et al.*, 2005a; Price *et al.*, 2004). A localização na membrana mitocondrial, embora seja uma característica destes transportadores, Pgh1 também pode ser detectada na membrana do vacúolo de *P. falciparum* (van Es *et al.*, 1994b; Cowman, 1991b).

As proteínas que possuem os domínios MsbA, ATM1 e MTABC3 (7 em *P. falciparum*), estão associadas ao transporte de péptidos, precursores de proteínas de Fe-S ou na homeostase do Fe. Assim a expansão desta sub-família em *P. falciparum* é coerente com o facto de a principal fonte de a.a. do parasita (nos estadios intra-eritrocitários), ser a hemoglobina proveniente do hospedeiro (Becker *et al.*, 2004b; Muller, 2003b; Simoes *et al.*, 1992c; Hunt & Stocker, 1990a).

**A sub-família ABCE.** Para esta sub-família apenas se identificou um gene. Em mamíferos os RLI inibem a actividade 2',5'-da RNase L, uma RNase estimulada pelo interferão e com um papel determinante no *turnover* do mRNA<sup>58</sup> celular (Bisbal *et al.*, 1995). Em leveduras conhece-se apenas um RLI (Decottignies & Goffeau, 1997), em *A. thaliana* estão identificados 2 genes codificantes destas proteínas (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a). As funções em leveduras e plantas apenas são inferidas pelo elevado grau de semelhança com

---

<sup>58</sup> A degradação do mRNA eucariótico, tem um papel crucial na modulação da expressão génica no control de qualidade da biogénese de mRNA e na defesa antiviral (Parker & Song, 2004).

as proteínas de mamíferos, nomeadamente de *H. sapiens*, admitimos que em *P. falciparum* a sua função seja também idêntica.

**A sub-família ABCF ou GCN20.** Em *P. falciparum* já estava identificado um membro desta sub-família, a PfGCN20 (Bozdech *et al.*, 1998). Dados experimentais suportam a possibilidade de esta proteína ter as seguintes funções: componente do complexo de controlo da tradução, sub-unidade de ligação ao ATP de um transportador multimérico ou actuar como uma enzima *chaperon* na transferência de proteínas através das diversas estruturas membranares no eritrócito infectado (Bozdech & Schurr, 1999). Ao nível da sequência de a.a.<sup>59</sup> é idêntica a GCN20 de *S. cerevisiae* e *A. thaliana*, e a ABCF3 de murganho, homem e orangotango. Nestes organismos, a função desta proteína está relacionada a com a activação do factor eucariótico de iniciação (eIF2) que controla a iniciação da tradução (Tyzack *et al.*, 2000; Marton *et al.*, 1997; Vazquez *et al.*, 1994).

A outra proteína da sub-família ABCF, a PfABCF1 identificada na nossa análise, possui elevado grau de semelhança com as proteínas Uup de organismos procarióticos<sup>60</sup> como Uup1 e Uup2 de *Haemophilus influenzae* e Uup de *Escherichia coli*. Em *E. coli* a proteína Uup tem como função ligar-se ao DNA e mediar a excisão precisa de transposões (Murat *et al.*, 2006; Reddy & Gowrishankar, 2000; Reddy & Gowrishankar, 1997).

**A sub-família ABCG (White).** As proteínas do tipo *White* possuem uma topologia molecular pouco frequente, com o NBD numa posição N-proximal em relação à região transmembranar (NBD-TMD), esta característica foi identificada em PfABCG1.

As proteínas desta sub-família localizam-se na membrana plasmática e na maioria dos organismos encontram-se associadas à regulação dos mecanismos de transporte de lípidos e à resistência pleiotrópica a fármacos (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001b; Klein *et al.*, 1999b). Em humanos encontram-se identificadas duas proteínas ABCG, a ABCG1 e a ABCG2 (Miyake *et al.*, 1999a; Allikmets *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 1998; Croop *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996). Está largamente documentada a associação de ABCG2 a fenótipos de resistência à quimioterapia com mitoxantrona, daunorubicina, doxorubicina ou antifolatos, o que indica um fenótipo de resistência múltipla (Tamura *et al.*, 2007; Breedveld *et al.*, 2007; Fetsch *et*

---

<sup>59</sup> As 5 proteínas mais semelhantes por ordem decrescente de identidade são: GCN20 de *A. thaliana*, a ABCF3 de *M. musculus*, *H. sapiens* e *P. pigmaeus* e GCN20 de *S. cerevisiae*.

<sup>60</sup> As 5 proteínas mais semelhantes por ordem decrescente de identidade são: Uup1 de *H. influenzae*, uup de *E. coli*, Uup2 de *H. influenzae*, ZNUC de *Wolbachia* endossimbionte de *Brugia malayi* YDIF de *Bacillus subtilis* e CBIO2 de *Treponema denticola*.

*al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 1998). A proteína ABCG2 em conjunto com proteínas da sub-família ABCC (MRP/CFTR) está associada à resistência ao antifolato metotrexato, o qual actua bloqueando os enzimas dihidrofolato reductase/timidilato sintetase (Assaraf, 2007; Assaraf, 2006). A resistência de *P. falciparum* à combinação sulfadoxina/pirimetamina, resulta da acumulação sequencial de mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*, os quais codificam as enzimas dihidrofolato reductase/timidilato sintetase e dihidropteroato sintetase, respectivamente (Gatton & Cheng, 2006; Wernsdorfer & Noedl, 2003b; Talisuna *et al.*, 2003b; Kublin *et al.*, 2002; Doumbo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1997). A combinação das mutações necessárias (em ambos os genes) para que ocorra falência terapêutica, não são necessariamente as mesmas em todas as regiões geográficas em que se verifica resistência a esta combinação terapêutica (Djaman *et al.*, 2007; McCollum *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2006). Assim é provável que mutações em outros genes contribuam para a resposta de *P. falciparum* aos antifolatos como ocorre em células tumorais humanas.

**Sub-família ABCC ou MRP/CFTR.** Em *P. falciparum* identificámos dois transportadores da sub-família ABCC, PfMRP1 e PfMRP2. A comparação das sequências destes transportadores com outras proteínas, separadamente, revelou que as 100 mais semelhantes, com cada uma delas, pertenciam à sub-família ABCC. Em humanos, leveduras e plantas os membros da sub-família ABCC exportam substratos estruturalmente muito distintos como fármacos, compostos diversos conjugados com glutatião (X-GSH), glutatião oxidado (GSSG) e conferem resistência a vários compostos citotóxicos, quer por aumento de expressão, quer devido à presença de mutações (Assaraf, 2007; Assaraf, 2006; McKeegan *et al.*, 2004; Dean & Allikmets, 2001b).

PfMRP1 de *P. falciparum* possui (aparentemente) uma topologia molecular típica da sub-família ABCC TMD0 +(TMD–NBD)<sub>2</sub>. Esta é a estrutura que pode ser encontrada nos MRP1, MRP2, MRP3 e MRP7 humanos (Borst & Genest, 2006). Este domínio transmembranar N-terminal (TMD0), aparentemente não é essencial para a função de transporte (Borst & Elferink, 2002b; Bakos *et al.*, 2000). A comparação de PfMRP1 de *P. falciparum* com proteínas de outros organismos (Tabela III.2), revelou que as 6 proteínas mais semelhantes, possuem TMD0. Da referida listagem de sequências semelhantes, as 92

proteínas com maior grau de semelhança com PfMRP1 estão classificadas como sendo da sub-família MRP/CFTR do grupo MRP (MRP - *Multidrug Resistance Associated Protein*).

Para PfMRP2, a análise de hidrofobicidade que realizámos não indica que o segmento transmembranar TMD0 esteja presente. Esta observação está de acordo com o que ocorre em MRP4 (ABCC4) e MRP5 (ABCC5) de humanos, nos quais TMD0 está ausente (Borst & Elferink, 2002b). Das 57 proteínas mais semelhantes a PfMRP2, 34 estão classificadas como CFTR (CFTR - *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). A comparação de PfMRP2 com proteínas de outros organismos (Tabela III.2), revelou que esta proteína possui uma topologia mais próxima à dos transportadores ABCC do tipo CFTR, que não possuem TMD0 (Tusnady *et al.*, 2006).

**Sub-família SMC.** Uma das sub-famílias mais recentes de proteínas ABC são as SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) (Cobbe & Heck, 2006; Lowe *et al.*, 2001; Saitoh *et al.*, 1994). Em termos estruturais são dímeros, em forma de V composta por dois braços, em cujas extremidades se localizam os domínios de ligação ao ATP (Hirano, 2005). São proteínas essenciais na manutenção da estrutura dos cromossomas, durante a replicação e segregação dos cromátídeos em todos os organismos (Harvey *et al.*, 2002). Em bactérias, leveduras, *Caenorhabditis elegans* e vertebrados, as SMC possuem os seguintes domínios característicos das proteínas ABC, *Walker A* e *Walker B* mas não uma assinatura ABC típica, pelo contrário em *P. falciparum*, foram identificados o *Walker A*, *Walker B* e uma assinatura ABC, tal como nas proteínas de *H. sapiens* e *A. thaliana* (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001a).

Os genomas eucarióticos codificam pelo menos seis SMC (Hirano, 2005; Cobbe & Heck, 2004a; Cobbe & Heck, 2000). Em termos funcionais cada proteína tem uma outra com quem forma (especificamente) um heterodímero. Em *H. sapiens* o heterodímero SMC2+SMC3 actua como núcleo do complexo de condensação e segregação dos cromossomas (Hirano, 2005; Sutani *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 1997; Hirano & Mitchison, 1994; Nakamura *et al.*, 1994), SMC1+SMC4 forma o núcleo do complexo que mantém a coesão entre os cromátídeos (Losada *et al.*, 1998; Michaelis *et al.*, 1997; Guacci *et al.*, 1997) e SMC5+SMC6 está associado à reparação de DNA e resposta de *checkpoint* (Taylor *et al.*, 2001; Fousteri & Lehmann, 2000). As sequências das proteínas que formam cada heterodímero, têm maior semelhança entre si do que com as outras SMC (Schmiesing *et al.*,



1998). Atendendo ao grau de semelhança entre as SMC de *P. falciparum* e cada uma das sequências de *H. sapiens*, é previsível que a associação em dímeros do parasita seja idêntica e da seguinte forma: PfSMC1 + PfSMC4, PfSMC2 + PfSMC3 e PfSMC5 + PfSMC6 e que as funções sejam também conservadas.

**Sub-família NAP** (*Non-intrinsic ABC Proteins*). À semelhança de outros autores (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001b), classificamos as restantes proteínas ABC, num grupo heterogéneo de duas sequências PfYcf16 e PfCbiO, que designamos NAP.

*P. falciparum* possui um organelo multi-membranar, vestigial, denominado apicoplasto (Kohler *et al.*, 1997; McFadden & Waller, 1997), muito provavelmente o que resta de uma relação endossimbiótica com uma cianobactéria (Fast *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 1994).

Uma das proteínas codificadas pelo genoma do apicoplasto, anteriormente designada por ORF470 (Law *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1996), corresponde aos ortólogos Ycf24 do plastídeo de cianobactérias (Williamson *et al.*, 1994) à sufB de bactérias (Ellis *et al.*, 2001) e AtNAP1 de *A. thaliana* (Rangachari *et al.*, 2002). Ellis e colaboradores (Ellis *et al.*, 2001) referem Ycf24 como sendo um transportador ABC regulado pelo Fe. Na nossa análise não foram detectadas características de proteínas da família ABC em Ycf24 (CAA64569).

No genoma nuclear de *P. falciparum* identificamos PfYcf16, um ortólogo de sufC, com uma sequência de direccionamento para o apicoplasto.

Em cianobactérias, bactérias (Rangachari *et al.*, 2002; Nachin *et al.*, 2001; Patzer & Hantke, 1999) e *A. thaliana* (Ellis *et al.*, 2001) os produtos dos genes *sufC* (sufC) estão envolvidos na homeostase do Ferro, na resposta ao stress oxidativo e na regulação da biogénese das proteínas de Fe-S (Nachin *et al.*, 2001; Patzer & Hantke, 1999). Atendendo ao facto de que *P. falciparum* se desenvolve num ambiente rico em Fe e consequentemente está sujeito a condições de stress oxidativo, é previsível que as funções de PfYcf16 sejam idênticas às atribuídas às proteínas sufC acima descritas.

CbiO é o componente de ligação ao ATP do complexo multiproteico CbiMNQO, responsável pelo transporte de Cobalto em bactérias e fungos (Giel *et al.*, 2006; Eitinger *et al.*, 2005; Degen *et al.*, 1999). Em *P. falciparum* identificamos uma sequência com o domínio CbiO, a qual designamos PfCbiO. Sabendo que diferentes derivados da

cobalamina<sup>61</sup> possuem efeito antimalárico por interferirem com a formação da hemozoína (Chemaly *et al.*, 2007) e que, ao contrário do hospedeiro humano, o plasmódio apenas possui uma enzima, a metionina sintetase, que usa cobalamina como cofactor, (Krungkrai *et al.*, 1989) parece interessante o estudo da PfCbiO na exploração de novos compostos antimaláricos.

### **IV.2 - Associação dos polimorfismos dos genes *pfy-gcs*, *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2* e a resposta *in vitro* de isolados de *P. falciparum* aos fármacos cloroquina, mefloquina, amodiaquina e quinino.**

As várias estratégias de controlo da malária, têm sido fortemente comprometidas pelo aparecimento de resistência parasitária actualmente disseminada por praticamente todas as áreas onde a malária é endémica (Wernsdorfer & Noedl, 2003b; Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

Dos principais antimaláricos existentes para o tratamento de infecções por *P. falciparum* tornou-se especialmente preocupante a resistência à cloroquina (CQ) e à mefloquina (Wongsrichanalai *et al.*, 2002), tendo em alguns locais sido substituído o seu uso como mono terapia para tratamento de malária por *P. falciparum* pela O.M.S. em 2006/7. Como agravante, em muitas das áreas endémicas. *P. falciparum* apresenta fenótipos de menor susceptibilidade a estes dois ou mais fármacos, um fenómeno conhecido por MDR (*multi-drug resistance*), limitando em muito a escolha dos antimaláricos para os programas terapêuticos utilizados. O reduzido conhecimento sobre os mecanismos da resistência aos antimaláricos, da classe das quinoleínas, constitui um dos maiores desafios para a investigação em malária, entre eles a identificação de marcadores moleculares de vigilância epidemiológica de resistência, assim como a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de antimaláricos alternativos (Mita *et al.*, 2003; Basco & Ringwald, 2001; Cowman & Cooke, 2000).

Efectuámos estudos de susceptibilidade *in vitro* aos antimaláricos CQ, mefloquina, quinino e amodiaquina, em isolados provenientes de áreas endémicas distintas, São Tomé e Príncipe (STP), Angola e Tailândia. Os estudos *in vitro*, têm como principal benefício contribuir para

---

<sup>61</sup> A cobalamina (vitamina B12) contém cobalto.

a identificação de marcadores moleculares de resistência e para a vigilância da susceptibilidade das populações de *P. falciparum* prevalentes em determinada área geográfica, antes de surgir resistência *in vivo* (Wongsrichanalai *et al.*, 2002). A capacidade predictiva da resposta a um determinado fármacos pode diminuir o risco de falência terapêutica, direccionando a escolha do agente antimalárico mais apropriado (Maguire *et al.*, 2001), reduzindo a exposição a terapêuticas ineficazes (Maguire *et al.*, 2001).

Foram investigadas potenciais relações entre estes fenótipos e os seguintes polimorfismos: alterações pontuais nos genes *pfmrp1* (H191Y, S347A e I1390F) e *pfmrp2* (D631G), inserções/deleções nos genes *pfmrp2* (ao nível dos codões 779, 1947 e 3591) e *pfy-gcs* (ao nível do codão 1542) e a alteração do número de cópias dos genes *pfmrp1*, *pfmrp2* e *pfmdr1*.

### **a) Prevalência da resistência *in vitro* de isolados de *P. falciparum* a antimaláricos**

**Tailândia.** O estudo da prevalência da resistência *in vitro* a antimaláricos aqui realizado incluiu quatro fármacos da classe das quinoleínas, a cloroquina (CQ), a amodiaquina (AMQ), a mefloquina (MEF) e o quinino (QN), tendo estes resultados sido publicados (Lopes *et al.*, 2002b).

Os resultados obtidos, pela análise dos isolados caracterizados neste estudo, traduzem-se numa elevada prevalência de resistência à CQ (96%), o que coincide com a prevalência reportada em estudos prévios (White, 1998). Nesta área endémica a MEF e a AMQ também perderam a sua eficácia, revelada neste estudo pela prevalência de resistência *in vitro* a estes fármacos de 62% e 58%, respectivamente. A elevada prevalência de resistência à MEF é comum nesta área endémica, e o nível de resistência à AMQ também era esperada, considerando que em zonas onde se verificam elevados níveis de resistência à CQ, a eficácia da AMQ tende a ser afectada (Ochong *et al.*, 2003b; van den Broek *et al.*, 2003). Na amostra de parasitas estudados verificou-se 100% de susceptibilidade ao QN, o que demonstrou que este antimalárico, apesar dos seus efeitos secundários adversos, ainda pode ser utilizado como recurso na terapia da malária nesta região.

Nesta área endémica é frequente o fenótipo de multi-resistência, que neste estudo correspondeu a 48% dos isolados resistentes à CQ + MEF, 52% resistentes à CQ + AMQ e

23% resistentes aos fármacos CQ + MEF + AMQ. Este facto, evidencia a importância deste tipo de estudos na escolha do fármaco mais adequado, para utilização em combinações terapêuticas, nomeadamente com derivados da artemisinina (Noedl *et al.*, 2007; Ashley *et al.*, 2006; Hutagalung *et al.*, 2005).

**São Tomé e Príncipe.** A CQ foi o único fármaco estudado nesta região. Os resultados obtidos demonstram uma prevalência da resistência *in vitro* de *P. falciparum* a este antimalárico, na ordem dos 92% (Lopes *et al.*, 2002a). Apesar de ser uma prevalência muito elevada é consistente com os resultados obtidos num estudo idêntico realizado nesta área endémica em 1994, onde foi determinada uma prevalência de resistência *in vitro* à CQ de cerca de 90% (Loureiro *et al.*, 1996). A utilização de combinações terapêuticas de CQ com derivados de artemisinina (nomeadamente artesunato), têm fornecido evidências que corroboram os elevados níveis de resistência à CQ e a necessidade de abandonar este antimalárico (em mono terapia) para tratamento de malária, nesta região (Ferreira *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2003).

**Angola.** Em Angola mais concretamente Luanda, foi estudada susceptibilidade *in vitro* a antimaláricos: a cloroquina (CQ), a mefloquina (MEF) e o quinino (QN). Não existem dados recentes sobre Angola, no entanto já em 1984, o fenómeno de resistência *in vivo* à CQ de *P. falciparum* em Luanda apresentava prevalências elevadas, 61% (Suleimanov, 1994). No presente estudo foi determinada uma prevalência de resistência *in vitro* à CQ de 96%, à MEF de 34% e ao QN de 33%. Tendo em consideração que dos indivíduos incluídos neste estudo, 82% tinham idades compreendidas entre 0 e 5 anos (a contribuição do sistema imunitário do hospedeiro para o combate à infecção é menor que nos adultos), os resultados obtidos *in vitro* poderão corresponder também, a uma menor susceptibilidade à terapêutica *in vivo*. No que respeita ao QN os resultados obtidos podem reflectir uma tendência para a diminuição da susceptibilidade *in vivo* ao fármaco, observação concordante com outros autores (Noedl *et al.*, 2007).

### **b) Associação das alterações pontuais nos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* (D631G) e a resposta *in vitro* de isolados de *P. falciparum***

***pfmrp1*.** No decorrer do presente trabalho identificámos por sequenciação, quatro alterações pontuais (*H191Y*, *S347A* *V876I* e *I1390F*) no gene *pfmrp1*, todas se traduzem em alteração

do a.a. codificado. Mu e colaboradores (2003), num estudo que incluiu 49 genes codificantes de possíveis transportadores em *P. falciparum*, identificaram também os polimorfismos *H191Y*, *S347A*. O referido trabalho avalia a existência de correlação entre a diminuição de sensibilidade à cloroquina (CQ) e ao quinino (QN) e estes polimorfismos, em amostras adaptadas a cultura provenientes da Ásia e América do Sul. Concluem que existe uma correlação fraca entre *191Y* e a resposta à CQ na Ásia e ao QN na América do Sul. No que respeita a *347A*, concluem que apenas existe uma fraca correlação com a resposta à CQ e ao QN na América do Sul (Mu *et al.*, 2003).

No nosso estudo, apenas foi identificada correlação entre a resposta à mefloquina (MEF), dos isolados provenientes da Tailândia e os polimorfismos *191Y* ( $P = 0,013$ ) e *347A* ( $P = 0,047$ ), não se tendo observado esta correlação nos isolados provenientes de África (Angola). No que respeita aos antimaláricos CQ, QN e amodiaquina (AMQ) não encontramos qualquer associação entre os polimorfismos e a resposta a estes antimaláricos. Estes resultados estão em concordância com resultados obtidos em estudos recentes com amostras provenientes da Tailândia (Anderson *et al.*, 2005), em que não foi observada a existência de correlação entre *H191Y* e *S347A* e a resposta à CQ, MEF, CQ e AMQ. Ainda em isolados provenientes de diferentes Países Africanos Cojean e colaboradores também não observaram correlação entre *H191Y* e *S347A* e a resposta à CQ (Cojean *et al.*, 2006). No que se refere ao polimorfismo *I1390F* não foi observada correlação com nenhum dos antimaláricos nas 3 regiões estudadas.

***pfmrp2***. Para este gene, identificámos oito alterações pontuais na sequência. Duas alterações pontuais são sinónimas, as restantes seis alteram o a.a. codificado. Apenas foi avaliada a existência de correlação entre a presença do polimorfismo *D631G* e a resposta aos antimaláricos dos isolados provenientes das 3 regiões em estudo. Não tendo sido encontrada qualquer associação entre este polimorfismo e a resposta aos fármacos.

Recentemente foi observado que mutações silenciosas (sinónimas) no gene que codifica o MDR1 humano, alteram a conformação da proteína codificada (P-glicoproteína, sub-família MDR/TAP de transportadores ABC) e conseqüentemente a afinidade desta para alguns substratos transportados (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). As alterações da cinética da tradução do mRNA (causada pelo movimento mais lento ou mais rápido do ribossoma por determinada região do mRNA) pode produzir uma proteína com conformação diferente

(Yaman *et al.*, 2003). Estas alterações da cinética de tradução, podem ter origem nas referidas mutações sinónimas (Komar, 2007). Estas evidências recentes justificam um estudo mais alargado da associação das mutações pontuais sinónimas identificadas em *pfmrp2* com a resposta de *P. falciparum* aos antimaláricos.

### **c) Associação das inserções/deleções no gene *pfy-gcs* e *pfmrp2* e a resposta *in vitro* de isolados de *P. falciparum***

***pfy-gcs*.** A enzima  $\gamma$ -GCS catalisa o passo limitante da via biossintética do glutatião. Esta, contém uma inserção ao nível do a.a. 514 que varia em número de a.a. entre 94 e 239 (Luersen *et al.*, 2000; Luersen *et al.*, 1999). A relação entre a variação de tamanho e a função da proteína não está estabelecida, assim fomos determinar a existência de relação entre o tamanho da proteína codificada pelo gene *pfy-gcs* (número de repetições da sequência YQSNLQQQ) e a resposta aos fármacos nos isolados provenientes de STP, Angola e Tailândia. não foi encontrada correlação entre o número de repetições e a resposta aos fármacos.

***pfmrp2*.** No gene *pfmrp2*, no decorrer do presente trabalho, foram identificadas três inserções/deleções. Estas não resultam em alteração da grelha de leitura e correspondem a variações do número de repetições de determinada sequência. Nos mesmos isolados provenientes da Tailândia foi detectada correlação entre a resposta à mefloquina (MEF) e a presença de apenas 1 repetição da sequência NDQNEQ no codão 779 ( $p=0,001$ ) e a presença de 8 repetições da sequência DNNN no codão 3591 ( $p<0,001$ ). No que se refere à repetição da NDYVDDYV no codão 1947 não foi observada correlação com nenhum dos antimaláricos nas 3 regiões estudadas.

Em *Plasmodium spp.* as proteínas apresentam uma maior incidência de regiões de baixa complexidade, ricas em asparaginas (N), esta característica é marcadamente distinta da maioria dos eucariotas. Na maior parte dos organismos eucarióticos estudados até à data, as regiões de baixa complexidade, localizam-se ao nível dos factores de transcrição em proteínas nucleares e algumas proteínas do citoesqueleto (DePristo *et al.*, 2006). Pelo contrário *Plasmodium spp.*, contém regiões de baixa complexidade em diversas proteínas. Neste organismo estas regiões (que podem variar de 10 até 100 a.a.) invadem mesmo

domínios globulares com funções catalíticas conservadas (DePristo *et al.*, 2006), ao contrário da maioria dos eucariotas, em que as regiões de baixa complexidade se localizam maioritariamente fora das regiões globulares (Pizzi & Frontali, 2001). Em concordância com estas observações, está o facto de em *pfmrp2* termos detectado uma sequência de repetições de asparaginas de cerca de 61 a.a. ( $\approx 60\%$  N; ANEXO 9) NBD1 entre a assinatura ABC e o *WalkerB*, esta sequência inclui também um polimorfismo sinónimo *D1138D*.

Em *Plasmodium spp.* estas regiões não parecem interferir com as funções da proteína, como ocorre em outros eucariotas onde têm funções de interacção proteína-proteína (Liu & Matherly, 2002); no entanto face aos nossos resultados talvez se justifique um estudo mais alargado da associação destas repetições com a resposta a antimaláricos.

### **d) Associação do número de cópias dos genes *pfmdr1*, *pfmrp1* e *pfmrp2* e a resposta *in vitro* de isolados**

O número de cópias de genes codificantes de proteínas das sub-famílias MDR/TAP e MRP/CFTR encontra-se com frequência associado à resistência de alguns tipos de cancro aos citostáticos (Lang *et al.*, 2006; Albertson, 2006; Yasui *et al.*, 2004)

**A amplificação do gene *pfmdr1*.** Esta amplificação tem vindo a ser associada ao aumento da resistência de *P. falciparum* às quinoleínas, em especial à mefloquina (Sidhu *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2005b; Price *et al.*, 2004; Pickard *et al.*, 2003) e diminuição da sensibilidade *in vitro* ao artesunato (ART) (Price *et al.*, 2004). No mesmo estudo, o número de cópias de *pfmdr1* foi também associado ao risco de falência terapêutica com mefloquina em mono terapia e ao tratamento com a combinação MEF e ART (Price *et al.*, 2004). A maior probabilidade de recrudescência em casos de tratamento com MEF em mono terapia, foi também associada à presença de 2 ou mais cópias do gene *pfmdr1* (Nelson *et al.*, 2005c). No nosso trabalho foi detectada associação significativa ( $p=0,007$ ) entre a presença de 2 ou mais cópias do gene *pfmdr1* e a resistência *in vitro* à MEF na Tailândia, não se tendo verificado o mesmo para os restantes fármacos (CQ, QN e AMQ) testados nesta região. Recentemente outros autores também não detectaram correlação entre o número de cópias de *pfmdr1* e a resposta à AMQ *in vivo* em crianças do Quênia (Holmgren *et al.*, 2006).

Na Tailândia, os nossos resultados revelam que 87% dos isolados têm mais de 2 cópias do gene, o que está de acordo com os resultados de outro estudo para a mesma área geográfica, em que esta prevalência se situa nos 70% (Price *et al.*, 2004) e superior à obtida num estudo mais recente 55% (Nelson *et al.*, 2005c). Em Angola não se verificou associação do número de cópias de *pfmdr1* e a resposta *in vitro* de *P. falciparum* à CQ, MEF nem ao QN. A prevalência de isolados com 2 ou mais cópias do gene foi de 46% sendo este valor superior ao encontrado por Holmgren e colaboradores no Quênia, que referem que apenas 1 em 72 isolados possui 2 cópias do gene *pfmdr1* (Holmgren *et al.*, 2006) ou num estudo com isolados provenientes de STP em que não foi detectada amplificação do gene (Ferreira *et al.*, 2007).

**Número de cópias de *pfmrp1* e *pfmrp2*.** A amplificação dos genes codificantes de proteínas da sub-família MRP/CFTR tem vindo a ser associada ao aumento da resistência *in vitro* de algumas linhas celulares (derivadas de células neoplásicas) multiresistentes a fármacos citostáticos (Kohashi *et al.*, 2002; Kantharidis *et al.*, 2000; Krishnamachary *et al.*, 1994). No presente trabalho não verificámos aumento do número de cópias dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* nos clones 3D7 (sensível) nem Dd2 (multiresistente) e ambos possuem uma cópia de cada gene. Em todos os isolados provenientes das regiões estudadas não se detectou aumento do número de cópias destes genes.

### **IV.3 - Expressão dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2* e de genes codificantes de enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum* na presença e ausência de fármaco nos clones 3D7 e Dd2**

Em microrganismos como as leveduras ou *Escherichia coli*, a exposição a fontes de *stress* oxidativo produz uma resposta transcripcional do seu genoma relativamente bem descrita (Chen *et al.*, 2003; Pomposiello & Demple, 2002; Zheng *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2000). De forma idêntica, algumas células do sistema imunitário dos vertebrados e mesmo algumas plantas, aumentam a transcrição de mRNA durante agressões ambientais (ex. infecção por microrganismos); este aumento é transitório e a transcrição dos genes implicados regressa a níveis basais, uma vez removido o factor de stress (Gasch *et al.*, 2000). Esta resposta comum, denominada resposta ambiental ao stress, é caracterizada por aumento da transcrição de mRNA correspondente a genes de resposta ao stress oxidativo



(Kultz, 2005a).

Uma diferença notória, entre os referidos organismos e o *Plasmodium spp.*, refere-se à localização temporal do aumento do stress oxidativo, enquanto que em outros organismos o momento em que isto ocorre é variável (a transcrição do genoma responde à presença do oxidante). Em *Plasmodium spp.* o aumento do stress oxidativo está associado ao ciclo de vida do parasita, a produção de grandes quantidades de substâncias oxidantes (resultado da degradação da hemoglobina) ocorre num período relativamente previsível, depois da invasão do eritrócito pelo parasita. A principal fonte de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em *P. falciparum* durante os estadios intra-eritrocitários é a digestão da hemoglobina proveniente do hospedeiro, no vacúolo digestivo do parasita (Becker *et al.*, 2004c; Muller *et al.*, 2003; Simoes *et al.*, 1992a; Hunt & Stocker, 1990a). Os eritrócitos infectados com *P. falciparum* estão também submetidos a um stress oxidativo constante por ROS, gerados pela degradação da hemoglobina (Becker *et al.*, 2004c; Farombi *et al.*, 2003; Ginsburg & Atamna, 1994b; Atamna *et al.*, 1994) e espécies reactivas de nitrogénio (NOS) gerados pelo sistema imunitário do hospedeiro humano (Becker *et al.*, 2004c; Golenser *et al.*, 1992), em resposta à infecção.

Dado o aumento do stress oxidativo estar associado ao ciclo de vida do parasita, seria de esperar que as proteínas (enzimas) que participam na defesa antioxidante em *P. falciparum*, bem como os seus substratos (Crooke *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2003; Rahlfs *et al.*, 2002c; Kanzok *et al.*, 2000), estivessem presentes e funcionais, quando o parasita inicia a digestão da hemoglobina e o sistema imunitário do hospedeiro responde à presença de infecção eritrocitária (Bozdech & Ginsburg, 2004). Estes acontecimentos têm início após a invasão e crescimento inicial do parasita, primeiras 18-22 horas, em que a digestão da hemoglobina tem lugar, prolongando-se pelo estadio de trofozoíto (Rathore *et al.*, 2005a; Lew *et al.*, 2003; Fujioka & Aikawa, 2002). É também neste período que a composição das proteínas da superfície do eritrócito está suficientemente alterada para ser reconhecida como estranha pelo sistema imunitário do hospedeiro (Pouvelle *et al.*, 1994; Elmendorf & Haldar, 1994; Behari & Haldar, 1994; Ward *et al.*, 1993; Elmendorf & Haldar, 1993).

Neste estudo, a sincronização das culturas *in vitro* foi relevante para compreender a resposta dos genes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e à presença de fármaco. O estudo

exigiu implementação de metodologias que permitissem o estudo da expressão basal e em resposta à presença de fármaco, dos referidos genes.

**Sincronização das microculturas de parasitas dos clones 3D7 e Dd2, ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum*.** A sincronização manteve-se relativamente constante durante os períodos em que estes ensaios decorreram (mais de 85% de parasitas em sincronia, ou seja, em idêntico estadio de desenvolvimento). Embora esta percentagem de sincronização seja aceitável para este tipo de estudo, 15% dos parasitas estudados possuem diferença de desenvolvimento de  $\approx 6$ h, resultante do método de sincronização por sorbitol, período que deveremos ter em consideração aquando da interpretação dos resultados de expressão para cada gene.

No presente trabalho consideraremos que durante o ciclo intra-eritrocitária do parasita, os merozoítos sofrem diferenciação originando quatro estadios de desenvolvimento: anel (0-22 h após invasão), trofozoíto (22-34 h após invasão), esquizonte (34-42 h após invasão) e merozoíto (44-46 h após invasão). Observamos que o ciclo de vida de *P. falciparum in vitro*, não é de 48h mas sim 46h. Este resultado está de acordo com observações de outros autores, para o ciclo de vida de *P. falciparum in vitro* resultante de sincronização quer com sorbitol (idêntico ao nosso) quer sincronizado com temperatura (Llinas *et al.*, 2006a; Le Roch *et al.*, 2003b; Bozdech *et al.*, 2003).

### **IV.3.1. Correlação entre os perfis de expressão basal dos genes em 3D7 e Dd2 - estudo em condições normais de cultura**

O parasita da malária está directamente envolvido por 2 membranas no interior do eritrócito e vive num ambiente relativamente homeostático durante a maior parte do seu ciclo de vida intra-eritrocitário<sup>62</sup> (Brem *et al.*, 2002). Os parasitas em condições normais de cultura não parecem sofrer pressão ambiental significativa de forma a alterar a expressão de genes de resposta ao stress (Llinas *et al.*, 2006b; Daily *et al.*, 2005; Myrick *et al.*, 2003).

Na generalidade, no estudo efectuado com duas populações clonadas do depósito do CMDT/IHMT, a correlação de *Pearson* entre os perfis de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pfy-*

---

<sup>62</sup> Um estudo em que foram comparados os transcritos de *P. falciparum* de pacientes com malária e *P. falciparum* em culturas *in vitro*, as diferenças foram mínimas, sendo que em pacientes foram encontrados alguns transcritos que não tinham sido detectados *in vitro* (Daily *et al.*, 2005).

*gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-CysPx*, *pf6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* obtidos para os clones 3D7 e Dd2 de *P. falciparum* foi aceitável para todos os genes excepto para *pfy-gcs* e *pf2-CysPx*, o que contribui para reforçar a hipótese de que as determinações efectuadas reflectem condições biológicas. A diferença entre os perfis de *pf2-CysPx* dos dois clones para este gene reside no facto de em 3D7 o aumento de expressão ser mais rapidamente detectável, ou seja, dá-se mais cedo que em Dd2, enquanto que nestes parasitas, resistentes a vários fármacos, parece ser mais gradual (Figura 12 e Figura 13). Estes resultados estão concordantes com os dados obtidos para Dd2 e 3D7 por *microarrays* (Llinas *et al.*, 2006b; Bozdech *et al.*, 2003).

Foi calculada também a correlação de *Pearson* entre os valores obtidos no nosso estudo, e os valores determinados por outros autores (ANEXO 17) (Llinas *et al.*, 2006b; Bozdech *et al.*, 2003)<sup>63</sup> para cada gene e para os clones 3D7 e Dd2. Foi encontrada correlação positiva ( $p < 0,05$ ) dos genes *pfFe-sod*, *pfy-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pf2-CysPx*, *pfmrp1* e *pfmrp2* entre os nossos valores, e os resultados dos referidos autores (pelo menos para um dos clones). Para os genes *pftrxR* e *pf6pd* os valores de correlação não foram aceitáveis. O facto de nem sempre existir correlação entre os perfis pode prender-se com metodologias distintas, nomeadamente os intervalos de colheita (2h no nosso estudo e 1h com outros autores) ou ainda pelo desfaseamento de desenvolvimento de  $\approx 6$ hrs, resultante do método de sincronização por sorbitol. A ausência de correlação foi observada também entre os valores dos referidos autores (ex. *pfgpx* e *pf6pd* ANEXO 17). Este resultado demonstra que a metodologia de estudo, o processo de sincronização da cultura, a própria purificação desta como população clonal deve ser melhor avaliada.

**Regulação da expressão dos genes ao longo do ciclo intra-eritrocitário.** Em termos de regulação da expressão, em condições normais de cultura, verificou-se que a amplitude de variação (*Nfold*<sup>64</sup>) da expressão dos genes ao longo do ciclo intra-eritrocitário de 3D7 (clone sensível) é maior do que a observada em Dd2 (clone resistente). De uma forma geral, a variação da amplitude (no sentido da diferença entre máximo e mínimo de expressão) obtida para os genes relativos aos sistemas do glutatião e da tioredoxina, é comparável à dos genes implicados em funções metabólicas fundamentais como a glicólise ou a síntese de ácidos

---

<sup>63</sup> Valores obtidos por *microarrays* para os clones Dd2 e 3D7 por Llinas e colaboradores (Llinas *et al.*, 2006b) e para o clone HB3 por Bozdech e colaboradores (Bozdech *et al.*, 2003).

<sup>64</sup> *Nfold* foi determinado segundo a equação  $Nfold = 2^{-(CT_{alvo} - CT_{contolo\ interno})\chi - (CT_{alvo} - CT_{contolo\ interno})\gamma}$  onde  $\chi$  amostra tratada com cloroquina (IC50) e  $\gamma$  amostra não tratada.

nucleicos (em que amplificação varia entre 5 e 10 vezes no ciclo) (Bozdech & Ginsburg, 2004). Este intervalo é excedido pelos genes previsivelmente envolvidos em transporte *pfmrp1* e *pfmrp2*. Embora no clone Dd2 os valores de amplitude nem sempre atingem os valores obtidos nos parasitas sensíveis 3D7, a tendência é idêntica. Observamos regulação entre estádios para todos os genes e em ambos os clones (Figura III.14 e Figura III.15), excepto para *pfg6pd*.

No caso do gene da **glucose-6-fosfato desidrogenase**, *pfg6pd* observamos uma alteração de expressão do gene superior a *Nfold* >1,5 vezes; no entanto os valores de *p* da análise de variância, ANOVA excedem o limite do valor para *p* (3D7 *p*=0,059; Dd2 *p*=0,92) estipulado (*p*<0,05) nos critérios pré-definidos para considerar um gene regulado. Esta observação é consistente com a função biológica de gene *housekeeping* atribuída a este gene (Calvo *et al.*, 2002). Verifica-se também a alteração de expressão de *Nfold* >1,5, corroborando um comportamento de expressão não convencional de alguns genes *housekeeping* em *P. falciparum* entre os quais se encontra *pfg6pd* (Calvo *et al.*, 2002).

Em outros organismos e diferentes tecidos a expressão deste gene pode ser modulada por estímulos externos, nomeadamente nutrientes e stress oxidativo (Kletzien *et al.*, 1994). Admitimos, por analogia, que estas observações justifiquem o perfil de expressão deste gene ao longo do ciclo intra-eritrocitário de *P. falciparum* detectada no nosso trabalho.

Em *Plasmodium spp.* o anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sup>65</sup> é produzido durante a digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo, sendo considerado a principal fonte de ROS neste parasita (Becker *et al.*, 2004c; Atamna & Ginsburg, 1993). A maior parte do O<sub>2</sub><sup>-</sup> (gerado neste processo), sofre dismutação espontânea até H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que difunde parcialmente para o citoplasma do parasita. Aqui sofre dismutação para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela acção da superóxido dismutase citoplasmática (Fe-SOD codificada pelo gene *pfFe-sod*) (Becuwe *et al.*, 1996), dado este parasita não possuir catalase (Dive *et al.*, 2003; Becuwe *et al.*, 1996).

Os nossos resultados indicam que a amplitude de expressão de *pfFe-sod* é maior a partir das 30/32h após invasão (fases de trofozoíto e esquizonte; Figura 12 e Figura 13). Estes dados são consistentes com os dados obtidos por *microarrays* (Llinas *et al.*, 2006a; Bozdech *et al.*, 2003). Em Dd2, durante a fase de anel verifica-se um comportamento errático da tendência da expressão (Figura 13).

---

<sup>65</sup> O anião super óxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) é considerado a espécie reactiva de oxigénio (ROS), com maior capacidade oxidativa intracelular.

Em *P. falciparum* estão identificadas outras fontes de  $O_2^-$ , nomeadamente; o metabolismo mitocondrial (Bozdech & Ginsburg, 2004), o metabolismo do retículo endoplasmático, a produção de piridoxal-fosfato<sup>66</sup> (cujo máximo é atingido às 18h do ciclo (Bozdech *et al.*, 2003), a acção da dehidrorotato desidrogenase (Krungskrai *et al.*, 1991; Gero *et al.*, 1984) cujo máximos é atingido às 20h do ciclo (Bozdech *et al.*, 2003), ou por fontes externas como os macrófagos do hospedeiro, em resposta à infecção (Turrini *et al.*, 1992). Assim espera-se que o parasita esteja equipado nesta fase inicial do ciclo de vida, com mecanismos de resposta ao stress oxidativo gerado por fontes de  $O_2^-$  para além da degradação da hemoglobina (a qual se inicia na fase final de anel, e prossegue pelas fases de trofozoíto e esquizonte jovem).

De uma maneira geral o parasita lida com esta ameaça inicial aumentando a expressão das peroxidases dependentes de glutatião e tioredoxina, como glutatião peroxidase (PfGPX, codificada pelo gene *pfgpx*), 2-Cys peroxiredoxina (Pf2-CysPx, codificada pelo gene *2-CysPx*) e a glutatião S-transferase (PfGST, codificada pelo gene *pfgst*) (Bozdech & Ginsburg, 2004).

As proteínas superoxidodismutases (SODs), tioredoxina (ou enzimas que desta dependem ex. TrxR, PfGPX), as peroxiredoxinas (ex. Pf2-CysPX) e a glutatião reductase (GR), fazem parte do proteoma mínimo<sup>67</sup> de resposta celular ao stress oxidativo em qualquer célula (Kultz, 2005a; Kultz, 2003a).

A cloroquina aumenta os níveis de stress oxidativo (Pari & Murugan, 2006; Paraje *et al.*, 2005; Vanoni *et al.*, 2004; Murugavel & Pari, 2004). No nosso trabalho observamos que os níveis de expressão do gene *pfFe-sod* em Dd2 são superiores aos verificados em 3D7 já na fase de anel (ANEXO 16). Dd2 é um clone resistente a múltiplos fármacos enquanto que 3D7 é sensível. Esta diferença de expressão de *pfFe-sod* parece consistente com a observação de que em células mais resistentes ao stress oxidativo, as SODs são as proteínas de resposta ao stress oxidativo, que se encontram expressas em níveis basais mais elevados, comparativamente com células menos tolerantes ao stress (Kultz, 2005b; Kultz, 2003b; Gelfand *et al.*, 2000). Em concordância estão também os nossos resultados relativos aos genes *pfgr*, *pfgpx* e *pf2-CysPx* os quais apresentam níveis de expressão basal mais elevados no clone Dd2 do que no clone 3D7, principalmente até às primeiras 30h do ciclo de vida, fase em que os anéis se diferenciam em trofozoítos. Na fase de anel, os parasitas do clone

---

<sup>66</sup> Piridoxal-fosfato forma activa da vitamina B6.

<sup>67</sup> Existe um proteoma mínimo de 44 proteínas, comum a animais, fungos, bactérias e archae que participa na resposta celular ao stress (Kultz, 2005a; Kultz, 2003a; Gelfand *et al.*, 2000).

3D7 apresentam menor amplitude de expressão dos genes *pfgr*, *pfgpx* e *pfFe-sod*, o que no contexto acima referido tornaria estes parasitas ainda mais vulneráveis ao stress oxidativo. No entanto admitimos que esta característica desfavorável seja compensada pelo marcado aumento na amplitude de expressão de *pf2-CysPx*<sup>68</sup>, que neste clone é mantida  $\approx 6$  a  $\approx 8$  *Nfold* durante o estadio de anel, enquanto que em Dd2 começa por ser de 1 *Nfold* e só atinge 4 *Nfold* às 22h.

**Transportadores de conjugados de glutatião.** O GSH é sintetizado pela P $\gamma$ -GCS é oxidado a GSSG pela PfGPX (Atamna & Ginsburg, 1997), ou conjugado com substâncias electrofílicas (tóxicas) pela PfGST e exportado para o citoplasma do eritrócito por bombas de efluxo designadas MRPs (proteínas ABC, da sub-família MRP/CFTR) (Becker *et al.*, 2003; Liebau *et al.*, 2002). Atendendo à sua provável função descrita acima os genes *pfmrp1* e *pfmrp2* identificados e caracterizados no decorrer deste trabalho, foram também estudados no contexto da resposta de *P. falciparum* ao stress oxidativo.

Existe uma diferença notória na amplitude de expressão dos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* entre ambos os clones. Em 3D7, a expressão do *pfmrp1* varia entre 1,5 e  $\approx 30$ , enquanto que em Dd2 varia entre 1 e  $\approx 5$ . A mesma tendência foi observada no gene *pfmrp2*: 3D7 - *Nfold* varia entre  $\approx 1,5$  e  $\approx 14$ ; Dd2 - *Nfold* varia entre  $\approx 1,5$  e  $\approx 4$ . Esta diferença de amplitude de expressão está de acordo com a tendência geral dos restantes genes estudados. A amplitude de expressão é maior em 3D7 do que em Dd2.

O aumento da transcrição de *pfmrp1* ocorre de forma gradual durante o estadio de anel (durante as 1<sup>as</sup> 10h após a invasão) em ambos os clones, e mantém-se elevada durante os estadios de trofozoíto e esquizonte. O aumento de expressão sequencial dos genes primeiro *pf $\gamma$ -gcs* (síntese de GSH) e segundo *pfmrp1*, está de acordo com as funções biológicas de efluxo de GSSG e de conjugados de GSH atribuíveis a PfMRP1.

Pelo contrário, a expressão máxima de *pfmrp2* (mantida durante as 1<sup>as</sup> 10h após a invasão) ocorre no estadio de anel jovem e decresce gradualmente até às 24h após a invasão e mantém-se em valores *Nfold*=1 (ausência de variação de expressão) durante os estadios de trofozoíto e esquizonte. No período em que os esquizontes passam a merozoítos a expressão volta a aumentar atingindo valores de *Nfold* próximos dos registados nas 1<sup>as</sup> 10h após invasão. Nas 1<sup>as</sup> 10h após invasão do ciclo de *P. falciparum* a biosíntese de GSH ainda não

---

<sup>68</sup> Faz parte do proteoma mínimo de resposta celular ao stress oxidativo (Kultz, 2005b; Kultz, 2003a; Gelfand *et al.*, 2000).

se encontra funcional, pelo que desconhecemos o papel esperado da bomba de efluxo de GSSG e conjugados de GSH como transportador, neste modelo.

Uma hipótese seria que, tal como referimos anteriormente, durante o estadio de anel, *P. falciparum* esteja exposto a diferentes fontes ROS (Cui *et al.*, 2007; Bozdech & Ginsburg, 2004; Bozdech *et al.*, 2003). Este facto é consistente com a existência de um mecanismo de alívio de stress oxidativo nesta fase. A importação de GSH por difusão a partir do meio (processo que é capaz de restaurar ou elevar a concentração intra-celular de GSH), é reconhecida em diversos tipo de células incluindo eritrócitos (Levy *et al.*, 1993). Sabe-se também que a concentração de GSH em eritrócitos infectados com *P. falciparum* diminui mais rapidamente do que em não infectados (Luersen *et al.*, 2000). A proteína PfMRP2 codificada pelo gene *pfmrp2*, que identificámos no decorrer do nosso trabalho, possui uma elevada semelhança com proteínas ABCC do tipo CFTR<sup>69</sup> (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Recentemente o CFTR (em humanos) foi identificado como importador de GSH e GSSG nas células epiteliais do pulmão, aumentando os níveis intracelulares de GSH e GSSG (menos eficiente para GSSG) (Kariya *et al.*, 2007). Assim, é concebível que *pfmrp2* funcione como um importador de GSH para o parasita, nas fases em que o parasita ainda não possui os mecanismos de síntese e regeneração de GSH funcionais.

### IV.3.2. Regulação da expressão génica na presença de CQ

Ao nível celular, a resposta ao stress é uma reacção de defesa a uma agressão ambiental como por exemplo às macro-moléculas tais como os metabolitos de fármacos antimaláricos. Resulta habitualmente na deformação de membranas ou danificação de proteínas, lípidos ou DNA, e é específica de cada espécie, estirpe ou tipo de célula (Kultz, 2005b).

A cloroquina (CQ) causa aumento do stress oxidativo em diversos sistemas celulares (Pari & Murugan, 2006; Paraje *et al.*, 2005; Vanoni *et al.*, 2004; Murugavel & Pari, 2004). Em *P. falciparum* a CQ (bem como outras quinoleínas) liga-se aos grupos heme (FP) impedindo a sua destoxificação por polimerização em hemozoína (Leed *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 1996b; Chou *et al.*, 1980), por sua vez os complexos CQ-FP alteram a permeabilidade das membranas interferindo com a viabilidade dos parasitas (Ginsburg, 1999). A CQ interfere

---

<sup>69</sup> De facto, das 57 proteínas (de distintos organismos) mais semelhantes com PfMRP2, 34 estão classificadas como CFTR

também com a destoxificação de ROS (Loria *et al.*, 1999) e bloqueia a síntese proteica (Surolia & Padmanaban, 1991).

Os perfis de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pf $\gamma$ -gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-CysPx*, *pf $\gamma$ 6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* na presença de cloroquina, acompanham em todos os genes e para ambos os clones a tendência dos mesmos na ausência de cloroquina (ANEXO 15). De uma maneira geral a presença de cloroquina, alterou significativamente a expressão dos 10 genes no sentido do aumento de expressão, em que a amplitude de variação de expressão (indução) dos genes é significativamente mais elevada no clone 3D7 (CQS) do que no Dd2 (CQR). Não foi verificada em geral diminuição (repressão) significativa da expressão dos genes em presença de cloroquina, excepto para *pftrxR* no clone 3D7, em que entre as 10 e as 24h se verifica uma diminuição da expressão que atinge valores significativos.

**Superóxidodismutase.** Em 3D7 a presença da CQ produz aumento da expressão do gene *pfFe-sod*, nos 4 estadios, sendo a amplitude de variação maior nos estadios de anel e trofozoíto. A expressão basal deste gene não se altera significativamente nestes estadios, sugerindo que a cloroquina exerce um efeito de indução de expressão marcado, sobre este gene, neste clone. Consistentemente o aumento de expressão deste gene na presença de CQ é menor no estadio de esquizonte e merozoíto, coincidindo com um maior nível de expressão basal deste gene nestes estadios. Pelo contrário em Dd2 a presença da CQ não produz uma variação significativa da expressão do gene *pfFe-sod*, em nenhum dos 4 estadios. No entanto a expressão basal deste gene em Dd2 é variável ao longo do ciclo mas sempre com valores de *Nfold* entre 1,5 e 3. Este facto sugere que os níveis basais de *pfFe-sod* sejam, *a priori*, adequados no contexto da resposta deste clone ao aumento de stress oxidativo nas primeiras horas do ciclo e independentes de CQ.

**O sistema de destoxificação dependente do glutatião – biosíntese e regeneração.** A presença da CQ produz aumento da expressão do gene responsável pela síntese de glutatião (*pf $\gamma$ -gcs*) em ambos os clones ao longo de todo o ciclo. Este aumento é maior nos estadios em que verificámos menor expressão basal para este gene, indicando que a presença de CQ exige uma resposta transcripcional do parasita. Em Dd2 a expressão de *pf $\gamma$ -gcs* aumenta significativamente na presença de CQ, enquanto que a expressão de *pfgr* quase não se altera. Pelo contrário em 3D7 a expressão de *pfgr* mantém-se significativamente aumentada ao



longo de todo o ciclo. Talvez esta diferença se deva ao facto de no clone Dd2 a manutenção dos níveis de GSH ser dependente de Pfy-GCS enquanto que no clone 3D7 se deve à PfGR (Meierjohann *et al.*, 2002c).

**O sistema de destoxificação dependente do glutatião – utilização.** *P. falciparum* apenas possui uma glutatião-S-transferase a qual é consideravelmente diferente, em termos de estrutura, das GSTs identificadas em humanos, isto torna esta enzima um alvo preferencial para o desenho de inibidores específicos (Deponete & Becker, 2005). Em 3D7 ocorre aumento significativo da expressão de *pfgst*, enquanto que em Dd2 embora a tendência seja de aumento, este apenas atinge valores significativos pontualmente. Talvez a sua menor expressão em Dd2 seja compensada na destoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pelo aumento significativo ao longo de todo o ciclo da enzima Pf2-CysPX (ver abaixo).

**O sistema de destoxificação dependente da tioredoxina.** A tioredoxina é uma proteína que fornece equivalentes redutores para as peroxidases PfGPX e Pf2-CysPX, destoxicarem os peróxidos. A tioredoxina reductase de *P. falciparum* (PfTrxR) catalisa a redução da tioredoxina oxidada (Trx-S<sub>2</sub>) a tioredoxina reduzida (TrxSH<sub>2</sub>) usando NADPH e reciclando a TrxSH<sub>2</sub> (essencial para a actividade das enzimas PfGPX e Pf2-CysPX).

Em 3D7 (Figura III.16) a expressão do gene *pfTrxR* na presença de CQ apenas apresenta aumento de expressão nas 1<sup>as</sup> 14 h do ciclo, descendo depois para valores indicativos de repressão do gene. O gene codificante de PfGPX (*pfgpx*) apresenta valores de expressão elevados, durante as 1<sup>as</sup> 12 h do ciclo, decrescendo gradualmente ao longo do ciclo. Pelo contrário o gene *pf2-CysPx*, não sofre alteração de expressão na presença de CQ até ao final do estadio de trofozoíto, a partir do qual aumenta até ao fim do estadio de esquizonte. Dado que *P. falciparum* não possui catalase é concebível que os valores elevados de *pfgpx* nas primeiras horas do ciclo, compensem a baixa expressão de *pf2-CysPx*, nesta fase.

Relativamente ao clone Dd2 (Figura III.17) e aos mesmos genes, os nossos resultados revelaram comportamentos totalmente opostos a 3D7. A expressão de *pfTrxR* na presença de CQ aumenta no estadio de anel e esquizonte. O gene *pfgpx* mantém valores de expressão praticamente inalterados durante todos os estadios do ciclo. *pf2-CysPx* pelo contrário mantém valores elevados de expressão ao longo o ciclo. No caso deste clone, e dado que *P. falciparum* não possui catalase, é concebível que os valores elevados da expressão de *pf2-CysPx* compensem a ausência de variação de expressão de *pfgpx*.

Analisando em conjunto os resultados obtidos relativos aos genes intervenientes nos sistemas de destoxificação dependentes do glutatião e da tioredoxina, estes parecem indicar que no clone Dd2 a destoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de cloroquina se processa via as enzimas que usam tioredoxina enquanto que o clone 3D7 recorre ao sistema dependente de glutatião.

**Glucose-6-fosfato desidrogenase.** Dado que ambos os sistemas de destoxificação dependentes do glutatião e da tioredoxina estão dependentes dos níveis de NADPH, esperávamos que o aumento do stress oxidativo induzido pela presença da CQ se reflectisse num aumento da expressão de glucose-6-fosfato desidrogenase (*pfg6pd*). Isto apenas se verificou para o clone 3D7, em que os valores de *Nfold* se mantêm entre  $\approx 3$  e  $\approx 8$  durante todo o ciclo, enquanto que no clone Dd2 apenas se regista aumento significativo (*Nfold*  $\approx 2$ ) de expressão entre as 26 e as 34h após invasão.

**Transportadores de conjugados de glutatião.** Verifica-se também para os genes *pfmrp1* e *pfmrp2*, a tendência geral de uma maior variação da amplitude de expressão em 3D7 do que em Dd2 (Figura III.16 e Figura III.17).

Tal como esperado, à semelhança do que ocorre em outros organismos, o aumento do stress oxidativo aumenta a expressão dos transportadores de GSSG e de conjugados de GSH (Krause *et al.*, 2007; Kubo *et al.*, 2006). O perfil de aumento de expressão do gene *pfmrp1* é coincidente com os perfis de aumento dos genes associados com o sistema de destoxificação dependente de glutatião em ambos os clones.

### IV.3.3 - Efeito da cloroquina na regulação da transcrição dos genes em estudo

Os resultados que seguidamente analisamos referem-se a níveis de expressão de mRNA dos genes *pfFe-sod*, *pf $\gamma$ -gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-CysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2*. Para testar o efeito da cloroquina (CQ) no controlo da transcrição dos referidos genes, foi testada a influência da Actinomicina D (Act. D) (inibidor da transcrição) no efeito da CQ sobre a transcrição. Foram realizadas culturas de *P. falciparum* com Act. D, na presença e ausência de CQ. Na presença de Act. D, não se verificou a indução da expressão dos genes pela CQ, analisada acima (ver Figura III.16 e Figura III.17). Como podemos confirmar pela observação dos gráficos da Figura III.18 e Figura III.19 nos quais a expressão (*Nfold*) não

sofre alteração na presença de Act. D, ou Act. D + CQ, o que sugere que o efeito de regulação da CQ se processa a nível transcricional. Estas observações sugerem que a CQ não modifica a velocidade de degradação do mRNA destes genes, ou seja, não aumenta a estabilidade do mRNA.

O significado funcional da análise da transcrição é útil mas não revela a “história” completa da expressão génica. As funções dos genes são desempenhadas pelas proteínas e enquanto a estabilidade e semi-vida destas não forem conhecidas, podemos inferir o início da expressão mas não a sua terminação. Assim, um período de transcrição curto pode ser mais informativo do que um período de transcrição alargado, pois indica que a proteína está a ser expressa pelo menos durante esse período. Assim, este estudo deveria ser repetido e ampliado à análise das proteínas codificadas por estes genes.

#### **IV.4 – Detecção e localização celular das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 codificadas pelos genes *pfmrp1* e *pfmrp2*.**

**Localização celular de PfMRP1 e PfMRP2.** Os soros gerados especificamente contra as proteínas recombinantes MRP1A e MRP2A, reconheceram por *western blot* proteínas com pesos moleculares compatíveis com PfMRP1 e PfMRP2, em extractos totais de proteínas de culturas de *P. falciparum* e não reconheceram qualquer banda em extractos totais de eritrócitos não infectados.

Utilizámos microscopia de imunofluorescência indirecta (IFA), para examinar a localização das proteínas em eritrócitos infectados com *P. falciparum*. Os soros hiper imunes anti-PfMRP1 e anti-PfMRP2 reagiram com proteínas que possuíam distribuição homogénea na superfície do parasita, não se tendo observado reacção alguma com a membrana dos eritrócitos infectados ou não infectados. O padrão de marcação obtido é idêntico ao padrão obtido para PfNT1 (Rager *et al.*, 2001), proteína para a qual está demonstrado ser de localização ao nível da membrana do parasita. No estadio de merozoíto, a fluorescência restringe-se à superfície de cada merozoíto individualizado, reforçando a hipótese de que a localização destas proteínas seja muito provavelmente na membrana plasmática do parasita e não na membrana do vacúolo do parasitóforo. A localização na membrana plasmática do parasita das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 é compatível com a sua provável função como

## Discussão

---

transportadores ABC da Sub-família MRP/CFTR. Os membros desta sub-família de transportadores ABC localizam-se na membrana celular em todos os organismos em que foram identificados (Madon *et al.*, 2000) (Guo *et al.*, 2007; Gayet *et al.*, 2006; Ritter *et al.*, 2005).

## **Principais Conclusões**

---

## **V – PRINCIPAIS CONCLUSÕES**

### Principais conclusões e perspectivas de trabalho futuro

Este trabalho, na área da resistência aos antimaláricos, englobou **a)** pesquisa e identificação de sequências codificantes de proteínas da família ABC no genoma de *Plasmodium falciparum*, **b)** clonagem de cDNAs e caracterização das correspondentes proteínas da sub-família MRP/CFTR de transportadores ABC, **c)** estudo epidemiológico de resistência a antimaláricos e **d)** estudo do efeito da cloroquina (CQ) na expressão dos genes codificantes de enzimas de resposta ao stress oxidativo e dos transportadores *pfmrp1* e *pfmrp2*.

A principal contribuição do presente trabalho foi um maior conhecimento sobre aquelas proteínas, bem como uma contribuição para os métodos de estudo *in vitro* associados a mecanismos de resistência de *P. falciparum*. A investigação não permitiu identificar, como desejado, a localização sub-celular das proteínas *mrp1* e *mrp2*.

**Proteínas ABC em *P. falciparum*.** A pesquisa de sequências candidatas a genes codificantes de proteínas ABC no genoma de *P. falciparum* resultou na identificação de 22 sequências com características compatíveis com as proteínas da super-família ABC. Destas, 11 correspondem a proteínas transmembranares e as restantes a proteínas solúveis. As sequências foram posicionadas nas sub-famílias da seguinte forma: 1 **ABCA**; 7 **ABCD** (MDR/TAP); 2 **ABCC** (MRP/CFTR); 1 **ABCE**; 2 **ABCF** (GCN20); 1 **ABCG** (*White*); 6 **SMC** e 2 **NAP**. Das 22 sequências 4 tinham já sido identificadas e posicionadas nas correspondentes sub-famílias. Assim, 18 novas ABCs foram identificadas por este estudo.

A análise detalhada da sequência de a.a. codificada por *pfmrp1* (PfMRP1) revelou elevado grau de semelhança com proteínas do tipo MRP, enquanto que a sequência de a.a. codificada por *pfmrp2* (PfMRP2) revelou elevado grau de semelhança com proteínas do tipo CFTR. Assim, embora ambas sejam ABCC elas são possivelmente diferentes a nível funcional.

**Localização celular de PfMRP1 PfMRP2.** Os soros hiper imunes anti-PfMRP1 e anti-PfMRP2, produzidos durante o presente trabalho, reagiram com proteínas que possuíam

## Principais Conclusões

---

distribuição homogénea no parasita (por IFA), não se tendo observado reacção alguma com a membrana dos eritrócitos infectados ou não infectados (por IFA e em *Western Blot*). A localização na membrana plasmática do parasita das proteínas PfMRP1 e PfMRP2 é compatível com a sua provável função como transportadores ABC da Sub-família MRP/CFTR. Este estudo, contudo, por motivo de dificuldades técnicas e disponibilidade de tempo, não é conclusivo.

**A regulação da expressão génica no ciclo intra-eritrocitário.** Os resultados aqui obtidos sobre níveis de expressão de mRNA têm uma leitura incompleta. O significado funcional da análise da transcrição do estudo efectuado com parasitas *P. falciparum* Dd2 e 3D7 são indicativos de resposta a um antimalárico (cloroquina) mas não estão necessariamente associados ao genótipo dos mesmos, dado serem parasitas não isogénicos. Consideramos também que pela metodologia utilizada, e uma vez que as funções dos genes são desempenhadas pelas proteínas (e enquanto a estabilidade e semi-vida destas não forem conhecidas) podemos inferir o início da expressão mas não a sua terminação. Assim, um período de transcrição curto pode ser mais informativo do que um período de transcrição alargado, pois indica que a proteína está a ser expressa pelo menos durante esse período.

Os genes codificantes, de enzimas de resposta ao stress oxidativo e dos transportadores PfMRP1 e PfMRP2, são regulados no ciclo de desenvolvimento de *P. falciparum*.

De uma forma geral, a amplitude de variação (no sentido da diferença entre máximo e mínimo de expressão) da expressão dos genes ao longo do ciclo intra-eritrocitário em 3D7 (clone sensível) é maior do que a observada em Dd2 (clone resistente).

A regulação no sentido do aumento de expressão dos genes codificantes de enzimas do sistema de destoxificação dependente do glutatião, parece ocorrer na fase inicial do desenvolvimento do parasita (estadio de anel e trofozoíto), antes dos genes codificantes de enzimas do sistema de destoxificação dependente da tioredoxina visível em fase posterior (esquizonte).

O aumento da expressão do gene codificante do transportador PfMRP1, coincidiu com a função biológica (por analogia) de transporte de xenobióticos atribuída às proteínas da sub-família ABCC. Pelo contrário, o padrão de expressão do gene codificante do transportador PfMRP2, seria compatível com uma função biológica de importação de,

## Principais Conclusões

---

por exemplo, glutatíão. Esta afirmação é apenas especulativa mas merecedora de futura análise com maior detalhe.

O gene *pf<sub>g6pd</sub>*, que codifica a G6PD, apresentou, no entanto, um padrão de regulação consistente com um gene *housekeeping* nos dois clones.

**A regulação da expressão génica pela CQ.** Os perfis de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pf<sub>γ</sub>-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pf<sub>gpx</sub>*, *pf<sub>trxR</sub>*, *pf2-CysPx*, *pf<sub>g6pd</sub>*, *pf<sub>mrp1</sub>* e *pf<sub>mrp2</sub>* na presença de CQ, acompanham em todos os genes e para ambos os clones a tendência dos mesmos na ausência de CQ. No entanto, a presença de CQ alterou significativamente a expressão dos 10 genes no sentido do aumento de expressão (indução). Mais, a amplitude de variação de expressão dos genes é significativamente mais elevada no clone 3D7 (sensível) do que no Dd2 (resistente). Em geral não foi verificada diminuição (repressão) significativa da expressão dos genes em presença de CQ para as doses utilizadas (IC 50).

Os resultados do estudo do efeito da CQ no controlo da transcrição dos referidos genes, sugerem que o efeito de regulação da CQ se processa a nível transcripcional, indicando também que a CQ não modifica a velocidade de degradação do mRNA destes genes, ou seja, não aumenta a estabilidade do mRNA.

**Polimorfismos e susceptibilidade *in vitro*.** Os resultados apresentados neste trabalho relativos ao grau de susceptibilidade *in vitro* de isolados de pacientes (infectados com *P. falciparum*), aos fármacos cloroquina (CQ), mefloquina (MEF), amodiaquina (AMQ) e quinino (QN) mostram elevadas prevalências de resistência relativas a cada um dos antimaláricos estudados, bem como salientam o facto de o fenómeno da multiresistência se encontrar claramente presente (nomeadamente na Tailândia), abrangendo os principais antimaláricos actualmente disponíveis.

No que respeita às alterações de sequência nos genes *pf<sub>mrp1</sub>* e *pf<sub>mrp2</sub>* identificadas no decorrer deste trabalho, os resultados demonstraram existência de associação entre a resposta à MEF na Tailândia e os polimorfismos 191Y e 347A de *pf<sub>mrp1</sub>* e em *pf<sub>mrp2</sub>* a presença de inserções/deleções nos codões 779 e 3591. Verifica-se o mesmo com o aumento de número de cópias do *pf<sub>mdr1</sub>* na mesma região, onde a resistência aos antimaláricos é múltipla, elevada e provavelmente de onde originou. Ficou no entanto



## **Principais Conclusões**

---

também evidente, que os referidos fenótipos não são determinados exclusivamente pelos alelos dos genes em estudo, dependendo provavelmente de factores adicionais, hipoteticamente outros polimorfismos e/ou acção de genes ainda não identificados.

## Referências Bibliográficas

---

## VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## Referências Bibliográficas

---

- Abdin, M.Z., Israr, M., Rehman, R.U. & Jain, S.K. (2003). Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Med* **69**, 289-99.
- Adagut, I.S. & Warhurst, D.C. (2001). *Plasmodium falciparum*: linkage disequilibrium between loci in chromosomes 7 and 5 and chloroquine selective pressure in Northern Nigeria. *Parasitology* **123**, 219-24.
- Ahmed, A., Lumb, V., Das, M.K., Dev, V., Wajihullah & Sharma, Y.D. (2006). Prevalence of mutations associated with higher levels of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Car Nicobar Island and Assam, India. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3934-8.
- Aikawa, M. (1988). Human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* **39**, 3-10.
- Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J. & Rabbege, J. (1978). Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol* **77**, 72-82.
- Aikawa, M., Rabbege, J.R. & Wellde, B.T. (1972). Junctional apparatus in erythrocytes infected with malarial parasites. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **124**, 72-5.
- Akaki, M., Nagayasu, E., Nakano, Y. & Aikawa, M. (2002). Surface charge of *Plasmodium falciparum* merozoites as revealed by atomic force microscopy with surface potential spectroscopy. *Parasitol Res* **88**, 16-20.
- Akerman, S.E. & Muller, S. (2003). 2-Cys peroxiredoxin PfTrx-Px1 is involved in the antioxidant defence of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **130**, 75-81.
- Akimaru, K., Kuo, M.T., Furuta, K., Suzuki, M., Noyori, R. & Ishikawa, T. (1996). Induction of MRP/GS-X pump and cellular resistance to anticancer prostaglandins. *Cytotechnology* **19**, 221-7.
- Aksenov, M.Y., Tucker, H.M., Nair, P., Aksenova, M.V., Butterfield, D.A., Estus, S. & Markesbery, W.R. (1998). The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* **11**, 151-64.
- Albertson, D.G. (2006). Gene amplification in cancer. *Trends Genet* **22**, 447-55.
- Aley, S.B., Sherwood, J.A. & Howard, R.J. (1984). Knob-positive and knob-negative *Plasmodium falciparum* differ in expression of a strain-specific malarial antigen on the surface of infected erythrocytes. *J Exp Med* **160**, 1585-90.
- Allikmets, R., Gerrard, B., Stewart, C., White, M. & Dean, M. (1993). Identification of P-glycoprotein/multidrug resistance genes from model organisms. *Leukemia* **7 Suppl 2**, S13-7.
- Allikmets, R., Raskind, W.H., Hutchinson, A., Schueck, N.D., Dean, M. & Koeller, D.M. (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* **8**, 743-9.
- Ames, G.F. (1990). Energy coupling in periplasmic permeases: the histidine permease as a model system. *Res Microbiol* **141**, 341-8.
- Anderson, T.J., Nair, S., Qin, H., Singlam, S., Brockman, A., Paiphun, L. & Nosten, F. (2005). Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (pfert) and multidrug resistance gene (pfmdr) associated with antimalarial drug resistance? *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2180-8.
- Aracena, P., Tang, W., Hamilton, S.L. & Hidalgo, C. (2005). Effects of S-glutathionylation and S-nitrosylation on calmodulin binding to triads and FKBP12 binding to type 1 calcium release channels. *Antioxid Redox Signal* **7**, 870-81.

## Referências Bibliográficas

---

- Arav-Boger, R. & Shapiro, T.A. (2005). Molecular mechanisms of resistance in antimalarial chemotherapy: the unmet challenge. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 565-85.
- Ashley, E.A., Lwin, K.M., McGready, R., Simon, W.H., Phaiphun, L., Proux, S., Wangseang, N., Taylor, W., Stepniewska, K., Nawamaneerat, W., Thwai, K.L., Barends, M., Leowattana, W., Olliaro, P., Singhasivanon, P., White, N.J. & Nosten, F. (2006). An open label randomized comparison of mefloquine-artesunate as separate tablets vs. a new co-formulated combination for the treatment of uncomplicated multidrug-resistant falciparum malaria in Thailand. *Trop Med Int Health* **11**, 1653-60.
- Assaraf, Y.G. (2006). The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat* **9**, 227-46.
- Assaraf, Y.G. (2007). Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 153-81.
- Atamna, H. & Ginsburg, H. (1993). Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **61**, 231-41.
- Atamna, H. & Ginsburg, H. (1997). The malaria parasite supplies glutathione to its host cell-- investigation of glutathione transport and metabolism in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* **250**, 670-9.
- Atamna, H., Pascarmona, G. & Ginsburg, H. (1994). Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites. *Mol Biochem Parasitol* **67**, 79-89.
- Aubouy, A., Bakary, M., Keundjian, A., Mbomat, B., Makita, J.R., Migot-Nabias, F., Cot, M., Le Bras, J. & Deloron, P. (2003). Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 231-7.
- Ayad, F., Tilley, L. & Deady, L.W. (2001). Synthesis, antimalarial activity and inhibition of haem detoxification of novel bisquinolines. *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 2075-7.
- Ayi, K., Cappadoro, M., Branca, M., Turrini, F. & Arese, P. (1998). *Plasmodium falciparum* glutathione metabolism and growth are independent of glutathione system of host erythrocyte. *FEBS Lett* **424**, 257-61.
- Bakos, E., Evers, R., Calenda, G., Tusnady, G.E., Szakacs, G., Varadi, A. & Sarkadi, B. (2000). Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* **113 Pt 24**, 4451-61.
- Ballerini, S., Bellincampi, L., Bernardini, S., Casciani, S., Motti, C., Cortese, C. & Federici, G. (2002). Apolipoprotein E genotyping: a comparative study between restriction endonuclease mapping and allelic discrimination with the LightCycler. *Clin Chim Acta* **317**, 71-6.
- Bannister, L.H. & Dluzewski, A.R. (1990). The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells* **16**, 257-92; discussion 293-7.
- Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S. & Mitchell, G.H. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol Today* **16**, 427-33.
- Barennes, H., Nagot, N., Valea, I., Koussoube-Balima, T., Ouedraogo, A., Sanou, T. & Ye, S. (2004). A randomized trial of amodiaquine and artesunate alone and in combination for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in children from Burkina Faso. *Trop Med Int Health* **9**, 438-44.
- Barrett, K.E. & Dharmasathaphorn, K. (1990). The cystic fibrosis gene. *Gastroenterology* **98**, 535-6.

## Referências Bibliográficas

---

- Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F. & Howard, R.J. (1995). Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* **82**, 77-87.
- Basco, L.K. & Le Bras, J. (1991). *Plasmodium falciparum*: in vitro drug interaction between chloroquine and enantiomers of amlodipine. *Exp Parasitol* **72**, 262-70.
- Basco, L.K. & Le Bras, J. (1992). In vitro activity of halofantrine and its relationship to other standard antimalarial drugs against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **47**, 521-7.
- Basco, L.K., Ramilarisoa, O. & Le Bras, J. (1995). In vitro activity of atovaquone against the African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **53**, 388-91.
- Basco, L.K. & Ringwald, P. (2001). Analysis of the key pfcrt point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. *J Infect Dis* **183**, 1828-31.
- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R., Meyerhoff, O., Hartung, W. & Hedrich, R. (2003). Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS Lett* **554**, 119-26.
- Becker, K., Gromer, S., Schirmer, R.H. & Muller, S. (2000). Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem* **267**, 6118-25.
- Becker, K., Kanzok, S.M., Iozef, R., Fischer, M., Schirmer, R.H. & Rahlfs, S. (2003). Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites. *Eur J Biochem* **270**, 1057-64.
- Becker, K. & Kirk, K. (2004). Of malaria, metabolism and membrane transport. *Trends Parasitol* **20**, 590-6.
- Becker, K., Muller, S., Keese, M.A., Walter, R.D. & Schirmer, R.H. (1996). A glutathione reductase-like flavoenzyme of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structural considerations based on the DNA sequence. *Biochem Soc Trans* **24**, 67-72.
- Becker, K., Pan, D. & Whitley, C.B. (1999). Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. *Hum Gene Ther* **10**, 2559-66.
- Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C. & Schirmer, R.H. (2003). Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem* **384**, 551-66.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J.L., Roberts, D., Rogerson, S. & Ginsburg, H. (2004a). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* **34**, 163-89.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J.L., Roberts, D., Rogerson, S. & Ginsburg, H. (2004b). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* **34**, 163-89.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J.L., Roberts, D., Rogerson, S. & Ginsburg, H. (2004c). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* **34**, 163-89.
- Becuwe, P., Gratepanche, S., Fourmaux, M.N., Van Beeumen, J., Samyn, B., Mercereau-Puijalon, O., Touzel, J.P., Slomianny, C., Camus, D. & Dive, D. (1996). Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **76**, 125-34.
- Begum, K., Kim, H.S., Okuda, Y., Wataya, Y., Kimura, M. & Huruta, T. (2002). Genomic analysis of mefloquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res Suppl* 223-4.

## Referências Bibliográficas

---

- Behari, R. & Haldar, K. (1994). *Plasmodium falciparum*: protein localization along a novel, lipid-rich tubovesicular membrane network in infected erythrocytes. *Exp Parasitol* **79**, 250-9.
- Beier, J.C., Killeen, G.F. & Githure, J.I. (1999). Short report: entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria prevalence in Africa. *Am J Trop Med Hyg* **61**, 109-13.
- Benabdelhak, H., Kiontke, S., Horn, C., Ernst, R., Blight, M.A., Holland, I.B. & Schmitt, L. (2003). A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A. *J Mol Biol* **327**, 1169-79.
- Berens, R.L., Krug, E.C., Nash, P.B. & Curiel, T.J. (1998). Selection and characterization of *Toxoplasma gondii* mutants resistant to artemisinin. *J Infect Dis* **177**, 1128-31.
- Beutler, E. (1996). G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev* **10**, 45-52.
- Bhasin, V.K. & Trager, W. (1984). Gametocyte-forming and non-gametocyte-forming clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **33**, 534-7.
- Birago, C., Pace, T., Picci, L., Pizzi, E., Scotti, R. & Ponzi, M. (1999). The putative gene for the first enzyme of glutathione biosynthesis in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **99**, 33-40.
- Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B. & Salehzada, T. (1995). Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. *J Biol Chem* **270**, 13308-17.
- Bohme, C.C., Arscott, L.D., Becker, K., Schirmer, R.H. & Williams, C.H. Jr. (2000). Kinetic characterization of glutathione reductase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Comparison with the human enzyme. *J Biol Chem* **275**, 37317-23.
- Borst, P. (1999). Multidrug resistance: a solvable problem? *Ann Oncol* **10 Suppl 4**, 162-4.
- Borst, P. & Elferink, R.O. (2002a). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**, 537-92.
- Borst, P. & Elferink, R.O. (2002b). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**, 537-92.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. (1999). The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 347-57.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1295-302.
- Borst, P. & Genest, P.A. (2006). Parasitology: switching like for like. *Nature* **439**, 926-7.
- Borst, P. & Ouellette, M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* **49**, 427-60.
- Borst, P. & Schinkel, A.H. (1997). Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet* **13**, 217-22.
- Bourhis, J., Goldstein, L.J., Riou, G., Pastan, I., Gottesman, M.M. & Benard, J. (1989). Expression of a human multidrug resistance gene in ovarian carcinomas. *Cancer Res* **49**, 5062-5.
- Bozdech, Z., Delling, U., Volkman, S.K., Cowman, A.F. & Schurr, E. (1996). Cloning and sequence analysis of a novel member of the ATP-binding cassette (ABC) protein gene family from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **81**, 41-51.

## Referências Bibliográficas

---

- Bozdech, Z. & Ginsburg, H. (2004). Antioxidant defense in *Plasmodium falciparum*--data mining of the transcriptome. *Malar J* **3**, 23
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J. & DeRisi, J.L. (2003). The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* **1**, E5
- Bozdech, Z. & Schurr, E. (1999). Protein transport in the host cell cytoplasm and ATP-binding cassette proteins in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Novartis Found Symp* **226**, 231-41; discussion 241-5.
- Bozdech, Z., VanWye, J., Haldar, K. & Schurr, E. (1998). The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* exports the ATP-binding cassette protein PFGCN20 to membrane structures in the host red blood cell. *Mol Biochem Parasitol* **97**, 81-95.
- Breedveld, P., Pluim, D., Cipriani, G., Dahlhaus, F., van Eijndhoven, M.A., de Wolf, C.J., Kuil, A., Beijnen, J.H., Scheffer, G.L., Jansen, G., Borst, P. & Schellens, J.H. (2007). The effect of low pH on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, methotrexate diglutamate, folic acid, mitoxantrone, topotecan, and resveratrol in in vitro drug transport models. *Mol Pharmacol* **71**, 240-9.
- Brem, R.B., Yvert, G., Clinton, R. & Kruglyak, L. (2002). Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science* **296**, 752-5.
- Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M. & Plasterk, R.H. (1996). Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* **15**, 6132-43.
- Bruce-Chwatt, L.J., Garnham, P.C., Shute, P.G. & Draper, C.C. (1970). Induced double infection with *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* in a splenectomized chimpanzee. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **64**, 2
- Buchaklian, A.H. & Klug, C.S. (2006). Characterization of the LSGGQ and H motifs from the *Escherichia coli* lipid A transporter MsbA. *Biochemistry* **45**, 12539-46.
- Buchler, M., Konig, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H., Horie, T. & Keppler, D. (1996). cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* **271**, 15091-8.
- Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K.P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L. & Lewis, C.E. (2003). Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* **163**, 1233-43.
- Butler, D. (2004). Power to the people. *Nature* **430**, 928-9.
- Byun, C.H., Koh, J.M., Kim, D.K., Park, S.I., Lee, K.U. & Kim, G.S. (2005). Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* **20**, 1125-35.
- Calvo, E., Rubiano, C., Vargas, A. & Wasserman, M. (2002). Expression of housekeeping genes during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* **88**, 267-71.
- Campanale, N., Nickel, C., Daubenberger, C.A., Wehlan, D.A., Gorman, J.J., Klonis, N., Becker, K. & Tilley, L. (2003). Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **278**, 27354-61.
- Carlton, J.M., Angiuoli, S.V., Suh, B.B., Kooij, T.W., Perlea, M., Silva, J.C., Ermolaeva, M.D., Allen, J.E., Selengut, J.D., Koo, H.L., Peterson, J.D., Pop, M., Kosack, D.S., Shumway, M.F., Bidwell, S.L., Shallom, S.J., van Aken, S.E., Riedmuller, S.B., Feldblyum, T.V., Cho, J.K., Quackenbush, J., Sedegah, M., Shoabib, A., Cummings, L.M., Florens, L., Yates, J.R., Raine, J.D., Sinden,

## Referências Bibliográficas

---

- R.E., Harris, M.A., Cunningham, D.A., Preiser, P.R., Bergman, L.W., Vaidya, A.B., van Lin, L.H., Janse, C.J., Waters, A.P., Smith, H.O., White, O.R., Salzberg, S.L., Venter, J.C., Fraser, C.M., Hoffman, S.L., Gardner, M.J. & Carucci, D.J. (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* **419**, 512-9.
- Cascorbi, I. (2006). Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* **112**, 457-73.
- Chan, H.S., Lu, Y., Grogan, T.M., Haddad, G., Hipfner, D.R., Cole, S.P., Deeley, R.G., Ling, V. & Gallie, B.L. (1997). Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P-glycoprotein. *Cancer Res* **57**, 2325-30.
- Checchi, F., Balkan, S., Vonhm, B.T., Massaquoi, M., Biberson, P., Eldin de Pecoulas, P., Brasseur, P. & Guthmann, J.P. (2002). Efficacy of amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Harper, Liberia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **96**, 670-3.
- Chemaly, S.M., Chen, C.T. & van Zyl, R.L. (2007). Naturally occurring cobalamins have antimalarial activity. *J Inorg Biochem*
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. & Bahler, J. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**, 214-29.
- Chen, H., Rossier, C., Lalioti, M.D., Lynn, A., Chakravarti, A., Perrin, G. & Antonarakis, S.E. (1996). Cloning of the cDNA for a human homologue of the *Drosophila* white gene and mapping to chromosome 21q22.3. *Am J Hum Genet* **59**, 66-75.
- Choi, C.Y., Cerda, J.F., Chu, H.A., Babcock, G.T. & Marletta, M.A. (1999). Spectroscopic characterization of the heme-binding sites in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2. *Biochemistry* **38**, 16916-24.
- Chou, A.C., Chevli, R. & Fitch, C.D. (1980). Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry* **19**, 1543-9.
- Choudhuri, S. & Klaassen, C.D. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* **25**, 231-59.
- Clairmont, A., Sies, H., Ramachandran, S., Lear, J.T., Smith, A.G., Bowers, B., Jones, P.W., Fryer, A.A. & Strange, R.C. (1999). Association of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) null with numbers of basal cell carcinomas: use of a multivariate model to rank the relative importance of this polymorphism and those at other relevant loci. *Carcinogenesis* **20**, 1235-40.
- Cobbe, N. & Heck, M.M. (2000). Review: SMCs in the world of chromosome biology- from prokaryotes to higher eukaryotes. *J Struct Biol* **129**, 123-43.
- Cobbe, N. & Heck, M.M. (2004a). The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol Biol Evol* **21**, 332-47.
- Cobbe, N. & Heck, M.M. (2004b). The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol Biol Evol* **21**, 332-47.
- Cobbe, N. & Heck, M.M. (2006). The evolution of ATPase activity in SMC proteins. *Proteins* **63**, 685-96.
- Cohen, M.P., Wu, V.Y. & Surma, M.L. (1981). Non-collagen protein and proteoglycan in renal glomerular basement membrane. *Biochim Biophys Acta* **678**, 322-8.
- Cojean, S., Noel, A., Garnier, D., Hubert, V., Le Bras, J. & Durand, R. (2006). Lack of association



## Referências Bibliográficas

---

- between putative transporter gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and chloroquine resistance in imported malaria isolates from Africa. *Malar J* **5**, 24
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M. & Deeley, R.G. (1992a). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-4.
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M. & Deeley, R.G. (1992b). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-4.
- Cole, S.P. & Deeley, R.G. (1998). Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* **20**, 931-40.
- Collinson, E.J., Wheeler, G.L., Garrido, E.O., Avery, A.M., Avery, S.V. & Grant, C.M. (2002). The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **277**, 16712-7.
- Conseil, G., Deeley, R.G. & Cole, S.P. (2005). Polymorphisms of MRP1 (ABCC1) and related ATP-dependent drug transporters. *Pharmacogenet Genomics* **15**, 523-533.
- Coombs, G.H., Goldberg, D.E., Klemba, M., Berry, C., Kay, J. & Mottram, J.C. (2001). Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol* **17**, 532-7.
- Cooper, R.A., Ferdig, M.T., Su, X.Z., Ursos, L.M., Mu, J., Nomura, T., Fujioka, H., Fidock, D.A., Roepe, P.D. & Wellems, T.E. (2002). Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol* **61**, 35-42.
- Cornwell, M.M., Pastan, I. & Gottesman, M.M. (1987). Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem* **262**, 2166-70.
- Cowman, A.F. (1991a). The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: Are they involved in chloroquine resistance? *Parasitol Today* **7**, 70-6.
- Cowman, A.F. (1991b). The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: Are they involved in chloroquine resistance? *Parasitol Today* **7**, 70-6.
- Cowman, A.F. & Cooke, B.M. (2000). Molecular Approaches to Malaria 2000. *Drug Resist Updat* **3**, 74-76.
- Cowman, A.F. & Foote, S.J. (1990). Chemotherapy and drug resistance in malaria. *Int J Parasitol* **20**, 503-13.
- Cowman, A.F., Galatis, D. & Thompson, J.K. (1994). Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci US A* **91**, 1143-7.
- Cowman, A.F., Karcz, S., Galatis, D. & Culvenor, J.G. (1991). A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biol* **113**, 1033-42.
- Crooke, A., Diez, A., Mason, P.J. & Bautista, J.M. (2006). Transient silencing of *Plasmodium falciparum* bifunctional glucose-6-phosphate dehydrogenase- 6-phosphogluconolactonase. *FEBS J* **273**, 1537-46.
- Croop, J.M., Tiller, G.E., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S. & Wu, R.L. (1997). Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. *Gene* **185**, 77-85.

## Referências Bibliográficas

---

- Cui, L., Miao, J. & Cui, L. (2007). Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 488-94.
- Daily, J.P., Le Roch, K.G., Sarr, O., Ndiaye, D., Lukens, A., Zhou, Y., Ndir, O., Mboup, S., Sultan, A., Winzeler, E.A. & Wirth, D.F. (2005). In vivo transcriptome of *Plasmodium falciparum* reveals overexpression of transcripts that encode surface proteins. *J Infect Dis* **191**, 1196-203.
- Dandrea, T., Bajak, E., Warngard, L. & Cotgreave, I.A. (2002). Protein S-glutathionylation correlates to selective stress gene expression and cytoprotection. *Arch Biochem Biophys* **406**, 241-52.
- Dano, K. (1973). Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* **323**, 466-83.
- Das, A., Elmendorf, H.G., Li, W.I. & Haldar, K. (1994). Biosynthesis, export and processing of a 45 kDa protein detected in membrane clefts of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **302** ( Pt 2), 487-96.
- Davidson, A.L. & Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**, 241-68.
- Davioud-Charvet, E., Delarue, S., Biot, C., Schwobel, B., Boehme, C.C., Mussigbrodt, A., Maes, L., Sergheraert, C., Grellier, P., Schirmer, R.H. & Becker, K. (2001). A prodrug form of a *Plasmodium falciparum* glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4-anilinoquinoline. *J Med Chem* **44**, 4268-76.
- Davioud-Charvet, E., McLeish, M.J., Veine, D.M., Giegel, D., Arscott, L.D., Andricopulo, A.D., Becker, K., Muller, S., Schirmer, R.H., Williams, C.H. Jr & Kenyon, G.L. (2003). Mechanism-based inactivation of thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum* by Mannich bases. Implication for cytotoxicity. *Biochemistry* **42**, 13319-30.
- Dean, M. & Allikmets, R. (1995). Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 779-85.
- Dean, M. & Allikmets, R. (2001a). Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr* **33**, 475-9.
- Dean, M. & Allikmets, R. (2001b). Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr* **33**, 475-9.
- Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**, 1156-66.
- Decottignies, A. & Goffeau, A. (1997). Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* **15**, 137-45.
- Deeley, R.G. & Cole, S.P. (1997). Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol* **8**, 193-204.
- Deeley, R.G., Westlake, C. & Cole, S.P. (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* **86**, 849-99.
- Degen, O., Kobayashi, M., Shimizu, S. & Eitinger, T. (1999). Selective transport of divalent cations by transition metal permeases: the *Alcaligenes eutrophus* HoxN and the *Rhodococcus rhodochrous* NhlF. *Arch Microbiol* **171**, 139-45.
- Deponte, M. & Becker, K. (2005). Glutathione S-transferase from malarial parasites: structural and functional aspects. *Methods Enzymol* **401**, 241-53.

## Referências Bibliográficas

---

- DePristo, M.A., Zilversmit, M.M. & Hartl, D.L. (2006). On the abundance, amino acid composition, and evolutionary dynamics of low-complexity regions in proteins. *Gene* **378**, 19-30.
- Descoteaux, S., Ayala, P., Samuelson, J. & Orozco, E. (1995). Increase in mRNA of multiple Eh pgp genes encoding P-glycoprotein homologues in emetine-resistant *Entamoeba histolytica* parasites. *Gene* **164**, 179-84.
- Dive, D., Gratepanche, S., Yera, H., Becuwe, P., Daher, W., Delplace, P., Odberg-Ferragut, C., Capron, M. & Khalife, J. (2003). Superoxide dismutase in *Plasmodium*: a current survey. *Redox Rep* **8**, 265-7.
- Djaman, J.A., Mazabraud, A. & Basco, L. (2007). Sulfadoxine-pyrimethamine susceptibilities and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* isolates from Cote d'Ivoire. *Ann Trop Med Parasitol* **101**, 103-12.
- Djimde, A., Doumbo, O.K., Cortese, J.F., Kayentao, K., Doumbo, S., Diourte, Y., Dicko, A., Su, X.Z., Nomura, T., Fidock, D.A., Wellem, T.E., Plowe, C.V. & Coulibaly, D. (2001). A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* **344**, 257-63.
- Djimde, A.A., Doumbo, O.K., Traore, O., Guindo, A.B., Kayentao, K., Diourte, Y., Niare-Doumbo, S., Coulibaly, D., Kone, A.K., Cissoko, Y., Tekete, M., Fofana, B., Dicko, A., Diallo, D.A., Wellem, T.E., Kwiatkowski, D. & Plowe, C.V. (2003). Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* **69**, 558-63.
- Doumbo, O.K., Kayentao, K., Djimde, A., Cortese, J.F., Diourte, Y., Konare, A., Kublin, J.G. & Plowe, C.V. (2000). Rapid selection of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutants by pyrimethamine prophylaxis. *J Infect Dis* **182**, 993-6.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K. & Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15665-70.
- Duraisingh, M.T., Roper, C., Walliker, D. & Warhurst, D.C. (2000). Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the pfmdr1 gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **36**, 955-61.
- Durand, R. & Le Bras, J. (2001). [*Plasmodium falciparum*: point mutations of pcftr and chloroquine susceptibility]. *Ann Pharm Fr* **59**, 312-8.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A. & Krishna, S. (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **424**, 957-61.
- Egan, T.J., Combrinck, J.M., Egan, J., Hearne, G.R., Marques, H.M., Ntenti, S., Sewell, B.T., Smith, P.J., Taylor, D., van Schalkwyk, D.A. & Walden, J.C. (2002). Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **365**, 343-7.
- Eijdem, E.W., Borst, P., Jongma, A.P., de Jong, S., de Vries, E.G., van Groenigen, M., Versantvoort, C.H., Nieuwint, A.W. & Baas, F. (1992). Genetic transfer of non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance (MDR) in somatic cell fusion: dissection of a compound MDR phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3498-502.
- Eitinger, T., Suhr, J., Moore, L. & Smith, J.A. (2005). Secondary transporters for nickel and cobalt ions: theme and variations. *Biometals* **18**, 399-405.
- Eklow, L., Moldeus, P. & Orrenius, S. (1984). Oxidation of glutathione during hydroperoxide metabolism. A study using isolated hepatocytes and the glutathione reductase inhibitor 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Eur J Biochem* **138**, 459-63.

## Referências Bibliográficas

---

- Eklow, L., Thor, H. & Orrenius, S. (1981). Formation and efflux of glutathione disulfide studied in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* **127**, 125-8.
- Ellis, K.E., Clough, B., Saldanha, J.W. & Wilson, R.J. (2001). Nifs and Sufs in malaria. *Mol Microbiol* **41**, 973-81.
- Elmendorf, H.G. & Haldar, K. (1993). Secretory transport in Plasmodium. *Parasitol Today* **9**, 98-102.
- Elmendorf, H.G. & Haldar, K. (1994). *Plasmodium falciparum* exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J Cell Biol* **124**, 449-62.
- Ettling, M.B., Thimasarn, K., Krachaiklin, S. & Bualombai, P. (1989). Evaluation of malaria clinics in Maesot, Thailand: use of serology to assess coverage. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **83**, 325-30.
- Evers, R., de Haas, M., Sparidans, R., Beijnen, J., Wielinga, P.R., Lankelma, J. & Borst, P. (2000). Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* **83**, 375-83.
- Fairfield, A.S., Abosch, A., Ranz, A., Eaton, J.W. & Meshnick, S.R. (1988). Oxidant defense enzymes of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **30**, 77-82.
- Famin, O. & Ginsburg, H. (2002). Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochem Pharmacol* **63**, 393-8.
- Famin, O., Krugliak, M. & Ginsburg, H. (1999). Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem Pharmacol* **58**, 59-68.
- Farombi, E.O., Shyntum, Y.Y. & Emerole, G.O. (2003). Influence of chloroquine treatment and *Plasmodium falciparum* malaria infection on some enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense indices in humans. *Drug Chem Toxicol* **26**, 59-71.
- Fast, N.M., Kissinger, J.C., Roos, D.S. & Keeling, P.J. (2001). Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol* **18**, 418-26.
- Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Deng, B., Joy, D.A., Su, X.Z. & Wellems, T.E. (2004a). Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol* **52**, 985-97.
- Ferdig, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Deng, B., Joy, D.A., Su, X.Z. & Wellems, T.E. (2004b). Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Mol Microbiol* **52**, 985-97.
- Fernandes, P.M., Domitrovic, T., Kao, C.M. & Kurtenbach, E. (2004). Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett* **556**, 153-60.
- Ferreira, I.D., Lopes, D., Martinelli, A., Ferreira, C., do Rosario, V.E. & Cravo, P. (2007). In vitro assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe. *Trop Med Int Health* **12**, 353-62.
- Fetsch, P.A., Abati, A., Litman, T., Morisaki, K., Honjo, Y., Mittal, K. & Bates, S.E. (2006). Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* **235**, 84-92.
- Fidock, D.A., Nomura, T., Cooper, R.A., Su, X., Talley, A.K. & Wellems, T.E. (2000a). Allelic modifications of the cg2 and cg1 genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **110**, 1-10.

## Referências Bibliográficas

---

- Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naude, B., Deitsch, K.W., Su, X.Z., Wootton, J.C., Roepe, P.D. & Wellems, T.E. (2000b). Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* **6**, 861-71.
- Fitch, C.D., Chevli, R. & Gonzalez, Y. (1974). Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*: effect of substrate on chloroquine and amodiaquin accumulation. *Antimicrob Agents Chemother* **6**, 757-62.
- Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Fritz, J.M., Meijer, C.J., Scheper, R.J. & Zaman, G.J. (1994). Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res* **54**, 4557-63.
- Flohe, L., Jaeger, T., Pilawa, S. & Sztajer, H. (2003). Thiol-dependent peroxidases care little about homology-based assignments of function. *Redox Rep* **8**, 256-64.
- Foley, M. & Tilley, L. (1995). Home improvements: malaria and the red blood cell. *Parasitol Today* **11**, 436-9.
- Foley, M. & Tilley, L. (1997). Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Int J Parasitol* **27**, 231-40.
- Foote, S.J., Thompson, J.K., Cowman, A.F. & Kemp, D.J. (1989). Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* **57**, 921-30.
- Foth, B.J. & McFadden, G.I. (2003). The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* **224**, 57-110.
- Foth, B.J., Ralph, S.A., Tonkin, C.J., Struck, N.S., Fraunholz, M., Roos, D.S., Cowman, A.F. & McFadden, G.I. (2003). Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **299**, 705-8.
- Fousteri, M.I. & Lehmann, A.R. (2000). A novel SMC protein complex in *Schizosaccharomyces pombe* contains the Rad18 DNA repair protein. *EMBO J* **19**, 1691-702.
- Fowler, R.E., Fookes, R.E., Lavin, F., Bannister, L.H. & Mitchell, G.H. (1998). Microtubules in *Plasmodium falciparum* merozoites and their importance for invasion of erythrocytes. *Parasitology* **117** ( Pt 5), 425-33.
- Frederich, M., Dogne, J.M., Angenot, L. & De Mol, P. (2002). New trends in anti-malarial agents. *Curr Med Chem* **9**, 1435-56.
- Fritz-Wolf, K., Becker, A., Rahlfs, S., Harwaldt, P., Schirmer, R.H., Kabsch, W. & Becker, K. (2003). X-ray structure of glutathione S-transferase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13821-6.
- Fry, M. & Beesley, J.E. (1991). Mitochondria of mammalian *Plasmodium* spp. *Parasitology* **102** Pt 1, 17-26.
- Fujioka, H. & Aikawa, M. (2002). Structure and life cycle. *Chem Immunol* **80**, 1-26.
- Gamain, B., Arnaud, J., Favier, A., Camus, D., Dive, D. & Slomianny, C. (1996a). Increase in glutathione peroxidase activity in malaria parasite after selenium supplementation. *Free Radic Biol Med* **21**, 559-65.
- Gamain, B., Langsley, G., Fourmaux, M.N., Touzel, J.P., Camus, D., Dive, D. & Slomianny, C. (1996b). Molecular characterization of the glutathione peroxidase gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **78**, 237-48.

## Referências Bibliográficas

---

- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Perlea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M. & Barrell, B. (2002a). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**, 498-511.
- Gardner, M.J., Shallom, S.J., Carlton, J.M., Salzberg, S.L., Nene, V., Shoaibi, A., Ciecko, A., Lynn, J., Rizzo, M., Weaver, B., Jarrahi, B., Brenner, M., Parvizi, B., Tallon, L., Moazzez, A., Granger, D., Fujii, C., Hansen, C., Pederson, J., Feldblyum, T., Peterson, J., Suh, B., Angiuoli, S., Perlea, M., Allen, J., Selengut, J., White, O., Cummings, L.M., Smith, H.O., Adams, M.D., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L. & Fraser, C.M. (2002b). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature* **419**, 531-4.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. & Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**, 4241-57.
- Gatton, M.L. & Cheng, Q. (2006). *Plasmodium falciparum* infection dynamics and transmission potential following treatment with sulfadoxine-pyrimethamine. *J Antimicrob Chemother* **58**, 47-51.
- Gaur, M., Choudhury, D. & Prasad, R. (2005). Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 3-15.
- Gavigan, C.S., Kiely, S.P., Hirtzlin, J. & Bell, A. (2003). Cyclosporin-binding proteins of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* **33**, 987-96.
- Gayet, L., Picault, N., Cazale, A.C., Beyly, A., Lucas, P., Jacquet, H., Suso, H.P., Vavasseur, A., Peltier, G. & Forestier, C. (2006). Transport of antimony salts by *Arabidopsis thaliana* protoplasts over-expressing the human multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *FEBS Lett* **580**, 6891-7.
- Geary, T.G., Bonanni, L.C., Jensen, J.B. & Ginsburg, H. (1986). Effects of combinations of quinoline-containing antimalarials on *Plasmodium falciparum* in culture. *Ann Trop Med Parasitol* **80**, 285-91.
- Geary, T.G., Divo, A.A. & Jensen, J.B. (1989). Stage specific actions of antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* in culture. *Am J Trop Med Hyg* **40**, 240-4.
- Geary, T.G. & Jensen, J.B. (1983). Lack of cross-resistance to 4-aminoquinolines in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Parasitol* **69**, 97-105.
- Geisler, M., Girin, M., Brandt, S., Vincenzetti, V., Plaza, S., Paris, N., Kobae, Y., Maeshima, M., Billion, K., Kolukisaoglu, U.H., Schulz, B. & Martinoia, E. (2004). Arabidopsis immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters. *Mol Biol Cell* **15**, 3393-405.
- Gekeler, V., Beck, J., Noller, A., Wilisch, A., Frese, G., Neumann, M., Handgretinger, R., Ehninger, G., Probst, H. & Niethammer, D. (1994). Drug-induced changes in the expression of MDR-associated genes: investigations on cultured cell lines and chemotherapeutically treated leukemias. *Ann Hematol* **69 Suppl 1**, S19-24.
- Gelfand, M.S., Koonin, E.V. & Mironov, A.A. (2000). Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach. *Nucleic Acids Res* **28**, 695-705.
- Gero, A.M., Brown, G.V. & O'Sullivan, W.J. (1984). Pyrimidine de novo synthesis during the life cycle of the intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol* **70**, 536-41.
- Ghosh, P., Melrose, J., Cole, T.C. & Taylor, T. (1992). A comparison of the high buoyant density

## Referências Bibliográficas

---

- proteoglycans isolated from the intervertebral discs of chondrodystrophoid and non-chondrodystrophoid dogs. *Matrix* **12**, 148-55.
- Giao, P.T. & de Vries, P.J. (2001). Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents. *Clin Pharmacokinet* **40**, 343-73.
- Giel, J.L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F.R. & Kiley, P.J. (2006). IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O<sub>2</sub>-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **60**, 1058-75.
- Gil, V.S., Ferreira, M.C., d'Alva, F.S., d'Abreu, J.A., Will, I.M., Gomes, M.L., Castelli, F., Taylor, W.R., Olliaro, P. & D'Alessandro, U. (2003). Efficacy of artesunate plus chloroquine for uncomplicated malaria in children in Sao Tome and Principe: a double-blind, randomized, controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **97**, 703-6.
- Gilberger, T.W., Bergmann, B., Walter, R.D. & Muller, S. (1998). The role of the C-terminus for catalysis of the large thioredoxin reductase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* **425**, 407-10.
- Gilberger, T.W., Schirmer, R.H., Walter, R.D. & Muller, S. (2000). Deletion of the parasite-specific insertions and mutation of the catalytic triad in glutathione reductase from chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7. *Mol Biochem Parasitol* **107**, 169-79.
- Gilles, H.M. (1989). Malaria--an overview. *J Infect* **18**, 11-23.
- Ginsburg, H. (1999). The permeability properties of the parasite cell membrane. *Novartis Found Symp* **226**, 99-108; discussion 108-13.
- Ginsburg, H. (2003). The mysteries of hemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Trends Parasitol* **19**, 198-9; author reply 199-200.
- Ginsburg, H. & Atamna, H. (1994a). The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems. *Parasite* **1**, 5-13.
- Ginsburg, H. & Atamna, H. (1994b). The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems. *Parasite* **1**, 5-13.
- Ginsburg, H. & Atamna, H. (1994c). The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems. *Parasite* **1**, 5-13.
- Ginsburg, H., Famin, O., Zhang, J. & Krugliak, M. (1998). Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem Pharmacol* **56**, 1305-13.
- Ginsburg, H. & Golenser, J. (1999). Redox metabolism in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes and its relation to antimalarial chemotherapy. *Parassitologia* **41**, 309-11.
- Ginsburg, H. & Golenser, J. (2003). Glutathione is involved in the antimalarial action of chloroquine and its modulation affects drug sensitivity of human and murine species of *Plasmodium*. *Redox Rep* **8**, 276-9.
- Gligorijevic, B., Bennett, T., McAllister, R., Urbach, J.S. & Roepe, P.D. (2006). Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 2. Altered vacuolar volume regulation in drug resistant malaria. *Biochemistry* **45**, 12411-23.
- Gluzman, I.Y., Francis, S.E., Oksman, A., Smith, C.E., Duffin, K.L. & Goldberg, D.E. (1994). Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *J Clin Invest* **93**, 1602-8.

## Referências Bibliográficas

---

- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-7.
- Golenser, J., Kamy, M., Tsafack, A., Marva, E., Cohen, A., Kitrossky, N. & Chevion, M. (1992). Correlation between destruction of malarial parasites by polymorphonuclear leucocytes and oxidative stress. *Free Radic Res Commun* **17**, 249-62.
- Gottesman, M.M., Fojo, T. & Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**, 48-58.
- Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P. & Deeley, R.G. (1994). Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res* **54**, 357-61.
- Gratepanche, S., Menage, S., Touati, D., Wintjens, R., Delplace, P., Fontecave, M., Masset, A., Camus, D. & Dive, D. (2002). Biochemical and electron paramagnetic resonance study of the iron superoxide dismutase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **120**, 237-46.
- Grellier, P., Sarlauskas, J., Anusevicius, Z., Maroziene, A., Houee-Levin, C., Schrevel, J. & Cenas, N. (2001). Antiplasmodial activity of nitroaromatic and quinoidal compounds: redox potential vs. inhibition of erythrocyte glutathione reductase. *Arch Biochem Biophys* **393**, 199-206.
- Gromer, S. & Gross, J.H. (2002). Methylseleninate is a substrate rather than an inhibitor of mammalian thioredoxin reductase. Implications for the antitumor effects of selenium. *J Biol Chem* **277**, 9701-6.
- Gros, P., Ben Neriah, Y.B., Croop, J.M. & Housman, D.E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* **323**, 728-31.
- Guacci, V., Koshland, D. & Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* **91**, 47-57.
- Guo, Y., Singleton, P.A., Rowshan, A., Gucek, M., Cole, R.N., Graham, D.R., Van Eyk, J.E. & Garcia, J.G. (2007). Quantitative proteomic analysis of human endothelial cell membrane rafts: Evidence of MARCKS and MRP regulation in the sphingosine 1-phosphate-induced barrier enhancement. *Mol Cell Proteomics*
- Hall, A.P., Segal, H.E., Pearlman, E.J. & Phintuyothin, P. (1975). Comparison of a 9-phenanthrene methanol (WR33063), a 4-quinoline methanol (WR30090), and quinine for falciparum malaria in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **69**, 342-9.
- Harvey, P.J., Campanella, B.F., Castro, P.M., Harms, H., Lichtfouse, E., Schaffner, A.R., Smrcek, S. & Werck-Reichhart, D. (2002). Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ Sci Pollut Res Int* **9**, 29-47.
- Harwaldt, P., Rahlfs, S. & Becker, K. (2002). Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. *Biol Chem* **383**, 821-30.
- Hayton, K. & Su, X.Z. (2004). Genetic and biochemical aspects of drug resistance in malaria parasites. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**, 1-10.
- Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.
- Higgins, C.F. (1995). The ABC of channel regulation. *Cell* **82**, 693-6.
- Higgins, C.F., Callaghan, R., Linton, K.J., Rosenberg, M.F. & Ford, R.C. (1997). Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin Cancer Biol* **8**, 135-42.



## Referências Bibliográficas

---

- Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Leslie, E.M., Gerlach, J.H., Grant, C.E., Deeley, R.G. & Cole, S.P. (1997). Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH<sub>2</sub> terminus. *J Biol Chem* **272**, 23623-30.
- Hipfner, D.R., Deeley, R.G. & Cole, S.P. (1999). Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 359-76.
- Hirano, T. (2005). SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 507-14.
- Hirano, T. & Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* **79**, 449-58.
- Hirt, R.P., Muller, S., Embley, T.M. & Coombs, G.H. (2002). The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends Parasitol* **18**, 302-8.
- Hoffmann, K. & Handschumacher, R.E. (1995). Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochem J* **307** ( Pt 1), 5-8.
- Holmgren, G., Bjorkman, A. & Gil, J.P. (2006). Amodiaquine resistance is not related to rare findings of pfmdr1 gene amplifications in Kenya. *Trop Med Int Health* **11**, 1808-12.
- Homolya, L., Varadi, A. & Sarkadi, B. (2003). Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* **17**, 103-14.
- Hopper, E., Belinsky, M.G., Zeng, H., Tosolini, A., Testa, J.R. & Kruh, G.D. (2001). Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett* **162**, 181-91.
- Hughes, D.A., Fukui, Y. & Yamamoto, M. (1990). Homologous activators of ras in fission and budding yeast. *Nature* **344**, 355-7.
- Hunt, N.H. & Stocker, R. (1990a). Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* **16**, 499-526; discussion 527-30.
- Hunt, N.H. & Stocker, R. (1990b). Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* **16**, 499-526; discussion 527-30.
- Hutagalung, R., Paiphun, L., Ashley, E.A., McGready, R., Brockman, A., Thwai, K.L., Singhasivanon, P., Jelinek, T., White, N.J. & Nosten, F.H. (2005). A randomized trial of artemether-lumefantrine versus mefloquine-artesunate for the treatment of uncomplicated multi-drug resistant *Plasmodium falciparum* on the western border of Thailand. *Malar J* **4**, 46
- Hyde, J.E. & Read, M. (1993). The extraction and purification of DNA and RNA from in vitro cultures of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol* **21**, 133-43.
- Imlay, J.A. & Linn, S. (1987). Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **169**, 2967-76.
- Inoue, K., Sakurada, Y., Murakami, M., Shirota, M. & Shirota, K. (2003). Detection of gene expression of vascular endothelial growth factor and flk-1 in the renal glomeruli of the normal rat kidney using the laser microdissection system. *Virchows Arch* **442**, 159-62.
- Isakov, N., Witte, S. & Altman, A. (2000). PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. *Trends Biochem Sci* **25**, 537-9.
- Ishikawa, T. (1992a). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* **17**, 463-8.

## Referências Bibliográficas

---

- Ishikawa, T. (1992b). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* **17**, 463-8.
- Ishikawa, T., Akimaru, K., Kuo, M.T., Priebe, W. & Suzuki, M. (1995). How does the MRP/GS-X pump export doxorubicin? *J Natl Cancer Inst* **87**, 1639-40.
- Ishikawa, T., Bao, J.J., Yamane, Y., Akimaru, K., Frindrich, K., Wright, C.D. & Kuo, M.T. (1996). Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J Biol Chem* **271**, 14981-8.
- Ishikawa, T., Li, Z.S., Lu, Y.P. & Rea, P.A. (1997). The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression. *Biosci Rep* **17**, 189-207.
- Iwaki, T., Fujita, Y., Tanaka, N., Giga-Hama, Y. & Takegawa, K. (2005). Mitochondrial ABC transporter Atm1p is required for protection against oxidative stress and vacuolar functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 2109-16.
- Jacobasch, G., Buckwitz, D., Gerth, C. & Thamm, R. (1990). Regulation of the energy metabolism of *Plasmodium berghei*. *Biomed Biochim Acta* **49**, S289-94.
- Jones, P.M. & George, A.M. (1999). Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 187-202.
- Juliano, R.L. & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**, 152-62.
- Kantharidis, P., El-Osta, S., Silva, M., Lee, G., Hu, X.F. & Zalberg, J. (2000). Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts. *Drug Resist Updat* **3**, 99-108.
- Kanzok, S.M., Rahlfs, S., Becker, K. & Schirmer, R.H. (2002). Thioredoxin, thioredoxin reductase, and thioredoxin peroxidase of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Enzymol* **347**, 370-81.
- Kanzok, S.M., Schirmer, R.H., Turbachova, I., Iozef, R. & Becker, K. (2000). The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited. *J Biol Chem* **275**, 40180-6.
- Kariya, C., Leitner, H., Min, E., van Heeckeren, C., van Heeckeren, A. & Day, B.J. (2007). A role for CFTR in the elevation of glutathione in the lung by oral glutathione administration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*
- Karow, M. & Georgopoulos, C. (1993). The essential *Escherichia coli* msbA gene, a multicopy suppressor of null mutations in the htrB gene, is related to the universally conserved family of ATP-dependent translocators. *Mol Microbiol* **7**, 69-79.
- Katzmann, D.J., Hallstrom, T.C., Voet, M., Wysock, W., Golin, J., Volckaert, G. & Moye-Rowley, W.S. (1995). Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**, 6875-83.
- Kawazu, S., Ikenoue, N., Takemae, H., Komaki-Yasuda, K. & Kano, S. (2005). Roles of 1-Cys peroxiredoxin in haem detoxification in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS J* **272**, 1784-91.
- Kawazu, S., Komaki, K., Tsuji, N., Kawai, S., Ikenoue, N., Hatabu, T., Ishikawa, H., Matsumoto, Y., Himeno, K. & Kano, S. (2001). Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **116**, 73-9.
- Kawazu, S., Tsuji, N., Hatabu, T., Kawai, S., Matsumoto, Y. & Kano, S. (2000). Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **109**, 165-9.

## Referências Bibliográficas

---

- Keppler, D. (1999). Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic Biol Med* **27**, 985-91.
- Keppler, D., Cui, Y., König, J., Leier, I. & Nies, A. (1999). Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes. *Adv Enzyme Regul* **39**, 237-46.
- Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G. & König, J. (1998). ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact* **111-112**, 153-61.
- Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G., Mayer, R. & Buchler, M. (1996). The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion. *Adv Enzyme Regul* **36**, 17-29.
- Kilejian, A., Sharma, Y.D., Karoui, H. & Naslund, L. (1986). Histidine-rich domain of the knob protein of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7938-41.
- Kim, H.S., Okuda, Y., Begum, K., Nagai, Y., Wataya, Y., Kimura, M. & Huruta, T. (2001). Analysis of Pfmdr 1 gene in mefloquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res Suppl* **231-2**.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V. & Gottesman, M.M. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* **315**, 525-8.
- Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. & Lill, R. (1997). The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* **418**, 346-50.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. & Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* **18**, 3981-9.
- Kita, K., Hirawake, H., Miyadera, H., Amino, H. & Takeo, S. (2002). Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta* **1553**, 123-39.
- Klein, I., Sarkadi, B. & Varadi, A. (1999a). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 237-62.
- Klein, I., Sarkadi, B. & Varadi, A. (1999b). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 237-62.
- Klein, I., Sarkadi, B. & Varadi, A. (1999c). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 237-62.
- Kletzien, R.F., Harris, P.K. & Foellmi, L.A. (1994). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* **8**, 174-81.
- Klokouzas, A., Shahi, S., Hladky, S.B., Barrand, M.A. & van Veen, H.W. (2003). ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *Int J Antimicrob Agents* **22**, 301-17.
- Klokouzas, A., Tiffert, T., van Schalkwyk, D., Wu, C.P., van Veen, H.W., Barrand, M.A. & Hladky, S.B. (2004). *Plasmodium falciparum* expresses a multidrug resistance-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 197-201.
- Knell, A.J. (1988). Origin of falciparum. *Parasitol Today* **4**, 20
- Kohashi, T., Tateaki, Y., Tateno, C., Asahara, T., Obara, M. & Yoshizato, K. (2002). Expression of pleiotrophin in hepatic nonparenchymal cells and preneoplastic nodules in carbon tetrachloride-induced fibrotic rat liver. *Growth Factors* **20**, 53-60.

## Referências Bibliográficas

---

- Kohler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D. & Roos, D.S. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* **275**, 1485-9.
- Kolaczkowski, M., Michalak, K. & Motohashi, N. (2003). Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. *Int J Antimicrob Agents* **22**, 279-83.
- Kolaczkowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczowska, A., Soumillon, J.P., Konings, W.N. & Goffeau, A. (1996). Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem* **271**, 31543-8.
- Kolukisaoglu, H.U., Bovet, L., Klein, M., Eggmann, T., Geisler, M., Wanke, D., Martinoia, E. & Schulz, B. (2002). Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 107-19.
- Komaki-Yasuda, K., Kawazu, S. & Kano, S. (2003). Disruption of the *Plasmodium falciparum* 2-Cys peroxiredoxin gene renders parasites hypersensitive to reactive oxygen and nitrogen species. *FEBS Lett* **547**, 140-4.
- Komar, A.A. (2007). Genetics. SNPs, silent but not invisible. *Science* **315**, 466-7.
- Konig, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I. & Keppler, D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 377-94.
- Korsinczky, M., Chen, N., Kotecka, B., Saul, A., Rieckmann, K. & Cheng, Q. (2000). Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2100-8.
- Krause, K., Karger, S., Schierhorn, A., Poncin, S., Many, M.C. & Fuhrer, D. (2007). Proteomic profiling of cold thyroid nodules. *Endocrinology* **148**, 1754-63.
- Krauth-Siegel, R.L., Muller, J.G., Lottspeich, F. & Schirmer, R.H. (1996). Glutathione reductase and glutamate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*, the causative agent of tropical malaria. *Eur J Biochem* **235**, 345-50.
- Krishnamachary, N., Ma, L., Zheng, L., Safa, A.R. & Center, M.S. (1994). Analysis of MRP gene expression and function in HL60 cells isolated for resistance to adriamycin. *Oncol Res* **6**, 119-27.
- Krishnamurthy, P.C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K.E., Wang, J., Sosa-Pineda, B., Murti, K.G. & Schuetz, J.D. (2006). Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* **443**, 586-9.
- Krnajski, Z., Gilberger, T.W., Walter, R.D., Cowman, A.F. & Muller, S. (2002). Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *J Biol Chem* **277**, 25970-5.
- Krnajski, Z., Gilberger, T.W., Walter, R.D. & Muller, S. (2000). Intersubunit interactions in *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **275**, 40874-8.
- Krnajski, Z., Gilberger, T.W., Walter, R.D. & Muller, S. (2001a). The malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses a functional thioredoxin system. *Mol Biochem Parasitol* **112**, 219-28.
- Krnajski, Z., Walter, R.D. & Muller, S. (2001b). Isolation and functional analysis of two thioredoxin peroxidases (peroxiredoxins) from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **113**, 303-8.
- Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Herwaldt, B.L., Schlesinger, P.H. & Wellems, T.E. (1992). Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* **43**, 57-62.

## Referências Bibliográficas

---

- Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Kyle, D.E., Oduola, A.M., Martin, S.K., Milhous, W.K. & Schlesinger, P.H. (1987). Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science* **238**, 1283-5.
- Krugliak, M., Zhang, J. & Ginsburg, H. (2002). Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Biochem Parasitol* **119**, 249-56.
- Krungkrai, J., Cerami, A. & Henderson, G.B. (1991). Purification and characterization of dihydroorotate dehydrogenase from the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Biochemistry* **30**, 1934-9.
- Krungkrai, J., Webster, H.K. & Yuthavong, Y. (1989). Characterization of cobalamin-dependent methionine synthase purified from the human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* **75**, 512-7.
- Kublin, J.G., Dzinjalimala, F.K., Kamwendo, D.D., Malkin, E.M., Cortese, J.F., Martino, L.M., Mukadam, R.A., Rogerson, S.J., Lescano, A.G., Molyneux, M.E., Winstanley, P.A., Chimpeni, P., Taylor, T.E. & Plowe, C.V. (2002). Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* **185**, 380-8.
- Kubo, S., Hattori, N. & Mizuno, Y. (2006). Recessive Parkinson's disease. *Mov Disord* **21**, 885-93.
- Kuchler, K., Goransson, H.M., Viswanathan, M.N. & Thorner, J. (1992). Dedicated transporters for peptide export and intercompartmental traffic in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**, 579-92.
- Kuchler, K. & Thorner, J. (1992). Secretion of peptides and proteins lacking hydrophobic signal sequences: the role of adenosine triphosphate-driven membrane translocators. *Endocr Rev* **13**, 499-514.
- Kultz, D. (2003a). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol* **206**, 3119-24.
- Kultz, D. (2003b). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J Exp Biol* **206**, 3119-24.
- Kultz, D. (2005a). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* **67**, 225-57.
- Kultz, D. (2005b). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* **67**, 225-57.
- Kumar, R.S., Sivakumar, T., Sunderam, R.S., Gupta, M., Mazumdar, U.K., Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Saravanan, S., Kumar, M.S., Muruges, K. & Kumar, K.A. (2005). Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. *Braz J Med Biol Res* **38**, 1015-24.
- Kwast, K.E., Lai, L.C., Menda, N., James, D.T. 3rd, Aref, S. & Burke, P.V. (2002). Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J Bacteriol* **184**, 250-65.
- Kyle, D.E., Oduola, A.M., Martin, S.K. & Milhous, W.K. (1990). *Plasmodium falciparum*: modulation by calcium antagonists of resistance to chloroquine, desethylchloroquine, quinine, and quinidine in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**, 474-8.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-32.
- Labbe, A.C., Bualombai, P., Pillai, D.R., Zhong, K.J., Vanisaveth, V., Hongvanthong, B., Looareesuwan, S. & Kain, K.C. (2001). Molecular markers for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*

## Referências Bibliográficas

---

- malaria in Thailand and Laos. *Ann Trop Med Parasitol* **95**, 781-8.
- Lambros, C. & Vanderberg, J.P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* **65**, 418-20.
- Lang, T., Haberl, M., Jung, D., Drescher, A., Schlagenhauer, R., Keil, A., Mornhinweg, E., Stieger, B., Kullak-Ublick, G.A. & Kerb, R. (2006). Genetic variability, haplotype structures, and ethnic diversity of hepatic transporters MDR3 (ABCB4) and bile salt export pump (ABCB11). *Drug Metab Dispos* **34**, 1582-99.
- Lauer, S.A., Rathod, P.K., Ghori, N. & Haldar, K. (1997). A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science* **276**, 1122-5.
- Law, A.E., Mullineaux, C.W., Hirst, E.M., Saldanha, J. & Wilson, R.J. (2000). Bacterial orthologues indicate the malarial plastid gene *ycf24* is essential. *Protist* **151**, 317-27.
- Le Bras, J. & Durand, R. (2003a). The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* **17**, 147-53.
- Le Bras, J. & Durand, R. (2003b). The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* **17**, 147-53.
- Le Crom, S., Devaux, F., Marc, P., Zhang, X., Moye-Rowley, W.S. & Jacq, C. (2002). New insights into the pleiotropic drug resistance network from genome-wide characterization of the YRR1 transcription factor regulation system. *Mol Cell Biol* **22**, 2642-9.
- Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De La Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J. & Winzeler, E.A. (2003a). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301**, 1503-8.
- Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., De La Vega, P., Holder, A.A., Batalov, S., Carucci, D.J. & Winzeler, E.A. (2003b). Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* **301**, 1503-8.
- Leed, A., DuBay, K., Ursos, L.M., Sears, D., De Dios, A.C. & Roepe, P.D. (2002). Solution structures of antimalarial drug-heme complexes. *Biochemistry* **41**, 10245-55.
- Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Center, M., Cole, S.P., Deeley, R.G. & Keppler, D. (1996). ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* **314** ( Pt 2), 433-7.
- Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Cole, S.P., Deeley, R.G. & Keppler, D. (1994). The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* **269**, 27807-10.
- Leighton, J. & Schatz, G. (1995). An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J* **14**, 188-95.
- Levy, N., Yonish-Rouach, E., Oren, M. & Kimchi, A. (1993). Complementation by wild-type p53 of interleukin-6 effects on M1 cells: induction of cell cycle exit and cooperativity with c-myc suppression. *Mol Cell Biol* **13**, 7942-52.
- Lew, V.L., Tiffert, T. & Ginsburg, H. (2003). Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* **101**, 4189-94.
- Lewin, H.A. (1989). Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence. *J Dairy Sci* **72**, 1334-48.
- Li, G., Shi, P. & Wang, Y. (2007). Evolutionary dynamics of the ABCA chromosome 17q24 cluster

## Referências Bibliográficas

---

- genes in vertebrates. *Genomics* **89**, 385-91.
- Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczypka, M., Thiele, D.J. & Rea, P.A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 42-7.
- Li, Z.S., Szczypka, M., Lu, Y.P., Thiele, D.J. & Rea, P.A. (1996). The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* **271**, 6509-17.
- Liebau, E., Bergmann, B., Campbell, A.M., Teesdale-Spittle, P., Brophy, P.M., Luersen, K. & Walter, R.D. (2002). The glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **124**, 85-90.
- Lingelbach, K.R. (1993). *Plasmodium falciparum*: a molecular view of protein transport from the parasite into the host erythrocyte. *Exp Parasitol* **76**, 318-27.
- Liu, X.Y. & Matherly, L.H. (2002). Analysis of membrane topology of the human reduced folate carrier protein by hemagglutinin epitope insertion and scanning glycosylation insertion mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* **1564**, 333-42.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Llinas, M., Bozdech, Z., Wong, E.D., Adai, A.T. & DeRisi, J.L. (2006a). Comparative whole genome transcriptome analysis of three *Plasmodium falciparum* strains. *Nucleic Acids Res* **34**, 1166-73.
- Llinas, M., Bozdech, Z., Wong, E.D., Adai, A.T. & DeRisi, J.L. (2006b). Comparative whole genome transcriptome analysis of three *Plasmodium falciparum* strains. *Nucleic Acids Res* **34**, 1166-73.
- Looareesuwan, S., Wilairatana, P., Vanijanonta, S., Pitisuttithum, P., Ratanapong, Y. & Andrial, M. (1997). Monotherapy with sodium artesunate for uncomplicated falciparum malaria in Thailand: a comparison of 5- and 7-day regimens. *Acta Trop* **67**, 197-205.
- Lopes, D., Nogueira, F., Gil, J.P., Ferreira, C., do Rosario, V.E. & Cravo, P. (2002a). pfert and pfmdr1 mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol* **96**, 831-4.
- Lopes, D., Rungsihirunrat, K., Nogueira, F., Seugorn, A., Gil, J.P., do Rosario, V.E. & Cravo, P. (2002b). Molecular characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malar J* **1**, 12
- Loria, P., Miller, S., Foley, M. & Tilley, L. (1999). Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem J* **339** ( Pt 2), 363-70.
- Losada, A., Hirano, M. & Hirano, T. (1998). Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* **12**, 1986-97.
- Loureiro, L.F., Cesario, A.M., Franco, A.S. & Rosario, V.E. (1996). Malaria in Sao Tome and Principe: prevalence and drug-susceptibility. *Ann Trop Med Parasitol* **90**, 223-4.
- Lowe, J., Cordell, S.C. & van den Ent, F. (2001). Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *J Mol Biol* **306**, 25-35.
- Luersen, K., Walter, R.D. & Muller, S. (1999). The putative gamma-glutamylcysteine synthetase from *Plasmodium falciparum* contains large insertions and a variable tandem repeat. *Mol Biochem Parasitol* **98**, 131-42.
- Luersen, K., Walter, R.D. & Muller, S. (2000). *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells depend

## Referências Bibliográficas

---

- on a functional glutathione de novo synthesis attributable to an enhanced loss of glutathione. *Biochem J* **346 Pt 2**, 545-52.
- Luse, S.A. & Miller, L.H. (1971). *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg* **20**, 655-60.
- Luzzatto, L. (1995). About hemoglobins, G6PD and parasites in red cells. *Experientia* **51**, 206-8.
- Madon, J., Hagenbuch, B., Landmann, L., Meier, P.J. & Stieger, B. (2000). Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* **57**, 634-41.
- Maguire, J.D., Susanti, A.I., Krisin, Sismadi, P., Fryauff, D.J. & Baird, J.K. (2001). The T76 mutation in the pfcr1 gene of *Plasmodium falciparum* and clinical chloroquine resistance phenotypes in Papua, Indonesia. *Ann Trop Med Parasitol* **95**, 559-72.
- Martin, S.K., Oduola, A.M. & Milhous, W.K. (1987). Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science* **235**, 899-901.
- Marton, M.J., Vazquez de Aldana, C.R., Qiu, H., Chakraborty, K. & Hinnebusch, A.G. (1997). Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2alpha kinase GCN2. *Mol Cell Biol* **17**, 4474-89.
- Mashima, R., Tilley, L., Siomos, M.A., Papalexis, V., Raftery, M.J. & Stocker, R. (2002). *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein-2 (PfHRP2) modulates the redox activity of ferriprotoporphyrin IX (FePPIX): peroxidase-like activity of the PfHRP2-FePPIX complex. *J Biol Chem* **277**, 14514-20.
- McCollum, A.M., Poe, A.C., Hamel, M., Huber, C., Zhou, Z., Shi, Y.P., Ouma, P., Vulule, J., Bloland, P., Slutsker, L., Barnwell, J.W., Udhayakumar, V. & Escalante, A.A. (2006). Antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: multiple origins and identification of novel dhfr alleles. *J Infect Dis* **194**, 189-97.
- McFadden, G.I. & Waller, R.F. (1997). Plastids in parasites of humans. *Bioessays* **19**, 1033-40.
- McKeegan, K.S., Borges-Walmsley, M.I. & Walmsley, A.R. (2004). Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 479-86.
- Meierjohann, S., Walter, R.D. & Muller, S. (2002a). Glutathione synthetase from *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **363**, 833-8.
- Meierjohann, S., Walter, R.D. & Muller, S. (2002b). Glutathione synthetase from *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **363**, 833-8.
- Meierjohann, S., Walter, R.D. & Muller, S. (2002c). Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* **368**, 761-8.
- Michaelis, C., Ciosk, R. & Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**, 35-45.
- Miller, L.H., Dvorak, J.A., Shiroishi, T. & Durocher, J.R. (1973). Influence of erythrocyte membrane components on malaria merozoite invasion. *J Exp Med* **138**, 1597-601.
- Mirski, S.E., Gerlach, J.H. & Cole, S.P. (1987). Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res* **47**, 2594-8.
- Mita, T., Kaneko, A., Lum, J.K., Bwijo, B., Takechi, M., Zungu, I.L., Tsukahara, T., Tanabe, K., Kobayakawa, T. & Bjorkman, A. (2003). Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation



## Referências Bibliográficas

---

- K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* **68**, 413-5.
- Mitsuhashi, N., Miki, T., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajima, N., Iwanaga, T., Yokoyama, Y., Shibata, T. & Seino, S. (2000). MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis. *J Biol Chem* **275**, 17536-40.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T. & Bates, S.E. (1999a). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* **59**, 8-13.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T. & Bates, S.E. (1999b). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* **59**, 8-13.
- Molta, N.B., Oguiche, S., Pam, S.D., Omalu, I.C., Afolabi, B.M., Odujoko, J.B., Amajoh, C.N., Adeniji, B., Wuyep, V.P. & Ekanem, O.J. (2003). Amodiaquine treatment of uncomplicated malaria in children, in an area of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in north-central Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* **97**, 663-9.
- Mu, J., Ferdig, M.T., Feng, X., Joy, D.A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R.A., Wootton, J.C., Xiong, M. & Su, X.Z. (2003). Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol* **49**, 977-89.
- Mukanganyama, S., Naik, Y.S., Widersten, M., Mannervik, B. & Hasler, J.A. (2001). Proposed reductive metabolism of artemisinin by glutathione transferases in vitro. *Free Radic Res* **35**, 427-34.
- Mukanganyama, S., Widersten, M., Naik, Y.S., Mannervik, B. & Hasler, J.A. (2002). Inhibition of glutathione S-transferases by antimalarial drugs possible implications for circumventing anticancer drug resistance. *Int J Cancer* **97**, 700-5.
- Muller, M., Bakos, E., Welker, E., Varadi, A., Germann, U.A., Gottesman, M.M., Morse, B.S., Roninson, I.B. & Sarkadi, B. (1996). Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein. *J Biol Chem* **271**, 1877-83.
- Muller, M., Meijer, C., Zaman, G.J., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, N.H., de Vries, E.G. & Jansen, P.L. (1994). Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 13033-7.
- Muller, S. (2003a). Thioredoxin reductase and glutathione synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Redox Rep* **8**, 251-5.
- Muller, S. (2003b). Thioredoxin reductase and glutathione synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Redox Rep* **8**, 251-5.
- Muller, S. (2004a). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **53**, 1291-305.
- Muller, S. (2004b). Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* **53**, 1291-305.
- Muller, S., Becker, K., Bergmann, B., Schirmer, R.H. & Walter, R.D. (1995). *Plasmodium falciparum* glutathione reductase exhibits sequence similarities with the human host enzyme in the core structure but differs at the ligand-binding sites. *Mol Biochem Parasitol* **74**, 11-8.
- Muller, S., Liebau, E., Walter, R.D. & Krauth-Siegel, R.L. (2003). Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol* **19**, 320-8.

## Referências Bibliográficas

---

- Murat, D., Bance, P., Callebaut, I. & Dassa, E. (2006). ATP hydrolysis is essential for the function of the Uup ATP-binding cassette ATPase in precise excision of transposons. *J Biol Chem* **281**, 6850-9.
- Murphy, K.C. & Lewis, L.J. (1993). Properties of Escherichia coli expressing bacteriophage P22 Abc (anti-RecBCD) proteins, including inhibition of Chi activity. *J Bacteriol* **175**, 1756-66.
- Murugavel, P. & Pari, L. (2004). Attenuation of chloroquine-induced renal damage by alpha-lipoic acid: possible antioxidant mechanism. *Ren Fail* **26**, 517-24.
- Myrick, A., Munasinghe, A., Patankar, S. & Wirth, D.F. (2003). Mapping of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 5'-upstream region, and evidence of induction of transcript levels by antimalarial drugs in chloroquine sensitive parasites. *Mol Microbiol* **49**, 671-83.
- Nachin, L., El Hassouni, M., Loiseau, L., Expert, D. & Barras, F. (2001). SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol Microbiol* **39**, 960-72.
- Nagata, K., Nishitani, M., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T. & Ueda, K. (2000). Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem* **275**, 17626-30.
- Nakamura, M., Kimura, S., Kobayashi, M., Hirano, K., Hoshino, T. & Awaya, S. (1997). Type VI collagen bound to collagen fibrils by chondroitin/dermatan sulfate glycosaminoglycan in mouse corneal stroma. *Jpn J Ophthalmol* **41**, 71-6.
- Nakamura, M., Kobayashi, M., Hirano, K., Kobayashi, K., Hoshino, T. & Awaya, S. (1994). Glycosaminoglycan and collagen fibrillar interactions in the mouse corneal stroma. *Matrix Biol* **14**, 283-6.
- Nebert, D.W. & Vasiliou, V. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics* **1**, 460-4.
- Nelson, A.L., Purfield, A., McDaniel, P., Uthaimongkol, N., Buathong, N., Sriwichai, S., Miller, R.S., Wongsrichanalai, C. & Meshnick, S.R. (2005a). pfmdr1 genotyping and in vivo mefloquine resistance on the Thai-Myanmar border. *Am J Trop Med Hyg* **72**, 586-92.
- Nelson, A.L., Purfield, A., McDaniel, P., Uthaimongkol, N., Buathong, N., Sriwichai, S., Miller, R.S., Wongsrichanalai, C. & Meshnick, S.R. (2005b). pfmdr1 genotyping and in vivo mefloquine resistance on the Thai-Myanmar border. *Am J Trop Med Hyg* **72**, 586-92.
- Nelson, A.L., Purfield, A., McDaniel, P., Uthaimongkol, N., Buathong, N., Sriwichai, S., Miller, R.S., Wongsrichanalai, C. & Meshnick, S.R. (2005c). pfmdr1 genotyping and in vivo mefloquine resistance on the Thai-Myanmar border. *Am J Trop Med Hyg* **72**, 586-92.
- Nickel, C., Trujillo, M., Rahlfs, S., Deponte, M., Radi, R. & Becker, K. (2005). *Plasmodium falciparum* 2-Cys peroxiredoxin reacts with plasmoredoxin and peroxyne nitrite. *Biol Chem* **386**, 1129-36.
- Noedl, H., Krudsood, S., Leowattana, W., Tangpukdee, N., Thanachartwet, W., Looareesuwan, S., Miller, R.S., Fukuda, M., Jongsakul, K., Yingyuen, K., Sriwichai, S., Ohrt, C. & Knirsch, C. (2007). In vitro antimalarial activity of azithromycin, artesunate, and quinine in combination and correlation with clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 651-6.
- Nomura, T., Carlton, J.M., Baird, J.K., del Portillo, H.A., Fryauff, D.J., Rathore, D., Fidock, D.A., Su, X., Collins, W.E., McCutchan, T.F., Wootton, J.C. & Wellems, T.E. (2001). Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 *Plasmodium* species that cause human malaria. *J Infect Dis* **183**, 1653-61.
- Ochong, E.O., van den Broek, I.V., Keus, K. & Nzila, A. (2003a). Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from

## Referências Bibliográficas

---

- the upper Nile in southern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* **69**, 184-7.
- Ochong, E.O., van den Broek, I.V., Keus, K. & Nzila, A. (2003b). Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* **69**, 184-7.
- Oduola, A.M., Milhous, W.K., Weatherly, N.F., Bowdre, J.H. & Desjardins, R.E. (1988). *Plasmodium falciparum*: induction of resistance to mefloquine in cloned strains by continuous drug exposure in vitro. *Exp Parasitol* **67**, 354-60.
- Olliaro, P. (2001). Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther* **89**, 207-19.
- Orjih, A.U. (1997). Heme polymerase activity and the stage specificity of antimalarial action of chloroquine. *J Pharmacol Exp Ther* **282**, 108-12.
- Osman, M.E., Mockenhaupt, F.P., Bienzle, U., Elbashir, M.I. & Giha, H.A. (2007). Field-based evidence for linkage of mutations associated with chloroquine (pfprt/pfmdr1) and sulfadoxine-pyrimethamine (pfdhfr/pfdhps) resistance and for the fitness cost of multiple mutations in *P. falciparum*. *Infect Genet Evol* **7**, 52-9.
- Oswald, C., Holland, I.B. & Schmitt, L. (2006). The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**, 385-99.
- Ouellette, M., Fase-Fowler, F. & Borst, P. (1990). The amplified H circle of methotrexate-resistant leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J* **9**, 1027-33.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Mourad, W., Leblanc, E. & Ouellette, M. (1994). Changes in folate and pterin metabolism after disruption of the Leishmania H locus short chain dehydrogenase gene. *J Biol Chem* **269**, 7310-5.
- Papalexis, V., Siomos, M.A., Campanale, N., Guo, X., Kocak, G., Foley, M. & Tilley, L. (2001a). Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasitol* **115**, 77-86.
- Papalexis, V., Siomos, M.A., Campanale, N., Guo, X., Kocak, G., Foley, M. & Tilley, L. (2001b). Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol Biochem Parasitol* **115**, 77-86.
- Paraje, M.G., Barnes, A.I. & Albesa, I. (2005). An Enterobacter cloacae toxin able to generate oxidative stress and to provoke dose-dependent lysis of leukocytes. *Int J Med Microbiol* **295**, 109-16.
- Pari, L. & Murugan, P. (2006). Tetrahydrocurcumin: effect on chloroquine-mediated oxidative damage in rat kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **99**, 329-34.
- Parker, R. & Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 121-7.
- Pasloske, B.L., Baruch, D.I., van Schravendijk, M.R., Handunnetti, S.M., Aikawa, M., Fujioka, H., Taraschi, T.F., Gormley, J.A. & Howard, R.J. (1993). Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* gene encoding a novel high-molecular weight host membrane-associated protein, PfEMP3. *Mol Biochem Parasitol* **59**, 59-72.
- Patzer, S.I. & Hantke, K. (1999). SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the. *J Bacteriol* **181**, 3307-9.  
Notes: FhuF protein in Escherichia coli.

## Referências Bibliográficas

---

- Paulusma, C.C., Kool, M., Bosma, P.J., Scheffer, G.L., ter Borg, F., Scheper, R.J., Tytgat, G.N., Borst, P., Baas, F. & Oude Elferink, R.P. (1997). A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **25**, 1539-42.
- Payne, D. (1988). Did medicated salt hasten the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*? *Parasitol Today* **4**, 112-5.
- Peel, S.A., Bright, P., Yount, B., Handy, J. & Baric, R.S. (1994). A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (pfmdr) of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am J Trop Med Hyg* **51**, 648-58.
- Penny, J.I., Hall, S.T., Woodrow, C.J., Cowan, G.M., Gero, A.M. & Krishna, S. (1998). Expression of substrate-specific transporters encoded by *Plasmodium falciparum* in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Biochem Parasitol* **93**, 81-9.
- Perbandt, M., Burmeister, C., Walter, R.D., Betzel, C. & Liebau, E. (2004). Native and inhibited structure of a Mu class-related glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **279**, 1336-42.
- Perelman, A., Uzan, A., Hacoheh, D. & Schwarz, R. (2003). Oxidative stress in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: various mechanisms for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification with different physiological roles. *J Bacteriol* **185**, 3654-60.
- Pesic, M., Markovic, J.Z., Jankovic, D., Kanazir, S., Markovic, I.D., Rakic, L. & Ruzdijic, S. (2006). Induced resistance in the human non small cell lung carcinoma (NCI-H460) cell line in vitro by anticancer drugs. *J Chemother* **18**, 66-73.
- Peters, J.M., Chen, N., Gatton, M., Korsinczky, M., Fowler, E.V., Manzetti, S., Saul, A. & Cheng, Q. (2002). Mutations in cytochrome b resulting in atovaquone resistance are associated with loss of fitness in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2435-41.
- Peters, W. (1985). The problem of drug resistance in malaria. *Parasitology* **90** ( Pt 4), 705-15.
- Peters, W., Howells, R.E., Portus, J., Robinson, B.L., Thomas, S. & Warhurst, D.C. (1977). The chemotherapy of rodent malaria, XXVII. Studies on mefloquine (WR 142,490). *Ann Trop Med Parasitol* **71**, 407-18.
- Peto, T.E. & Gilks, C.F. (1986). Strategies for the prevention of malaria in travellers: comparison of drug regimens by means of risk-benefit analysis. *Lancet* **1**, 1256-61.
- Petrovic, S., Pascolo, L., Gallo, R., Cupelli, F., Ostrow, J.D., Goffeau, A., Tiribelli, C. & Bruschi, C.V. (2000). The products of YCF1 and YLL015w (BPT1) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 561-71.
- Pickard, A.L., Wongsrichanalai, C., Purfield, A., Kamwendo, D., Emery, K., Zalewski, C., Kawamoto, F., Miller, R.S. & Meshnick, S.R. (2003). Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in pfmdr1. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2418-23.
- Piddock, L.J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**, 629-36.
- Pizzi, E. & Frontali, C. (2001). Low-complexity regions in *Plasmodium falciparum* proteins. *Genome Res* **11**, 218-29.
- Pollack, Y., Katzen, A.L., Spira, D.T. & Golenser, J. (1982). The genome of *Plasmodium falciparum*. I: DNA base composition. *Nucleic Acids Res* **10**, 539-46.
- Pologe, L.G., Pavlovec, A., Shio, H. & Ravetch, J.V. (1987). Primary structure and subcellular localization of the knob-associated histidine-rich protein of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl*

## Referências Bibliográficas

---

- Acad Sci U S A* **84**, 7139-43.
- Pomposiello, P.J. & Demple, B. (2002). Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol* **46**, 319-41.
- Pouvelle, B., Gormley, J.A. & Taraschi, T.F. (1994). Characterization of trafficking pathways and membrane genesis in malaria-infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* **66**, 83-96.
- Prades, C., Arnould, I., Annilo, T., Shulenin, S., Chen, Z.Q., Orosco, L., Triunfol, M., Devaud, C., Maintoux-Larois, C., Lafargue, C., Lemoine, C., Deneffe, P., Rosier, M. & Dean, M. (2002). The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058 amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon. *Cytogenet Genome Res* **98**, 160-8.
- Pradines, B., Pages, J.M. & Barbe, J. (2005). Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr Drug Targets Infect Disord* **5**, 411-31.
- Price, R.N. & Nosten, F. (2001). Drug resistant falciparum malaria: clinical consequences and strategies for prevention. *Drug Resist Updat* **4**, 187-96.
- Price, R.N., Uhlemann, A.C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., Nosten, F. & Krishna, S. (2004). Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfindr1 gene copy number. *Lancet* **364**, 438-47.
- Prieto-Alamo, M.J., Jurado, J., Gallardo-Madueno, R., Monje-Casas, F., Holmgren, A. & Pueyo, C. (2000). Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **275**, 13398-405.
- Purnelle, B. & Goffeau, A. (1997). The sequence of 32b on the left arm of yeast chromosome XII reveals six known genes, a new member of the seripauperins family and a new ABS transporter homologous to the human multidrug resistance protein. *Yeast* **13**, 183-8.
- Rager, N., Mamoun, C.B., Carter, N.S., Goldberg, D.E. & Ullman, B. (2001). Localization of the *Plasmodium falciparum* PfNT1 nucleoside transporter to the parasite plasma membrane. *J Biol Chem* **276**, 41095-9.
- Rahlfs, S. & Becker, K. (2001). Thioredoxin peroxidases of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem* **268**, 1404-9.
- Rahlfs, S., Nickel, C., Deponte, M., Schirmer, R.H. & Becker, K. (2003). *Plasmodium falciparum* thioredoxins and glutaredoxins as central players in redox metabolism. *Redox Rep* **8**, 246-50.
- Rahlfs, S., Schirmer, R.H. & Becker, K. (2002a). The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1024-41.
- Rahlfs, S., Schirmer, R.H. & Becker, K. (2002b). The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1024-41.
- Rahlfs, S., Schirmer, R.H. & Becker, K. (2002c). The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1024-41.
- Rangachari, K., Davis, C.T., Eccleston, J.F., Hirst, E.M., Saldanha, J.W., Strath, M. & Wilson, R.J. (2002). SufC hydrolyzes ATP and interacts with SufB from *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett* **514**, 225-8.
- Ranz, A. & Meshnick, S.R. (1989). *Plasmodium falciparum*: inhibitor sensitivity of the endogenous superoxide dismutase. *Exp Parasitol* **69**, 125-8.
- Rathore, D., Nagarkatti, R., Jani, D., Chattopadhyay, R., de la Vega, P., Kumar, S. & McCutchan, T.F.

## Referências Bibliográficas

---

- (2005a). An immunologically cryptic epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and induces protective antibodies that block liver cell invasion. *J Biol Chem* **280**, 20524-9.
- Rathore, D., Nagarkatti, R., Jani, D., Chattopadhyay, R., de la Vega, P., Kumar, S. & McCutchan, T.F. (2005b). An immunologically cryptic epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and induces protective antibodies that block liver cell invasion. *J Biol Chem* **280**, 20524-9.
- Raynes, K.J., Stocks, P.A., O'Neill, P.M., Park, B.K. & Ward, S.A. (1999). New 4-aminoquinoline Mannich base antimalarials. 1. Effect of an alkyl substituent in the 5'-position of the 4'-hydroxyanilino side chain. *J Med Chem* **42**, 2747-51.
- Reddy, M. & Gowrishankar, J. (1997). Identification and characterization of ssb and uup mutants with increased frequency of precise excision of transposon Tn10 derivatives: nucleotide sequence of uup in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 2892-9.
- Reddy, M. & Gowrishankar, J. (2000). Characterization of the uup locus and its role in transposon excisions and tandem repeat deletions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**, 1978-86.
- Reed, M.B., Saliba, K.J., Caruana, S.R., Kirk, K. & Cowman, A.F. (2000a). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **403**, 906-9.
- Reed, M.B., Saliba, K.J., Caruana, S.R., Kirk, K. & Cowman, A.F. (2000b). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **403**, 906-9.
- Reeve, J.G., Rabbitts, P.H. & Twentyman, P.R. (1990). Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with reduced EGF receptor expression in a human large cell lung cancer cell line. *Br J Cancer* **61**, 851-5.
- Renzoni, E.A., Abraham, D.J., Howat, S., Shi-Wen, X., Sestini, P., Bou-Gharios, G., Wells, A.U., Veeraraghavan, S., Nicholson, A.G., Denton, C.P., Leask, A., Pearson, J.D., Black, C.M., Welsh, K.I. & du Bois, R.M. (2004). Gene expression profiling reveals novel TGFbeta targets in adult lung fibroblasts. *Respir Res* **5**, 24
- Rieckmann, K., Suebsaeng, L. & Rooney, W. (1987). Response of *Plasmodium falciparum* infections to pyrimethamine-sulfadoxine in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **37**, 211-6.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. & et, a.l. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-73.
- Ritter, C.A., Jedlitschky, G., Meyer zu Schwabedissen, H., Grube, M., Kock, K. & Kroemer, H.K. (2005). Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev* **37**, 253-78.
- Rius, M., Nies, A.T., Hummel-Eisenbeiss, J., Jedlitschky, G. & Keppler, D. (2003). Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* **38**, 374-84.
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A. & Fink, G.R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5984-8.
- Roche, J., Guerra-Neira, A., Raso, J. & Benito, A. (2003). Surveillance of in vivo resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs from 1992 to 1999 in Malabo (Equatorial Guinea). *Am J Trop Med Hyg* **68**, 598-601.
- Rodriguez-Manzanque, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A. & Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 8180-90.

## Referências Bibliográficas

---

- Roninson, I.B., Chin, J.E., Choi, K.G., Gros, P., Housman, D.E., Fojo, A., Shen, D.W., Gottesman, M.M. & Pastan, I. (1986). Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4538-42.
- Rosario, V. (1981). Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science* **212**, 1037-8.
- Rosenberg, E., Litus, I., Schwarzfuchs, N., Sinay, R., Schlesinger, P., Golenser, J., Baumeister, S., Lingelbach, K. & Pollack, Y. (2006). *pfmdr2* confers heavy metal resistance to *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **281**, 27039-45.
- Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P. & Doyle, L.A. (1999). Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst* **91**, 429-33.
- Rubio, J.P. & Cowman, A.F. (1994). *Plasmodium falciparum*: the *pfmdr2* protein is not overexpressed in chloroquine-resistant isolates of the malaria parasite. *Exp Parasitol* **79**, 137-47.
- Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163-6.
- Saitoh, S., Ikeda, K., Koida, I., Tsubota, A., Arase, Y., Chayama, K. & Kumada, H. (1994). Serum des-gamma-carboxyprothrombin concentration determined by the avidin-biotin complex method in small hepatocellular carcinomas. *Cancer* **74**, 2918-23.
- Saliba, K.J. & Kirk, K. (1999). pH regulation in the intracellular malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. H<sup>+</sup> extrusion via a v-type h<sup>+</sup>-atpase. *J Biol Chem* **274**, 33213-9.
- Saliba, K.J. & Kirk, K. (2001). H<sup>+</sup>-coupled pantothenate transport in the intracellular malaria parasite. *J Biol Chem* **276**, 18115-21.
- Salinas, A.E. & Wong, M.G. (1999). Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem* **6**, 279-309.
- Sanchez, C.P., Stein, W. & Lanzer, M. (2003). Trans stimulation provides evidence for a drug efflux carrier as the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* **42**, 9383-94.
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O. & Rea, P.A. (2001a). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**, 30231-44.
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O. & Rea, P.A. (2001b). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**, 30231-44.
- Sarma, G.N., Savvides, S.N., Becker, K., Schirmer, M., Schirmer, R.H. & Karplus, P.A. (2003). Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. *J Mol Biol* **328**, 893-907.
- Sauvage, V., Millot, J.M., Aubert, D., Visneux, V., Marle-Plistat, M., Pinon, J.M. & Villena, I. (2006). Identification and expression analysis of ABC protein-encoding genes in *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* ATP-binding cassette superfamily. *Mol Biochem Parasitol* **147**, 177-92.
- Savas, B., Cole, S.P., Akoglu, T.F. & Pross, H.F. (1992). P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and cytotoxic effector cells. *Nat Immun* **11**, 177-92.
- Savvides, S.N., Scheiwein, M., Bohme, C.C., Arteel, G.E., Karplus, P.A., Becker, K. & Schirmer, R.H. (2002). Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J Biol Chem* **277**, 2779-84.

## Referências Bibliográficas

---

- Schmiesing, J.A., Ball, A.R. Jr, Gregson, H.C., Alderton, J.M., Zhou, S. & Yokomori, K. (1998). Identification of two distinct human SMC protein complexes involved in mitotic chromosome dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12906-11.
- Schmitt, L. & Tampe, R. (2002). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 754-60.
- Schmittgen, T.D. & Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* **46**, 69-81.
- Schwartz, E., Samuni, A., Friedman, I., Hempelmann, E. & Golenser, J. (1999). The role of superoxide dismutation in malaria parasites. *Inflammation* **23**, 361-70.
- Shani, N. & Valle, D. (1998). Peroxisomal ABC transporters. *Methods Enzymol* **292**, 753-76.
- Sharma, K.G., Mason, D.L., Liu, G., Rea, P.A., Bachhawat, A.K. & Michaelis, S. (2002). Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell* **1**, 391-400.
- Sharma, P., Pillai, C.R. & Devi Sharma, J. (2000). In vitro schizontocidal activity of standard antimalarial drugs on chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant isolates of *Plasmodium falciparum*. *Indian J Exp Biol* **38**, 1129-33.
- Sheehan, B.J., Bosse, J.T., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Kroll, J.S. & Langford, P.R. (2003). Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. *Infect Immun* **71**, 3960-70.
- Shen, D.W., Fojo, A., Chin, J.E., Roninson, I.B., Richert, N., Pastan, I. & Gottesman, M.M. (1986). Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification. *Science* **232**, 643-5.
- Shenton, D., Perrone, G., Quinn, K.A., Dawes, I.W. & Grant, C.M. (2002). Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 16853-9.
- Sidhu, A.B., Uhlemann, A.C., Valderramos, S.G., Valderramos, J.C., Krishna, S. & Fidock, D.A. (2006). Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* **194**, 528-35.
- Sienkiewicz, N., Daher, W., Dive, D., Wrenger, C., Viscogliosi, E., Wintjens, R., Jouin, H., Capron, M., Muller, S. & Khalife, J. (2004). Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **137**, 121-32.
- Silver, S. & Phung le, T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**, 587-605.
- Simoës, A.P., van den Berg, J.J., Roelofsen, B. & Op den Kamp, J.A. (1992a). Lipid peroxidation in *Plasmodium falciparum*-parasitized human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* **298**, 651-7.
- Simoës, A.P., van den Berg, J.J., Roelofsen, B. & Op den Kamp, J.A. (1992b). Lipid peroxidation in *Plasmodium falciparum*-parasitized human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* **298**, 651-7.
- Simoës, A.P., van den Berg, J.J., Roelofsen, B. & Op den Kamp, J.A. (1992c). Lipid peroxidation in *Plasmodium falciparum*-parasitized human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* **298**, 651-7.
- Singh, N. & Puri, S.K. (2000). Interaction between chloroquine and diverse pharmacological agents in chloroquine resistant *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Acta Trop* **77**, 185-93.
- Sisowath, C., Stromberg, J., Martensson, A., Msellem, M., Obondo, C., Bjorkman, A. & Gil, J.P. (2005).



## Referências Bibliográficas

---

- In vivo selection of *Plasmodium falciparum* pfm<sup>dr1</sup> 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem). *J Infect Dis* **191**, 1014-7.
- Skinner, T.S., Manning, L.S., Johnston, W.A. & Davis, T.M. (1996). In vitro stage-specific sensitivity of *Plasmodium falciparum* to quinine and artemisinin drugs. *Int J Parasitol* **26**, 519-25.
- Slater, A.F., Swiggard, W.J., Orton, B.R., Flitter, W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A. & Henderson, G.B. (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 325-9.
- Slovak, M.L., Lothstein, L., Horwitz, S.B. & Trent, J.M. (1988). Molecular/cytogenetic alterations accompanying the development of multidrug resistance in the J774.2 murine cell line. *Leukemia* **2**, 453-8.
- Smit, W.M., Oudemans-van Straaten, H.M. & Zandstra, D.F. (1990). Fulminant falciparum malaria. *Intensive Care Med* **16**, 517-9.
- Smith, M.L. & Fornace, A.J. Jr. (1995). Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol* **7**, 69-75.
- Spiller, D.G., Bray, P.G., Hughes, R.H., Ward, S.A. & White, M.R. (2002). The pH of the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole: holy grail or dead-end trail? *Trends Parasitol* **18**, 441-4.
- Srivastava, P., Puri, S.K., Kamboj, K.K. & Pandey, V.C. (1999). Glutathione-S-transferase activity in malarial parasites. *Trop Med Int Health* **4**, 251-4.
- Stocker, R., Hunt, N.H., Buffinton, G.D., Weidemann, M.J., Lewis-Hughes, P.H. & Clark, I.A. (1985). Oxidative stress and protective mechanisms in erythrocytes in relation to *Plasmodium vinckei* load. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 548-51.
- Suleimanov, S.D. (1994). [Drug-resistant tropical malaria in Angola]. *Med Parazitol (Mosk)* 8-10.
- Sullivan, A.D., Ittarat, I. & Meshnick, S.R. (1996a). Patterns of haemozoin accumulation in tissue. *Parasitology* **112** ( Pt 3), 285-94.
- Sullivan, D.J. Jr, Gluzman, I.Y. & Goldberg, D.E. (1996b). Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* **271**, 219-22.
- Surolia, N. & Padmanaban, G. (1991). Chloroquine inhibits heme-dependent protein synthesis in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4786-90.
- Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K. & Yanagida, M. (1999). Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev* **13**, 2271-83.
- Suzuki, H. & Sugiyama, Y. (1998). Excretion of GSSG and glutathione conjugates mediated by MRP1 and cMOAT/MRP2. *Semin Liver Dis* **18**, 359-76.
- Syafruddin, D., Asih, P.B., Aggarwal, S.L. & Shankar, A.H. (2003). Frequency distribution of antimalarial drug-resistant alleles among isolates of *Plasmodium falciparum* in Purworejo district, Central Java Province, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* **69**, 614-20.
- Syafruddin, D., Asih, P.B., Casey, G.J., Maguire, J., Baird, J.K., Nagesha, H.S., Cowman, A.F. & Reeder, J.C. (2005). Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* **72**, 174-81.
- Syafruddin, D., Asih, P.B., Coutrier, F.N., Trianty, L., Noviyanti, R., Luase, Y., Sumarto, W., Caley, M., van der Ven, A.J. & Sauerwein, R.W. (2006). Malaria in Wanokaka and Loli sub-districts, West Sumba District, East Nusa Tenggara Province, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* **74**, 733-7.

## Referências Bibliográficas

---

- Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 219-34.
- Szczyepka, M.S., Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S. & Thiele, D.J. (1994). A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem* **269**, 22853-7.
- Sztajer, H., Gamain, B., Aumann, K.D., Slomianny, C., Becker, K., Brigelius-Flohe, R. & Flohe, L. (2001). The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *J Biol Chem* **276**, 7397-403.
- Talisuna, A.O., Langi, P., Mutabingwa, T.K., Van Marck, E., Speybroeck, N., Egwang, T.G., Watkins, W.W., Hastings, I.M. & D'Alessandro, U. (2003a). Intensity of transmission and spread of gene mutations linked to chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine resistance in falciparum malaria. *Int J Parasitol* **33**, 1051-8.
- Talisuna, A.O., Langi, P., Mutabingwa, T.K., Watkins, W., Van Marck, E., Egwang, T.G. & D'Alessandro, U. (2003b). Population-based validation of dihydrofolate reductase gene mutations for the prediction of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **97**, 338-42.
- Talisuna, A.O., Nalunkuma-Kazibwe, A., Bakayita, N., Langi, P., Mutabingwa, T.K., Watkins, W.W., Van Marck, E., D'Alessandro, U. & Egwang, T.G. (2004). Efficacy of sulphadoxine-pyrimethamine alone or combined with amodiaquine or chloroquine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Ugandan children. *Trop Med Int Health* **9**, 222-9.
- Tammur, J., Prades, C., Arnould, I., Rzhetsky, A., Hutchinson, A., Adachi, M., Schuetz, J.D., Swoboda, K.J., Ptacek, L.J., Rosier, M., Dean, M. & Allikmets, R. (2001). Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene* **273**, 89-96.
- Tamura, A., Wakabayashi, K., Onishi, Y., Takeda, M., Ikegami, Y., Sawada, S., Tsuji, M., Matsuda, Y. & Ishikawa, T. (2007). Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Cancer Sci* **98**, 231-9.
- Tamura, A., Watanabe, M., Saito, H., Nakagawa, H., Kamachi, T., Okura, I. & Ishikawa, T. (2006). Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: identification of alleles that are defective in porphyrin transport. *Mol Pharmacol* **70**, 287-96.
- Tamura, N., Murakami, S., Oyama, Y., Ishiguro, M. & Yamaguchi, A. (2005). Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking. *Biochemistry* **44**, 11115-21.
- Tata, F., Stanier, P., Wicking, C., Halford, S., Kruyer, H., Lench, N.J., Scambler, P.J., Hansen, C., Braman, J.C., Williamson, R. & et, a.l. (1991). Cloning the mouse homolog of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Genomics* **10**, 301-7.
- Taylor, E.M., Moghraby, J.S., Lees, J.H., Smit, B., Moens, P.B. & Lehmann, A.R. (2001). Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18/Spr18 complex. *Mol Biol Cell* **12**, 1583-94.
- ter Kuile, F.O., Nosten, F., Luxemburger, C., Kyle, D., Teja-Isavatharm, P., Phaipun, L., Price, R., Chongsuphajaisiddhi, T. & White, N.J. (1995). Mefloquine treatment of acute falciparum malaria: a prospective study of non-serious adverse effects in 3673 patients. *Bull World Health Organ* **73**, 631-42.
- Thaithong, S. & Beale, G.H. (1981). Resistance of ten Thai isolates of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and pyrimethamine by in vitro tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **75**, 271-3.

## Referências Bibliográficas

---

- Tommasini, R., Evers, R., Vogt, E., Mornet, C., Zaman, G.J., Schinkel, A.H., Borst, P. & Martinoia, E. (1996). The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6743-8.
- Triglia, T., Stahl, H.D., Crewther, P.E., Scanlon, D., Brown, G.V., Anders, R.F. & Kemp, D.J. (1987). The complete sequence of the gene for the knob-associated histidine-rich protein from *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* **6**, 1413-9.
- Trotta, R.F., Brown, M.L., Terrell, J.C. & Geyer, J.A. (2004). Defective DNA repair as a potential mechanism for the rapid development of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* **43**, 4885-91.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* **41**, 1967-72.
- Turrens, J.F. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med* **25**, 211-20.
- Turrini, F., Ginsburg, H., Bussolino, F., Pescarmona, G.P., Serra, M.V. & Arese, P. (1992). Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. *Blood* **80**, 801-8.
- Tusnady, G.E., Sarkadi, B., Simon, I. & Varadi, A. (2006). Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Lett* **580**, 1017-22.
- Tyzack, J.K., Wang, X., Belsham, G.J. & Proud, C.G. (2000). ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* **275**, 34131-9.
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M. & Pastan, I. (1987). Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3004-8.
- Upston, J.M. & Gero, A.M. (1995). Parasite-induced permeation of nucleosides in *Plasmodium falciparum* malaria. *Biochim Biophys Acta* **1236**, 249-58.
- Ursos, L.M., DuBay, K.F. & Roepe, P.D. (2001). Antimalarial drugs influence the pH dependent solubility of heme via apparent nucleation phenomena. *Mol Biochem Parasitol* **112**, 11-7.
- Ursos, L.M., Dzekunov, S.M. & Roepe, P.D. (2000). The effects of chloroquine and verapamil on digestive vacuolar pH of *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. *Mol Biochem Parasitol* **110**, 125-34.
- Valderramos, S.G. & Fidock, D.A. (2006). Transporters involved in resistance to antimalarial drugs. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 594-601.
- van den Broek, I.V., Gatko, T., Lowoko, B., Nzila, A., Ochong, E. & Keus, K. (2003). Chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine efficacy for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Upper Nile, south Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **97**, 229-35.
- van Es, H.H., Karcz, S., Chu, F., Cowman, A.F., Vidal, S., Gros, P. & Schurr, E. (1994a). Expression of the plasmodial pfmdr1 gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. *Mol Cell Biol* **14**, 2419-28.
- van Es, H.H., Renkema, H., Aerts, H. & Schurr, E. (1994b). Enhanced lysosomal acidification leads to increased chloroquine accumulation in CHO cells expressing the pfmdr1 gene. *Mol Biochem Parasitol* **68**, 209-19.

## Referências Bibliográficas

---

- vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Campos, N.M. & Scaletti, J.V. (1992). Localization and characterization of hemoglobin-degrading aspartic proteinases from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta* **1122**, 256-64.
- Vanoni, C., Massari, S., Losa, M., Carrega, P., Perego, C., Conforti, L. & Pietrini, G. (2004). Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Cell Sci* **117**, 5417-26.
- Vazquez, A., Shen, B., Negaard, K., Iismaa, S. & Burgess, B. (1994). Overexpression of ferredoxin I in *Azotobacter vinelandii*. *Protein Expr Purif* **5**, 96-102.
- Vazquez de Aldana, C.R., Marton, M.J. & Hinnebusch, A.G. (1995). GCN20, a novel ATP binding cassette protein, and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 alpha kinase GCN2 in amino acid-starved cells. *EMBO J* **14**, 3184-99.
- Vennerstrom, J.L., Ager, A.L. Jr, Andersen, S.L., Grace, J.M., Wongpanich, V., Angerhofer, C.K., Hu, J.K. & Wesche, D.L. (2000). Assessment of the antimalarial potential of tetraoxane WR 148999. *Am J Trop Med Hyg* **62**, 573-8.
- Wada, M., Toh, S., Taniguchi, K., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Yoshida, I., Kimura, A., Sakisaka, S., Adachi, Y. & Kuwano, M. (1998). Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet* **7**, 203-7.
- Walker, E. & Brodie, C. (1982). *Plasmodium falciparum* malaria in Nigerians who live in Britain. *Br Med J (Clin Res Ed)* **284**, 956-7.
- Waller, K.L., Muhle, R.A., Ursos, L.M., Horrocks, P., Verdier-Pinard, D., Sidhu, A.B., Fujioka, H., Roepe, P.D. & Fidock, D.A. (2003). Chloroquine resistance modulated in vitro by expression levels of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. *J Biol Chem* **278**, 33593-601.
- Waller, R.F., Keeling, P.J., Donald, R.G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A.F., Besra, G.S., Roos, D.S. & McFadden, G.I. (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12352-7.
- Walliker, D., Hunt, P. & Babiker, H. (2005). Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta Trop* **94**, 251-9.
- Wang, P., Lee, C.S., Bayoumi, R., Djimde, A., Doumbo, O., Swedberg, G., Dao, L.D., Mshinda, H., Tanner, M., Watkins, W.M., Sims, P.F. & Hyde, J.E. (1997). Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol* **89**, 161-77.
- Wang, S., Hartley, D.P., Ciccotto, S.L., Vincent, S.H., Franklin, R.B. & Kim, M.S. (2003). Induction of hepatic phase II drug-metabolizing enzymes by 1,7-phenanthroline in rats is accompanied by induction of MRP3. *Drug Metab Dispos* **31**, 773-5.
- Ward, G.E., Miller, L.H. & Dvorak, J.A. (1993). The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes. *J Cell Sci* **106 ( Pt 1)**, 237-48.
- Ward, S.A. & Bray, P.G. (2000). Definitive proof for a role of pfm1 in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat* **3**, 80-81.
- Waterkeyn, J.G., Wickham, M.E., Davern, K.M., Cooke, B.M., Coppel, R.L., Reeder, J.C., Culvenor, J.G., Waller, R.F. & Cowman, A.F. (2000). Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *EMBO J* **19**, 2813-23.

## Referências Bibliográficas

---

- Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., do Rosario, V.E., Gwadz, R.W., Walker-Jonah, A. & Krogstad, D.J. (1990). Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature* **345**, 253-5.
- Wernsdorfer, W.H. (1991a). The development and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today* **7**, 297-303.
- Wernsdorfer, W.H. (1991b). The development and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today* **7**, 297-303.
- Wernsdorfer, W.H. & Noedl, H. (2003a). Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* **16**, 553-8.
- Wernsdorfer, W.H. & Noedl, H. (2003b). Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* **16**, 553-8.
- White, N.J. (1998). Drug resistance in malaria. *Br Med Bull* **54**, 703-15.
- White, N.J. (2003). The management of severe falciparum malaria. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 673-4.
- White, N.J. (2004). Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest* **113**, 1084-92.
- Williams, C.H., Arscott, L.D., Muller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D.M., Becker, K. & Schirmer, R.H. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem* **267**, 6110-7.
- Williamson, D.H., Gardner, M.J., Preiser, P., Moore, D.J., Rangachari, K. & Wilson, R.J. (1994). The evolutionary origin of the 35 kb circular DNA of *Plasmodium falciparum*: new evidence supports a possible rhodophyte ancestry. *Mol Gen Genet* **243**, 249-52.
- Wilson, R.J., Denny, P.W., Preiser, P.R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D.J., Moore, P.W. & Williamson, D.H. (1996). Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* **261**, 155-72.
- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I. & Williams, P.M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* **270**, 41-9.
- Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H. & Meshnick, S.R. (2002). Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* **2**, 209-18.
- Wood, B.R., Langford, S.J., Cooke, B.M., Glenister, F.K., Lim, J. & McNaughton, D. (2003). Raman imaging of hemozoin within the food vacuole of *Plasmodium falciparum* trophozoites. *FEBS Lett* **554**, 247-52.
- Woods, S.L. & Whitelaw, M.L. (2002). Differential activities of murine single minded 1 (SIM1) and SIM2 on a hypoxic response element. Cross-talk between basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim homology transcription factors. *J Biol Chem* **277**, 10236-43.
- World Health Organisation. (1997). World malaria situation in 1994. *Weekly Epidemiology Record* **269-276**.(Abstract)
- Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A.A., Koromilas, A.E., Zhou, L., Snider, M.D., Scheuner, D., Kaufman, R.J. & Hatzoglou, M. (2003). The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* **113**, 519-31.
- Yasui, K., Mihara, S., Zhao, C., Okamoto, H., Saito-Ohara, F., Tomida, A., Funato, T., Yokomizo, A.,

## Referências Bibliográficas

---

- Naito, S., Imoto, I., Tsuruo, T. & Inazawa, J. (2004). Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res* **64**, 1403-10.
- Yayon, A., Cabantchik, Z.I. & Ginsburg, H. (1984a). Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J* **3**, 2695-700.
- Yayon, A., Timberg, R., Friedman, S. & Ginsburg, H. (1984b). Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Protozool* **31**, 367-72.
- Zalis, M.G., Pang, L., Silveira, M.S., Milhous, W.K. & Wirth, D.F. (1998). Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *Am J Trop Med Hyg* **58**, 630-7.
- Zalis, M.G., Wilson, C.M., Zhang, Y. & Wirth, D.F. (1993). Characterization of the pfmdr2 gene for *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **62**, 83-92.
- Zaman, G.J., Versantvoort, C.H., Smit, J.J., Eijdem, E.W., de Haas, M., Smith, A.J., Broxterman, H.J., Mulder, N.H., de Vries, E.G., Baas, F. & et, a.l. (1993). Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. *Cancer Res* **53**, 1747-50.
- Zarchin, S., Krugliak, M. & Ginsburg, H. (1986). Digestion of the host erythrocyte by malaria parasites is the primary target for quinoline-containing antimalarials. *Biochem Pharmacol* **35**, 2435-42.
- Zhang, J., Krugliak, M. & Ginsburg, H. (1999). The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs. *Mol Biochem Parasitol* **99**, 129-41.
- Zhang, Y. & Hempelmann, E. (1987). Lysis of malarial parasites and erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX-chloroquine and the inhibition of this effect by proteins. *Biochem Pharmacol* **36**, 1267-73.
- Zhang, Y., Konig, I. & Schirmer, R.H. (1988). Glutathione reductase-deficient erythrocytes as host cells of malarial parasites. *Biochem Pharmacol* **37**, 861-5.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A. & Storz, G. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**, 4562-70.
- Zhou, J., Cheng, S.C., Luo, D. & Xie, Y. (2001). Study of multi-drug resistant mechanisms in a taxol-resistant hepatocellular carcinoma QGY-TR 50 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1237-42.



---

ANEXO 1

Meios de cultura para manutenção das culturas de parasitas e bactérias e preparação de eritrócitos não parasitados

**Meios de cultura de células:**

**Meio de cultura RPMI completo para *P. falciparum***

|                      |                    |
|----------------------|--------------------|
| RPMI 1640            | 1,04% (Sigma)      |
| HEPES                | 25mM (Sigma)       |
| Hipoxantina          | 6,8M (Sigma)       |
| Bicarbonato de Sódio | 0,2%               |
| AlbuMaxII            | 0,5% (Invitrogen™) |

**Meio de cultura Luria Broth (LB) líquido para *E. coli***

|                     |              |
|---------------------|--------------|
| Trintona            | 2% (Sigma)   |
| Extrato de levedura | 0.5% (Sigma) |
| NaCl <sub>2</sub>   | 10mM (Sigma) |

**Meio de cultura Luria Broth (LB) sólido para *E. coli***

Idêntica composição com adição de agar (2%)

**Preparação de eritrócitos não parasitados**

A partir de doadores humanos saudáveis, isentos de qualquer tipo de medicação, colhem-se 10 a 20 ml de sangue venoso em seringa com EDTA. O sangue é dividido em aliquotas de 5 ml, e centrifugado a 2000 rpm/5 min, junto com o sobrenadante é eliminada a fracção correspondente aos glóbulos brancos. A cada tubo são adicionados 10 ml de meio RPMI incompleto (sem o substituto do plasma AlbuMaxII), misturado por inversão, centrifugado a 2000 rpm/5 min e eliminado o sobrenadante, este passo é repetido 2 a 3 vezes. Ao *pellet* de eritrócitos é adicionado um volume igual de meio RPMI completo. Esta suspensão de eritrocitos (50%), é conservada a 4°C, durante um período máximo de 15 dias.



---

## ANEXO 2

### Principais soluções e tampões utilizados neste trabalho:

Fenol – fenol equilibrado com Tris (pH 8.0 fase fenóis)

Revelador BCIP/NBT – 1 ml de solução stock BCIP, 1 ml solução stock NBT, 100 ml tampão de revelação com MgCl<sub>2</sub>.

Solução de Coomassie – 50% Metanol, 25% Ácido acético, 1,5g de Coomassie Brilliant Blue<sup>®</sup> G-250 em dH<sub>2</sub>O.

Solução de descoloração de géis SDS-PAGE - 20% Metanol, 10% Ácido acético em dH<sub>2</sub>O.

Solução de fixação com paraformaldeído - 444µl solução de paraformaldeído, 50 µl PBS (10X), 5 µl Triton X-100 (10%)

Solução de paraformaldeído – 45 mg paraformaldeído, 2 µl NaOH (10N)

Solução fenol clorofórmio – solução constituída por uma mistura de fenol equilibrado: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v)

Solução stock BCIP - 15mg de BCIP em 1 ml de DMF (N,N-Dimetilformamida).

Solução stock NBT - 30mg de NBT em 1 ml de DMF a 70% (em ddH<sub>2</sub>O).

Tampão de aplicação para DNA (5X) Tris 50 mM (pH 8.0), EDTA 75 mM (pH 8.0), SDS 0.5%, sucrose 30%, ficol 10%, corante *Orange G* 0.25%.

Tampão de Laemmli (2X) – 20% Glicerol, 10% 2β-mercaptoetanol, 0,45% SDS, 17%

Tampão SDS-PAGE para gel de aplicação, 0,1mg Azul de Bromofenol.

Tampão de lise – Tris 40 mM (pH 8.0), EDTA 80 mM (pH 8.0), SDS 2%.

Tampão de neutralização (10X) - 0,1 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,5 mM Tween 20.

Tampão de revelação com MgCl<sub>2</sub> – 0,1 M Tris, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5.

Tampão de transferência (10X) – 5,8 % Tris, 2,8 % Glicina, 0,7 % SDS, 20% Metanol.

Tampão SDS-PAGE de electroforese – 3% Tris, 14,4% Glicina, 2% SDS.

Tampão SDS-PAGE para gel de aplicação (4X) - 0,5M Tris, e pH 6,8.

Tampão SDS-PAGE para gel de separação (4X) – 1,5M Tris, 0,4% de SDS e pH 8,8.

Tampão TBE (10X) – Tris 1 M, ácido Bórico 1 M, EDTA 50 mM.

Tampão TE – Tris-HCL 10mM (pH 8.0), EDTA 0.1 mM (pH 8.0).

**ANEXO 3**

Composição dos géis de electroforese de ácidos nucleicos e proteínas

| Géis de Agarose      | Gel separação<br>% de agarose |              |              |
|----------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
|                      | 0,6%                          | 2%           | 3%           |
| Tampão TBE (10X)     | 20 ml                         | 20 ml        | 20 ml        |
| Agarose              | 1,2 gr                        | 4 gr         | 6 gr         |
| dH2O                 | 180 ml                        | 180 ml       | 180 ml       |
| <b>Volume de gel</b> | <b>200 ml</b>                 | <b>12 ml</b> | <b>12 ml</b> |

| Géis SDS-PAGE                       | Gel<br>de aplicação | Gel de separação<br>% de acrilamida |              |              |
|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|
|                                     |                     | 5%                                  | 7,5%         | 12,5%        |
| Tampão SDS-PAGE<br>gel de aplicação | 2 ml                | -                                   | -            | -            |
| Tampão SDS-PAGE<br>gel de separação | -                   | 3 ml                                | 3 ml         | 3 ml         |
| dH2O                                | 5,13 ml             | 7,4 ml                              | 6,65 ml      | 5,15 ml      |
| Acril/Bisacril*                     | 0,8 ml              | 1,5 ml                              | 2,25 ml      | 3,75 ml      |
| SDS [10%]                           | 10 µl               | -                                   | -            | -            |
| Persulfato de amónio<br>[10%]       | 50 µl               | 100 µl                              | 100 µl       | 100 µl       |
| TEMED                               | 10 µl               | 15 µl                               | 15 µl        | 15 µl        |
| <b>Volume de gel</b>                | <b>8 ml</b>         | <b>12 ml</b>                        | <b>12 ml</b> | <b>12 ml</b> |

\*Solução pronta a usar de Acrilamida e Bisacrilamida (37,5:1) a 40% (Bioline).

# Anexos

## ANEXO 4

Domínios característicos da super-família ABC detectados por BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), em cada uma das 22 ORFs de *P. falciparum*. As sequências características, encontram-se assinaladas com o símbolo # . query - refere-se à sequência de *P. falciparum* em análise.

```
>PF14_0244
Feature 1
gi 50404998 31 .[4].EWDKLIIN.[13].LLNNLKGVMKPA.[1].FTAILGPSGSGKTTLLNLF.[12].GELMLNG.[12].MAYVMQ 124
query 18 .[4].EFSNVKYS.[7].ILHGIGKILLPK.[1].ITVIMGPSGSGKTTLLNLF.[9].GDFLIND.[10].MGYVLQ 100
gi 24581407 187 .[4].TFQNLNVL.[5].ILSDVSGFVSPC.[1].VLAIMGPSGSGKTTLLDCL.[8].GSVFLNR.[10].IGYVLQ 266
gi 45644964 381 .[4].SFENITYS.[12].VLNEISGIVKPG.[1].ILAIMGSGGAGKTTLLDIL.[10].GSIKVNG.[11].IGFVDQ 470
gi 23509466 18 .[4].EFSNVKYS.[7].ILHGIGKILLPK.[1].ITVIMGPSGSGKTTLLNLF.[9].GDFLIND.[10].MGYVLQ 100

Feature 1
gi 50404998 125 DD.[5].FSPREAFYFSAN MR.[35].GVSGGKRKRASIGVELLTNPPLIFLDEPTTGLDSSSTALQVIDLLKRL 227
query 101 DD.[5].LTVYETIEFTAK.[36].IR GISGGQKRRLSIANEILSNPPLLLMDEPTSGLDSSSALSVECIQRI 204
gi 24581407 267 EE.[5].LTLRETIVVYAL LR.[37].GLSGGKRRANACELLTNPLMLLDEPTSGLDSSSALSMLKVLKRY 371
gi 45644964 471 DD.[5].LTVFETVLNSAL LR.[37].GISGGKRRVSIACELVTSPVLVFLDEPTSGLDASNANNVIECLVRL 575
gi 23509466 101 DD.[5].LTVYETIEFTAK LK.[36].GISGGQKRRLSIANEILSNPPLLLMDEPTSGLDSSSALSVECIQRI 204

Feature 1
gi 50404998 228 .[6].IVSTIHQPSSSEIF.[2].FDRLMLLV.[1].GNIIYQG 264
query 205 .[7].IISLHQPPSSQVF.[2].FDRLIAIT.[1].GYIIYHG 242
gi 24581407 372 .[7].IVSVHQPSSQMP.[2].FDKLLLLH.[1].GRTAVYFG 409
gi 45644964 576 .[7].LVLSIHQPSSNIF.[2].FDKLVLLS.[1].GEMVYSG 613
gi 23509466 205 .[7].IISLHQPPSSQVF.[2].FDRLIAIT.[1].GYIIYHG 242

>PFMDR PFC0125w
Feature 1
1J7_A 15 VQFDVSF AY.[8].LQGLTFTLRP.[1].EVTALVGPNGSGKSTVAALLQN.[6].GQLLLD.[15].VAAVGQ 98
query 978 LIFENVDF.[3].KY.[5].LSNINLNFSN.[1].YTYGILCYNDGSKNYLAKLAAR.[6].GNILLD.[15].ISLVEE 1061
1Z2R_A 342 LEFRNVTF TY.[7].LRNINLKIPA.[1].KTVALVGRSGSGKSTIASLITR.[6].GHILMD.[15].VALVSQ 424
gi 49478052 344 IQFKNVSF TY.[7].LSNINLDIRP.[1].ENIIIVGNSGSGKTTLIKCLTG.[6].GAILID.[15].ISVVEQ 426
gi 134967 357 LTFANVSF SY.[8].LKNVSLNFSN.[1].QFTFIVGNSGSGKSTLSNLLLR.[6].GSISIN.[15].ITVVEQ 440

Feature 1
1J7_A 99 .[3].VFGRSLQENI.[43].L.[76]. 231
query 1062 .[3].IFSDSIIYNM L.[76]. 1151
1Z2R_A 425 .[3].LFNDTVANNI.[43].L.[74]. 555
gi 49478052 427 .[3].RYEFSVSDNI.[46].L.[74]. 560
gi 134967 441 .[3].LFNDTLRKNI.[52].L.[74]. 580

Feature 1
gi 29429182 1077 .[122].FIAELP.[2].FETRVGDR.[2].QLSGGQKQRIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEKVVQEQALDRA 1263
query 1126 .[123].VINSYP.[2].FFHNINDK ILSGGQKQKISLARAIKPKILLDADFALDAANELKIFSSLKNY 1311
gi 46097737 1266 .[123].FVRGLP.[2].FDTEIGFK.[2].QLSGGQKQRIARALVRNPKILLLDEATSALDADSEIQVQRALDRA 1453
gi 50252693 367 .[120].FIDKLP.[2].LDTMVGHEH.[2].QLSGGQKQRIARALVRNPKILLLDEATSALDADSEIHEVQDALNNI 551
gi 57472150 327 .[120].FINEKM.[4].INTHVGNV.[2].QLSGGQKQRIARAFIKPKILLLDEATSALDKRNEKEVQGAIDRI 513

Feature 1
gi 29429182 1264 .[2].GRTCVIAHRLNTV.[2].ADCIAVVS.[1].GTIIIEKGTHTQL.[4].GAYY.[6]. 1316
query 1312 .[2].NCTIIVNLSHKITTV.[2].CDYIYVLK.[1].GKIIEHGLRKL.[4].NSEY.[6]. 1364
gi 46097737 1454 .[2].NRTTIVIAHRLSSL.[2].CDWIFVVE.[1].GKIRESGTHADL.[4].GRYR.[6]. 1506
gi 50252693 552 .[2].NRTTIVIAHRLSTV.[2].ADTISVLH.[1].GQLVEQPHAEEL.[5].GAYY.[6]. 605
gi 57472150 514 .[6].SITTVVIAHRLSTI.[2].SDNIIIVMQ.[1].GKIIEQGDHNTL.[6].GTYA.[6]. 572

>PFC0875w
Feature 1
1VPL_A 16 VVKDLRRI.[5].LKGISFEIE.[3].IFGLIGPAGKTTTLRIIST.[3].PSSGIV.[152]. 224
query 924 LIIQNVNKFY.[5].LKDVSILTLR.[3].IPVLLGENGSGKSTLINIITK.[3].KDSGEI.[154]. 1134
gi 17135055 2 LNHNLNKSY.[5].LQDLTLNII.[3].VYGLLGANGSGKTTINIICN.[3].ADSGDI.[149]. 207
gi 29337598 3 IITKLNLIKY.[6].LKDVNLEIP.[2].MFGLLGPNAGKSTLMRLIVA.[3].PTSGQV.[153]. 212
gi 55847608 4 LDIQNLNFKY.[5].LKNINLTLE.[3].ILGLVGENGAGKSTLMKLSG.[3].NYEGDI.[138]. 198

Feature 2
gi 19110834 481 .[81].IGLCHQSNIL.[3].FTCAEHIALYSLRKG.[40].LSGGMKRLCLPISLIG.[1].PSILLLDEP.[60]. 716
query 977 .[102].ISYCSQNVIL.[3].LTFYETIKIFLLYYN.[31].LMDEVKKKISIFICFLV.[1].RDIYILDEP.[26]. 1190
gi 22096341 1379 .[69].IGYCPQFDAL.[3].LTGRESLEILAQMHG.[27].YSGGQKRKISVGVALLA.[1].TQMIIILDEP.[62]. 1591
gi 30688749 1393 .[80].IGYCPQFDAL.[3].LTVKEHLELYARIK.[29].LSGGNKRKLSVAIAMIG.[1].PPIVILDEP.[63]. 1619
gi 42733877 436 .[100].IGSCAQNDIL.[3].LTIYEHLYLFSRLKS.[31].LSGGKRRKLSVACCLIG.[1].PQVLLDEP.[60]. 681

Feature 2
gi 66841731 530 .[87].L.[3].LTVAEHLYFYAQLKG.[29].LSGGMRRKLSIGIALIA.[1].SKVLILDE.[63]. 751
query 1265 .[90].L.[3].MSIYEHFKIILTFKN.[31].LSGGMKRVVLMINLLR.[1].DKIIFLDE.[64]. 1492
gi 7387524 530 .[87].L.[3].LTVAEHLYFYAQLKG.[29].LSGGMRRKLSIGIALIA.[1].SKVLILDE.[63]. 751
gi 19110834 481 .[90].L.[3].FTCAEHIALYSLRKG.[40].LSGGMKRLCLPISLIG.[1].PSILLLDE.[63]. 716
gi 50405241 315 .[83].L.[3].LKVIEMLIFMGRVKG.[29].LSGGSKRRLSLAIALIG.[1].SSVIFLDE.[64]. 533

>PFA0590w PFMRP1
Feature 1
1XMI_E 5 .[49].LKDINFKIER.[1].QLLAVAGSTGAGKSTLLMMIMG.[6].GKIKHS.[2].ISFCSQ.[2].WIMPGTIKEN 118
query 627 .[49].LKNINFLKR.[1].SLAIIIGNVSGSKSAFFHSILG.[6].GNLYIE.[7].ILYVPO.[2].WLFMGNIRSM 745
1R0Z_C 5 .[49].LKNINLNIEK.[1].EMLAITGSGTSGSKSTLLMLIG.[6].GLIKHS.[2].VSFCSQ.[2].WIMPGTIKEN 118
gi 2492599 577 .[20].LKNLNFTIPR.[1].QFTLVVSGTSGSKSTLAMALLG.[6].GKMTTP.[5].IAYVPO.[2].WLRNGTIRSN 664
gi 6920083 627 .[19].LKNINFOAKK.[1].NLTCIVGVGSGKSTALLSCMLG.[6].GFATVH.[2].VAYVSQ.[2].WIMNGTVKEN 710
```

# Anexos

```
Feature 1 #####
1XMI_E 119 ILAG.[7].YRSVIKACQLEEDISKFA.[1].KDNIVLGEKG.[1].TSLGGQRRARISLARAVY.[60]. 236
query 746 ILFG.[7].YKVTILQSELLNDLSTIE.[1].GDMKYINDDH NLSKGGQKVRICLARALY.[65]. 867
1R0Z_C 119 IIFG.[7].YKSVVKACQQLQDITKFA.[1].QDNTVVLGEKG.[1].TSLGGQRRARISLARAVY.[60]. 236
gi 2492599 665 ILFG.[7].YFQIITKACCLDSDLNISMN.[1].GDLTYIHSNG.[1].SLSGGQKQVSLARALY.[64]. 786
gi 6920083 711 ILFG.[7].YEKTIKACALITIDLAILM.[1].GDKTLVGEKG.[1].SLSGGQKARLSLARAVY.[62]. 830

NBD1
Feature 1 #####
gi 19172032 596 .[2].IIFENVVMSYRQ.[ 4].VLKGISFEIKAGEKIGICGRTGSGKSSLLALFR.[6].GRIIIDG.[8].KDLRSQ 674
query 1540 .[2].IKFENVVYSYK.[16].SLKNINMYALKNGKIGIVGKSGAGKSTILLSILG.[6].GKITVEG.[8].KGEDSI 1630
gi 6920083 1270 .[2].IKFNYSYRYP.[ 4].VLKHINHIKPNKGVIGRTGAGKSSLTALFR.[6].GNIVIDN.[8].YDLRHK 1348
gi 54656628 870 .[2].IEFHDLRLRYKP.[ 4].VLNSISCNHHPKGVVGRGTGAGKSSIFISILR.[6].GCIKIDD.[8].FDLRSR 948
gi 19172036 1061 .[2].IQFNVEIKYRP.[ 4].SLKNISFDIKSNEKIGIVGKSGKSTTMLALFR.[6].GSIHIDG.[8].SKLRNS 1139

Feature 1 #####
gi 19172032 675 LAIIPQEP.[1].MF TGTLRNSLDS.[5].DSELWDVLK.[21].VNDN WSQGQKQIGLGRALLK 751
query 1631 IGLAQSS.[1].VF.[1].NWNIRTFIDP.[5].DDEIVHALK.[36].SNDN.[3].LTNDCIRYLSLVRLYLN 1726
gi 6920083 1349 LSIIPQDS.[1].VF EGTVRENIDP.[5].DEATWRALB.[22].GGGN LSVGQKQLLCLARAMLV 1426
gi 54656628 949 ISIIPQDP.[1].IF SGTIRFNLDP.[5].DEEYQALK.[21].GGQI LSAGQKQLLCLARALLR 1025
gi 19172036 1140 IGICPQEP.[1].IF SGTIRKNIDP.[5].DSEIWLALB.[20].EQAN LSFQKQLLCLTRVLLK 1215

Feature 1 #####
gi 19172032 752 .[1].P KILVCEA TASVDSLSE LIQR IIREKF.[3].IILTIAHRLNTIVESDRIMVL 805
query 1727 .[1].H.[2].KIILDEI.[5].NNSVHDELNS.[1].LIGK.[6].IIRNHF.[3].TVLIISHHANTLSCDDYIYVL 1794
gi 6920083 1427 .[1].S KILVLDEA TAADVETDK VVQE TIRTA.[3].TILTIHRLNTIMSDRIIVL 1480
gi 54656628 1026 .[1].S KLVLLDEA TSSVDSHTS LIQK TIRAEF.[3].TILAVARVQTVLDYDKIMVL 1079
gi 19172036 1216 .[1].P KLVFFDEH SSSIDYPTAH QLNI SVKENI.[3].TTLTIAHRLNTIIDSRIIVL 1269

gi 19172032 806 DSGSI.[6]. 816
query 1795 RKGEI.[6]. 1805
gi 6920083 1481 DNGKV.[6]. 1491
gi 54656628 1080 DSGKI.[6]. 1090
gi 19172036 1270 DSGEL.[6]. 1280
>PFE1150w Pfmdr1

NBD1
Feature 1 #####
gi 126932 394 LEFNDVHFSYPSRANVKILKGLNLKQVQSGQTALVGSAGCGKSTTVQLIQRLYDPDEGTINI DG.[5].FNVNVL 468
query 378 IEFKNVRFHYDTRKDVVEIKDLSFTLKEGKTYAFVGSAGCGKSTILKLIERLYDPTEGDIIV.[1].DS.[5].INLKW 453
gi 126936 378 IEFKNVRFHYDTRKDVVEIKDLSFTLKEGKTYAFVGSAGCGKSTILKLIERLYDPTEGDIIV ND.[6].INLKW 453
gi 833699 402 IEFKNVIFTYPSRKDIQVLKGLNLNIPSGKTIALVGSAGCGKSTTVQLIQRVYDPDEGVIITL DG.[5].LNIRYL 476
gi 27656757 426 IEFKNIHFNPSRPEVKILNMSLSVKSQQTIALVGSAGCGKSTTVQLIQRVYDPDEGVAFTI DG.[5].LNIRYL 500

Feature 1 #####
gi 126932 469 REIIGVVSQEPVLFSTTIAENICYG.[20].FIMKLP.[2].FDTLVGERGALQSGGQKRIATARALVRNPKILLDEA 559
query 454 RSKIGVVSQDPLFLFSNSIKNNIKYS.[65].FVSSLP.[2].YDTLVGSNASKLSGGQKRIATARAIMRNPKILLDEA 589
gi 126936 454 RSKIGVVSQDPLFLFSNSIKNNIKYS.[65].FVSSLP.[2].YDTLVGSNASKLSGGQKRIATARAIMRNPKILLDEA 589
gi 833699 477 REIIGVVSQEPILFDTTADNIRYG.[20].FIMKLP.[2].LETLVGERGTQLSGGQKRIATARALVRNPKILLDEA 567
gi 27656757 501 REMIGVVSQEPVLFATTITENIRYG.[20].FIMNLP.[2].FETLVGDRGTQLSGGQKRIATARALVRNPKILLDEA 591

Feature 1 #####
gi 126932 560 TSALDTESEAEVQAALDKA.[2].GRTTIVIAHRLSTV.[2].ADVIAGFE.[1].GVIVEQGSSEL.[4].GVYFKL 627
query 590 TSSLDNKSEYLVQKTIINL.[4].NRTITIAHRLSTI.[2].ANTIFVLS.[31].SYIEQGTSDLS.[5].GIYHLM 690
gi 126936 590 TSSLDNKSEYLVQKTIINL.[4].NRTITIAHRLSTI.[2].ANTIFVLS.[31].SYIEQGTSDLS.[4].NGIYHL 689
gi 833699 568 TSALDTESEAEVQAALDKA.[2].GRTTIVIAHRLSTI.[2].ANALAGFD.[1].GVIVEQGSSEL.[4].GVYFNL 635
gi 27656757 592 TSALDAESETIVQAALDKV.[2].GRTTIVIAHRLSTI.[2].ADVIAGFS.[1].GKIVEQGTHSQL.[4].GVYHGL 659

Feature 1
gi 126932 628 VNMQ 631
query 691 INNQ 694
gi 126936 690 MINN 693
gi 833699 636 VTLQ 639
gi 27656757 660 VTMQ 663

NBD2
Feature 1 #####
gi 126932 1034 ITFNEVFNYPTRANVPVLQGLSLEVKKQQTALVGSAGCGKSTTVQLLRFYDP LAGTVLLDG.[ 5].LNVQ 1106
query 1126 VDKDKNVFRYISRPVPIYKNLSFTCDKSKTTAIVGETGSGKSTFMNLLRFYDL.[47].NNGEILLDD.[ 5].YNLR 1245
gi 126936 1126 VDKDKNVFRYISRPVPIYKNLSFTCDKSKTTAIVGETGSGKSTFMNLLRFYDL KNDHIILNK.[52].YNLR 1245
gi 3849833 368 VELKNVDFSYSPRPDVKILNFCVSPAGKTIALVGSAGCGKSTTVSLIERFYDP NSGVLLDG.[ 5].LKLK 440
gi 22655312 368 VELKNVDFSYSPRPDVKILNFCVSPAGKTIALVGSAGCGKSTTVSLIERFYDP NSGVLLDG.[ 5].LKLK 440

Feature 1 #####
gi 126932 1107 WLRQQLGLVVSQEPILFDCSIAENIYAG.[22].FIETLP.[2].YETRVGDKGTQLSGGQKRIATARALIRQPILLDD 1199
query 1246 DLRNLFVSIVSQEPMFNMSIYENIKFG.[20].FIESLP.[2].YDTNVPYKGLSAGGQKRIATARALLREPKILLDD 1336
gi 126936 1246 DLRNLFVSIVSQEPMFNMSIYENIKFG.[20].FIESLP.[2].YDTNVPYKGLSAGGQKRIATARALLREPKILLDD 1336
gi 3849833 441 WLRQQLGLVVSQEPALFATSIKENILLG.[20].FIKLP.[2].FDTQVGERGLQLSGGQKRIATARAMLKNPAILLDD 531
gi 22655312 441 WLRQQLGLVVSQEPALFATSIKENILLG.[20].FIKLP.[2].FDTQVGERGLQLSGGQKRIATARAMLKNPAILLDD 531

Feature 1 #####
gi 126932 1200 EATSALDTESEKVVQ EALDKA.[2].GRTCVIAHRLSTI.[2].ADLIVVQ.[1].GRVKEGHGTHQQL.[4]. 1263
query 1337 EATSALDSDNSEKLEI.[2].IVDIK.[2].DKTITIAHRIASI.[2].SDKIVVFN.[6].TFVQSHGTHDEL.[5]. 1408
gi 126936 1337 EATSALDSDNSEKLEI KTIVDI.[4].DKTITIAHRIASI.[2].SDKIVVFN.[6].TFVQSHGTHDEL.[5]. 1408
gi 3849833 532 EATSALDSESEKLVQ EALDRF.[2].GRTTITIAHRLSTI.[2].ADLVAVLQ.[1].GSVSEIGTHDEL.[6]. 597
gi 22655312 532 EATSALDSESEKLVQ EALDRF.[2].GRTTITIAHRLSTI.[2].ADLVAVLQ.[1].GSVSEIGTHDEL.[6]. 597

Feature 1
gi 126932 1264 GIYFSMVSQ 1273
query 1409 GIYKVKVLA 1418
gi 126936 1409 GIYKVKVLA 1418
gi 3849833 598 GVIYAKLIKMQ 607
gi 22655312 598 GVIYAKLIKMQ 607
>PFL1410c PFMRP2

Feature 1 #####
1XMI_E 5 VVMENVTAF.[40].LKDINFKIER.[1].QLLAVAGSTGAGKTSLLMMIMG.[6].GKIKHS.[2].ISFCSQ.[2].W 109
query 758 INMKNCYFS.[ 8].LKNINLTKN.[1].SVVILGNVGSAGKTIFFYSLLG.[6].GSFYLK.[8].ILVVPQ.[2].W 836
1R0Z_C 5 IIMENVTAF.[40].LKNINLNIEK.[1].EMLAITGSTGSGKTSLLMLILG.[6].GLIKHS.[2].VSFCSQ.[2].W 109
gi 2492599 577 FVFEINTSLS.[11].LKNLNFTIPR.[1].QFTLVVSGTSGGKSTLAMALLG.[6].GKMTTP.[5].IAYVPO.[2].W 655
gi 37694080 611 VRVQAGNFS.[ 9].LRNVNLRVNR.[1].EKVAVCGPVGSGKSSLLYALLG.[6].GSVEVF.[2].VAYVVS.[2].W 684
```

# Anexos

```
Feature 1 #####
1XMI_E 110 IMPGTIKENIAG.[7].YRSVIKACQLEEDISKFA.[1].KDNIVLGEQG.[1].TSLGGQRRARISLARAVYK.[59]. 236
query 837 ISLGTIRSMILFG.[7].YYDVIVKSELPHDIISFK.[1].KDMRYISDEH SLSKGGQKARICLARALYH.[63]. 966
1R0Z_C 110 IMPGTIKENIIFG.[7].YKSVVKACQQLQDITKFA.[1].QDNTVLGEQG.[1].TSLGGQRRARISLARAVYK.[59]. 236
gi 2492599 656 LRNGTIRSNILFG.[7].YFQIKAACCLSDLSMNM.[1].GDLTYIHSNG.[1].SLSGGQKQVSLARALYS.[63]. 786
gi 37694080 685 IQSGTVRDNILFG.[7].YDKAIKSCALDKDIENFD.[1].GDLTEIGQRG.[1].NMSGGQKQRIQLARAVYS.[59]. 811

##### ##
gi 6920083 1270 .[18].VLKHINIHKPNKVGIVGRTGAGKSSLTALFR.[6].GNIVIDN.[8].YDLRHKLSIIPQDS.[1].VFEG 1361
query 693 .[18].CLKNINIYALKNQKIGIVGKSGAGKSTMLSLG.[6].GRITIEG.[8].DERKNMIGVLPQSS.[1].VFFH 784
gi 19172034 1099 .[18].NLKDLDFKQVSEKIGIVGRTGAGKTTIASSLFR.[6].GLLIDG.[8].QKLRSSIGIVPQDP.[1].IFTG 1190
gi 19172036 1061 .[18].SLKNISFDIKSNEKIGIVGKSGKSTMLALFR.[6].GSIHIDG.[8].SKLRNSIGICPQEP.[1].IFSG 1152
gi 50404890 1028 .[18].ALRGLSVMIKRQEKIGVVRTGAGKSTVTLSSLR.[6].GSIIDG.[8].KQLRESITMILQDS.[1].LFEG 1119

##### #####
gi 6920083 1362 TVRENIDP.[5].DEAIWRALE.[22].GGNLSVQGRQLLCLARMLV.[1].S KILVLDE ATA 1438
query 785 .[1].NIRTFIDP.[5].DDEIVDAFK.[43].NSISLSEDCIRYLSLVRFLN.[1].H.[2].KLILIDE.[1].PVL 886
gi 19172034 1191 TIRSNIDP.[5].DFEIWESVE.[22].GDNGFVQKQLLCLCRTILK.[1].F KIIIMDE ATS 1267
gi 19172036 1153 TIRKNIDP.[5].DSEIWLALE.[20].EQANLSFQKQLLCLTRVLLK.[1].P KLVFFDE HSS 1227
gi 50404890 1120 SLRENLDP.[5].DQELNDVAL.[20].NGDNLSAGEKQLISARAVLK.[1].S QIILIDE ATA 1194

#
gi 6920083 1439 AVDVETDKV VQE TIRTAFA.[3].TILTIHRLNTIMSDRIIVLDNGKVA.[5]. 1491
query 887 NFCYNTKKL.[7].IKS.[3].IIRTF.[3].TVLIIHADASTLSCDFIYVIKGEVV.[5]. 949
gi 19172034 1268 SIDYHTAQL IKQ TIQENF.[3].TTLTIAHRLLETIDCNKIAVIDSGQLI.[5]. 1320
gi 19172036 1228 SIDYFTAQ LNI SVKENT.[3].TTLTIAHRLTIDSDRILVIDSGELI.[5]. 1280
gi 50404890 1195 NIDIDTESK IQQ TIQTAF.[3].TVITIAHRLTIMHCDKILVIDQGEAK.[5]. 1247

>PF14_0321
Feature 1 #####
gi 41018446 6 .[15].LDNVNLIYK.[2].VVAILGPNAGKTTLLKIL.[3].VFPDKGEVYF.[22].VGFVFQNPDMVLF.[3].V 103
query 6 .[19].LQNVNLCFER.[2].RILVCGKNGAGKSTLLSII.[3].KLIKENEVLI.[14].IGYVGEWSEEYA.[3].S 99
gi 21226989 48 .[16].LDRINLIYR.[2].RVAVLGANGAGKSTLFLKHL.[3].LRPLSGEVLV.[16].VGVIVQDPPDQVL.[3].V 140
gi 3915966 8 .[17].LDGVSQVYE.[2].WLAIVGHNGSGKSTLARAL.[3].ILPESGDIEV.[16].IGMVFQNPDMQFF.[3].V 101
gi 15642995 4 .[19].LENVSLVINE.[2].LLLVAGNTGSGKSTLLQIV.[3].IPTSQDVLV.[13].IGIAFYQYDQFF.[3].V 96

Feature 1 #####
gi 41018446 104 WDEVAF.[34].LSGGEKKVSIICSLVPEVILMDEPALSALPKSRAEIMN.[34]. 218
query 100 IKDFCF.[25].LSKGERKKVQIMVNIIVRDKDIYIFDEATESLDDLVRKLLLE 171
gi 21226989 141 EEDVAF.[35].LSGGQKLVIAAGILAMRPEVIVLDEPTAGLDPSSARVLK.[37]. 259
gi 3915966 102 RDDVAF.[35].LSGGQKQVVAIAGVIAARPDIIILDEATSMDFIGREVELE.[36]. 219
gi 15642995 97 FDEVAF.[36].LSGGEKRRVAIASVIVHEPDILILDEPLVGLDREGKTDLLR.[36]. 215

>PF08_0078
Feature 1 #####
gi 49479184 301 .[19].NLSIYE.[2].IVALLGHNGAGKSTLAHSL.[164]. 510
query 975 .[20].NLNINS.[2].NVLLLGKNGIGKSTLFLKIL.[172]. 1193
gi 41018446 6 .[19].NLNIYK.[2].VVAILGPNAGKTTLLKIL.[167]. 218
gi 21226989 48 .[20].NLRIYR.[2].RVAVLGANGAGKSTLFLKHL.[165]. 259
gi 47573642 3 .[19].TLRIEA.[2].KVVLLGPNAGKSTLFLKIL.[166]. 214

>PF13_0218
NBD1
Feature 1 #####
1J7_A 15 VQFQDVSFAY.[ 8].LQGLTFTLRP.[1].EVTALVGPNGSGKSTVAALLQN.[6].GQLLLD.[15].V AAVG 97
query 576 IRFENVFSYS.[11].LKNINLEIKA.[1].EKVAIIGKSGSGKSTLWKLTC.[5].GNIFID.[15].I.[1].SVSE 661
gi 42528052 296 ISFENMSFSY.[19].LKNVNLVSKK.[1].EKVLIVGEGSGKSTLLSLLYK.[6].GLIKID.[15].V SVVH 389
gi 1352002 436 ITFENVTFGY.[ 6].LKNASFTIPA.[1].WKTAVIGSGSGKSTLKLKLVFR.[6].GRILIN.[15].I GVVP 516
gi 48478048 334 IKFENVFSYS.[ 5].LKNINFLSKR.[1].EKLAIIKGTGAGKSTLINLLLR.[6].GEIKID.[15].F GVIL 413

Feature 1 # ###
1J7_A 98 Q.[3].VFGRSIQENI.[43].LSG.[74]. 231
query 662 Q.[3].IFNRTIYENL IYG.[76]. 754
gi 42528052 390 Q.[3].IFDDTIKNNI.[42].ISG.[73]. 521
gi 1352002 517 Q.[3].LFNDTIWENV.[42].ISG.[74]. 649
gi 48478048 414 Q.[3].LFNGSIMDNI.[39].LSQ.[70]. 539

NBD2
Feature 1 #####
1Z2R_A 342 .[119].DFINKMDNGLDITIGEN.[2].LLSGGQRRARISLARALLRDSFILDEATESALDTERAIQAALDELQKNR 530
query 686 .[120].QFINSMPHNHSNIQYN NMSGGQKRLSIIIRSLMKDTPYIFDEITSFLDEGNIHKHLKILIDLIPNK 873
1JSQ_H 342 .[119].DFINKMDNGLDITIGEN.[2].LLSGGQRRARISLARALLRDSFILDEATESALDTERAIQAALDELQKNR 530
gi 34397664 380 .[116].DFINQMEPGYQSNIGDR.[2].KLSGGQRRARISLARALLRDSFILDEATESALDTERAIQAALDELQKNR 565
gi 67932509 362 .[119].EFITRLPEGYETVIGDR.[2].KLSGGQRRARISLARALLRDSFILDEATESALDTERAIQAALDELQKNR 550

Feature 1 #####
1Z2R_A 531 TSLVIAHRLSTIEQADEIVVVEDGIIVERGTHSEL.[11]. 576
query 874 TIIYITHSIHLNKMCKIIILDDGKIRAIQTYEQI.[11]. 919
1JSQ_H 531 TSLVIAHRLSTIEKADEIVVVEDGIIVERGTHNDL.[11]. 576
gi 34397664 566 TAVIAHRLTIRNADIICVLEHGRIVEQRHDEL.[11]. 611
gi 67932509 551 TVVIAHRLSTIRRADKIVVLEKQIRETGTHEEL.[11]. 596

>PF13_0271
Feature 1 #####
gi 70672294 445 .[43].VDAGKVAIVGSPGVGKSTLILKLFMDFPASPSTVRIDDQVKELDLHFRQIGVVPQDMVLFNDTIEFNKY 561
query 790 .[43].IENGEKVAIIGKSGSGKSSLIKLLKFFYVNSGNIYIDNKNIDDLTYLRKNIISVVPQDITLFNNTISYNIKY 906
gi 48994309 363 .[23].IRPGERVAIVGSGSGKSTLAKLLFRFVDPQEGSVQVNGEDIRDYVNLKSRFRIRGVVPQDVLVFNNTIYNNIRY 459
gi 52075613 482 .[23].VPAGKVAIVGTSVSGKSTLIRLLFRFDDSSSGSIRIDGQDIREVTLDSLRKCIIGVVPQDITLFNNTIKHNIQY 578
gi 18496822 460 .[23].CBGGRRAIVGSSGSGKSTLIRLLRYFYDVSSGSIEIDGQDIRGILQLESRLKHIIGVVPQDITLFNNTIYNNIAY 556

Feature 1 #####
gi 70672294 562 GCPSA.[8].AKQAEIDVIMRMPQGYSTVVGGERGLKLSGGERQRIARCLLRNPAIVFDEATESALDSHTEQKILKAF 644
query 907 GNFQC.[8].SIKAEHLHKIMKMNKYDTIVGERGKLSIGEKQRIARCLLRNPAIVFDEATESALDSHTEQKILKAF 644
gi 48994309 460 GNLA.[8].AKVADLHRSVEEMNFYDTIVGERGKLSGGERQRIARCLLRNPAIVFDEATESALDSHTEQKILKAF 542
gi 52075613 579 GRISA.[8].ARRAAIHDTIMNFPDKYNTVVGGERGLKLSGGERQVRSIARVFLKEPSILLDEATESALDSHTEQKILKAF 661
gi 18496822 557 GNPNA.[8].ARRAAIHVILNKMNGYDTIVGERGKLSGGERQVRSIARVFLKEPSILLDEATESALDSHTEQKILKAF 639

Feature 1 #####
gi 70672294 645 RAM.[4].TTLVIAHRLSTISDADKIIYK.[1].GKIAEMGTHAEL.[5].GLYRALWESQ 701
query 790 TKL.[4].TTFIITHVMENLKHMDKIIFFC GKNIVYVGHKLN.[4].HFYREYDYSK 1044
gi 48994309 543 LSS.[8].SLLVIAHRLSTIVNSDKIIVLK.[1].GKVAEMGNHAEL.[4].NHRYKMWDIQ 602
gi 52075613 662 KTL.[4].TSIFIAHRLTTAMQCEIIVLE.[1].GEVVEQGHDFL.[4].GRYALWESQ 717
gi 18496822 640 REL.[4].TTIMIAHRLSTIVDADEIIVLG.[1].GGIILRGNHQQ.[5].GKYRSMWLAQ 696
```

# Anexos

```
>PF11_0466
Feature 1 #####
gi 126936 1126 VDIKDVNFRYISRPVPIYKNSLFTCDKSKTTAIVGETSGSGKSTFMNLLRRFYDLKNDHILKN.[52].YNLRDLRNL 1251
query 604 LHFDMVNFYKYSNPHNYVLKNINMKIYKNTNNVLIIGKSGGKSTILKLLLNMYKTRGKIYLYN.[5].YTRHDFNFKI 682
gi 311095 493 IEFKDVFSYPTRPSPVQIFKLNLFKIPAGSSVCIIVGSPGRGKSTIALLLRYYNPTGTITDN.[5].LNCKSLRRHI 571
gi 50750485 510 IEFHNVTTHYPSRPDVKLNDNISMVKTKGETTAFVGSAGSGKSTIIQLIQRFYDPTDGMITLDG.[5].LNIQWLRQI 588
gi 57472150 327 IEFNRVNTFTYPTRPEQKVLNDFSAVFRREGKTTAIVGASGSGKSTIIQMIRFYDPTDQGEIYLDG.[5].LHLRELRRKI 405

Feature 1 #####
gi 126936 1252 SIVSQEPMLFNMSIYENIKFG.[20].FIESLP.[2].YDNTVGPYKSLSGGQKRIARALLREPKILLDEATSSL 1342
query 683 TYVEQDQSKLLNASIKDNLTYG.[22].FICRLR.[2].YETLISHKTELLSSQKQICARALTRYPKILLDEATSAI 775
gi 311095 572 GIVQEPVLMSTGIRDNITYG.[21].FITKFP.[2].YDVTIGPHGTLSSGGQKRIARALIKKPTILILDEATSAL 663
gi 50750485 589 GVVEQEPVLPATTIAENIRYG.[20].FIMDLP.[2].FDTHVGEQSSQSGGQKRIARALVRNPKILLDMATSAL 679
gi 57472150 406 GYVQEPVLPFNNSIKENLYG.[20].FINEKM.[4].INTHVGNAGGLSGGQKRIARAFIKKPKILLDEATSAL 498

Feature 1 # #####
gi 126936 1343 DSNSEKLIKTI VDI.[4].DKTIIITIAHRIASI.[2].SDKIVVFN.[33]. 1418
query 776 DKDNERIFENI.[2].NSI.[2].DLSTIIRITHKKANL.[2].ADNVFLK.[34]. 852
gi 311095 664 DVSEGAINTYF QQL.[4].SMTIVSIAHRLSTI.[2].SENVILV.[30]. 736
gi 50750485 680 DNESEAIQVEAL QKA.[2].GRTAISIAHRLSAV.[2].ADVIIGFE.[27]. 747
gi 57472150 499 DKRNEKEVQGA DRI.[6].SITTVVIAHRLSTI.[2].SDNIIVMQ.[29]. 572

>PFL0495c
Feature 1 ## ##
1J77_A 15 IQPQDVSFAY.[8].LQGLTFTLRP.[1].EVTALVGENSGKSTVAALLQN.[6].GQLLLD.[15].VAAVGQ 98
query 524 VTFNVFSY.[20].LKNVSPFLPH.[1].KSAIVGKSGSKRTILMLTK.[7].GEICVQ.[15].VOVITQ 620
gi 134967 357 LTFANVFSY.[8].LKNVSLNFA.[1].QFTFIVGKSGSKSTLSNLLR.[6].GSIISIN.[15].ITVVEQ 440
gi 15643057 355 IEFKNWFSY.[6].LKDITFHFKP.[1].QKVALVGTSGSKTTIVNLLMR.[6].GQILVD.[15].IGIVLQ 436
gi 52075613 482 IEFENVHFGY.[6].LKGATFTVPA.[1].KSAIVGTSKSGKSTILRLLFR.[6].GSIRID.[15].IGVVPQ 563

Feature 1 #
1J77_A 99 .[3].VFGSRLEQNI.[43].L.[76]. 231
query 621 .[3].LFNLTVREN M.[76]. 710
gi 134967 441 .[3].LFNDTLRKNI.[52].L.[74]. 580
gi 15643057 437 .[3].LFSTTVKENL.[42].L.[74]. 566
gi 52075613 564 .[3].LFNDTIKHNI.[42].L.[74]. 693

>PF11_0225 PFGCN20
NBD1
Feature 1 #####
gi 37694080 1230 .[1].RIDLQDLKIR.[2].P.[4].VLKGITCTFAAGNKIGVVRTGSGKSTLISLFR.[8].ILID.[9].KDLRTK 1308
query 194 .[1].DIRIDNFNIS I.[4].LLSDTTLKINVMNKYGLIGKNGIKSTLLAKLAR.[5].IKKD.[8].ELCLEN 266
gi 4886898 1190 .[1].NIVFKNVFR.[2].P.[4].ILNLSFSIQGKKIGICGRTGSGKSTLSAILR.[8].ILID.[9].KKLRSF 1268
gi 54655569 240 .[1].NIVFKNVFR.[2].P.[4].ILNLSFSIQGKKIGICGRTGSGKSTLSAILR.[8].ILID.[9].KKLRSF 318
gi 50404890 1028 .[1].DIKIDQLVVK.[2].E.[4].ALRGLSVMIKREQEIGVVRTGAGKSTVTLSSLR.[8].IID.[9].KQLRES 1106

Feature 1 #####
gi 37694080 1309 LSII.[2].EP.[1].LFRGTVRNN LDP.[5].DEEWEALE.[21].DGDN WSAGQRLFCFLGRVLL 1384
query 267 VTVL ES.[1].LMVDKLRHD.[14].LDP.[43].EQKILDIYE.[29].KKVN.[1].LSGGMKRLCLSRILF 401
gi 4886898 1269 ITII.[2].EP.[1].ILTGTLRYN LDP.[5].SEEDQALV.[21].VSNN ISLGQQLICLARAIL 1344
gi 54655569 319 ITII.[2].EP.[1].ILTGTLRYN LDP.[5].SEEDQALV.[21].VSNN ISLGQQLICLARAIL 394
gi 50404890 1107 ITMI.[2].DS.[1].LFEGLSREN LDP.[5].DQELNDVAL.[20].NGDN LSAGEKQLISARAVL 1181

Feature 1 #
gi 37694080 1385 R.[1].NKILVLDEATASIDSDAILQKVIQQ.[4].TVITIAH.[25]. 1450
query 402 S.[1].NDIILLDEPTNHLDIYTIQFLIDYIKKL.[2].TCIIVSH.[25]. 465
gi 4886898 1345 R.[1].SKIILLDEATSSMDIATDNIIQNIKTH.[4].TILSIAH.[25]. 1410
gi 54655569 395 R.[1].SKIILLDEATSSMDIATDNIIQNIKTH.[4].TILSIAH.[25]. 460
gi 50404890 1182 K.[1].SQIILLDEATANIDIDTESKIQQTIQTA.[4].TVITIAH.[25]. 1247

NBD2
Feature 1 #####
gi 49657216 315 .[5].VSFRY.[7].LTKVSLGVSQ.[2].RIAILGANGYKSTLMKIL.[8].GVVQWP.[4].ISLFSQ.[52].LS 440
query 594 .[5].VSKTY.[11].FKNASFEVDM.[2].RIALCGVNGSGKTTILIKII.[8].GELHVS.[4].IGYYSQ.[50].LS 721
gi 51892223 300 .[5].LGFTY.[6].FRDASFYLR.[2].RVAVLGSNGSGKTTVLRL.[8].GRLHVA.[3].VGYLAQ.[47].LS 418
gi 46229246 528 .[5].VSFTY.[11].VHDFSNIQS.[2].KIAICGNGSGKTTVLKLI.[8].GMIKRD.[4].IGYFAQ.[50].LS 655
gi 1408178 595 .[5].VSKTY.[11].FKNASFEVDM.[2].RIALCGVNGSGKTTILIKII.[8].GELHVS.[4].IGYYSQ.[50].LS 722

Feature 1 #
gi 49657216 441 GGEARVALALHIFD.[2].PHVFLDEPTNHL.[6].LIGALLNYG.[1].LVISSHDQYFI.[6].IYTIE.[3]. 513
query 722 GGQSKLALAILAYK.[1].PNVLILDEPSNHL.[6].LIVALNMYK.[1].LIIISHDQYFI.[6].IYHIN.[3]. 793
gi 51892223 419 GGEKVSILAVAKLLA.[1].PDLVLDEPTNGLD.[6].VEEALADYPG.[1].LILVSHDRYLV.[6].ILHIA.[3]. 490
gi 46229246 656 GGQKSRVALAIMAYL.[1].PHLLILDEPTNHL.[6].LIVALNSPFG.[1].VIIVSHDAHLI.[6].IWHID.[3]. 727
gi 1408178 723 GGQSKLALRILAYK.[1].PNVLILDEPSNHL.[6].LIVALNMYK.[1].LIIISHDQYFI.[6].IYHIN.[3]. 794

>PF14_0455 PfmDr2
Feature 1 #####
gi 39648925 380 VRFEDVKFAY.[6].LKLGNFVPAKTVAVGSPGAGKSTISRLFRFLYD.[1].SGGRILIDGQDIRSVTQTSRAAI 456
query 686 IEFNNVHFN.[8].LKDINIYIKPPTTALVGHGTGSGKTTISKLLYRFYD SKGEIKIGRNINEYTRNSIRNII 763
gi 42548073 618 VAFNDVKFAY.[8].LDGINFTVAPGKTAIVGESGSGKSTSLKLLFRFYD.[1].TDGSIITIDGHLDRVLDKLSVRNII 696
gi 19527665 576 IEFNSVTFY.[6].LRNVSTVPAKTVAVGSPGAGKSTIMRLLFRFYD.[1].QTGAILIDGQNIKLVQQQSLRKA 652
gi 52075613 482 IEFENVHFGY.[6].LKGATFTVPAKTVAVGTSKSGKSTILRLLFRFYD.[1].SSGSIRIDGQDIREVTLDSLRKCI 558

Feature 1 #####
gi 39648925 457 GMVPQDTVLFNDTIRYNIRYGRWA.[8].AKTAQIDAFIKASPKGYDTEVGERGLKLSGGEKQVIAIARTVLKAPPILV 539
query 764 GIVPQDTILFNESIKYNILYKGLDA.[8].VKSALYDFIQSLPKKWDVLVGDGKVKLSGGERQRISIAARCLLDPKIVI 846
gi 42548073 697 GIVPQDTVLFNATIMYNLLYARPA.[8].CKAANIHERILNFPDGYETKVGGERGLKLSGGERQVIAIARALDKARILL 779
gi 19527665 653 GIVPQDTVLFNNTIFYNIEYAKLGA.[8].ARAANIHERILGPEYKYGGERGLKLSGGEKQVIAIARTLLKAP IIVL 735
gi 52075613 559 GIVPQDTVLFNDTIKHNIQYGRLSA.[8].ARRAAIHDTIMNFPDKYNTVVGGERGLKLSGGEKQVIAIARVFLKEPSILL 641

Feature 1 #####
gi 39648925 540 LDEATSALDSHTEHEIQGALERV.[4].TSLVIAHRLSTIVGADEIIVLD.[1].GRIARERTHSQL.[4].GLYASMNW 613
query 847 FDEATSSLDSTRTEYLFQKAVEDL.[4].TIIIAHKLCTITTAELIILLN.[1].GKIIERGTHLDL.[4].GEYTEMW 920
gi 42548073 780 LDEATSALDSHTEHEIQGALERV.[4].TTIIAHLSTITTSQDIIVLH.[1].GEIVERGTHNEL.[4].GRYHAMW 853
gi 19527665 736 LDEATSALDHTERNIQAALERV.[4].TTIIAHLSTIITHADEIIVLQ.[1].GSIARERTHEEL.[5].GIYADMW 810
gi 52075613 642 CDEATSALDSSTTEASILNSLKTLL.[4].TSIFIAHRLSTIAMQCEIIVLE.[1].GEVVEQPHDFL.[4].GRYALWS 715

Feature 1
gi 39648925 614 RQ 615
query 921 MQ 922
gi 42548073 854 KQ 855
gi 19527665 811 QQ 812
gi 52075613 716 QQ 717
```

Anexos

>PF14\_0133  
Feature 1 #####  
2D2F\_A 4 LEIRDWLASIDG.[2].ILKGV NLVVPKGEVHALMGPNGAGKSTLKGIL.[1].GDPEYT.[3].GEILLDG 66  
query 100 LEIKDLHAEIE.[2].KEILK.[2].NLEIYLGEKHTIMGRNSGKSTLAKVI.[1].GHPYK.[3].GIKIKYK 164  
gi 3024873 6 LSIKNLTASVDG.[2].ILKGV NLEIKAGEVHAIMGRNSGKSTLAKVI.[1].GHPDYE.[3].GEIYYQG 68  
gi 14547901 7 LTIQNLKACVNE.[2].VLHNI NLQIKTNETHVIMPNGSGKSTLAKVI.[1].GHPDYE.[3].GKIFVNE 69  
gi 5902710 6 LEVTLNHAHVNE.[2].IVKGL NLVNVAGEIHAIMGKNGSGKSTFAKII.[1].GHPDYT.[3].GDITYQH 68  
Feature 1 #####  
2D2F\_A 67 .[1].NILEL.[3].ERARKGLFLAFAQ.[1].PVEVPGVTIANFL.[36].R YLNEGFSGGKRRNEILQMLLV 160  
query 165 .[1].DLINL.[3].VRSKCGIFLAFQ.[1].PVELPMVKNNEFL R.[40].PVNYGFSGGKRRNEILQMLLV 262  
gi 3024873 69 .[1].DLSAL.[3].ERALAGIFLAFQ.[1].PLEIPGVSNLDFL.[40].R SLNEGFSGGKRRNEILQMAIL 166  
gi 14547901 70 .[1].DITQA.[3].ERSNLGVFLGFQ.[1].PIEITGVNADFL.[40].R NLNEGFSGGKRRNEILQMILS 167  
gi 5902710 69 .[1].SILEL.[3].DRAKRGIFLSPQ.[1].PIEITGVNADFL.[40].R DVNEGFSGGKRRNEILQMSIL 166  
Feature 1 #####  
2D2F\_A 161 EPTYAVLDETDSDGLDIDALKVVARGVNAM.[6].ALVITHYQRIL.[4].PDKVHVMM.[1].GRVVATGGPELA.[2]. 233  
query 263 KPTFCILDETDSDGLDIDALRIVSEGVNINFL.[6].FLIVITHYKLL.[4].PNFIHIMH.[1].GKIIIESGDFSLV.[2]. 335  
gi 3024873 167 EPTLSILDETDSDGLDIDALRIVSEGVNINFL.[6].TLVITHYQRLL.[4].PDHIVHMY.[1].GKIVMSGKELA.[2]. 239  
gi 14547901 168 KPRLAILDEPDSGLDIDALRSISEVINL.[6].MLIITHYQNL.[4].PDKVHIMD.[1].GKIVETGDVTLA.[2]. 240  
gi 5902710 167 DTKLAVLDETDSDGLDIDALRIVSEGVNINFL.[6].IILITHYQRLL.[4].PDFVHVMM.[1].GKIKTGSASLA.[2]. 239  
Feature 1  
2D2F\_A 234 LEARGY 239  
query 336 IENKGY 341  
gi 3024873 240 LEEKGY 245  
gi 14547901 241 LKRRGY 246  
gi 5902710 240 LEKGY 245  
>MALL3P1.344  
Feature 1 #####  
1YQT\_A 22 QLEEDCVHRYGVNAFVLYRLPVVKE.[2].VVGIVGPNGTGKSTAVKILAGQLIPNL.[1].GDNSWDGVIRAFRGNEL 94  
query 92 DINKDVVHRYGNTFKLHRLPVPKL.[2].ILGLVGTNGIGKSTALKILSKLKPNL.[3].NNPPEWRDILSFFRGNEL 166  
gi 50906945 82 DLDKETTHRYGPNFSLHRLPVPKP.[2].VLGLVGTNGIGKSTALKILAGVVPNL.[3].TDPNWEIEMRNRGSEL 156  
gi 23479131 92 DINKDVVHRYGNTFKLHRLPVPKL.[2].ILGLVGTNGIGKSTALKILSKLKPNL.[3].DNPPEWRDILSFFRGNEL 166  
gi 2492577 86 LSEDKIVHSGYGNRFKFLGLVLRP.[1].VVGIVGPNGTGKSTAVKILAGQLIPNL.[3].DKEPNYDDVYKYPFRGTEL 159  
Feature 1 # #####  
1YQT\_A 95 QNYFEKLNKEIRPVVQYVDLIPKAVKGVIELLKADETGKLEEVVKALELENVLEREIQHLSGGELQRVATAAALL 174  
query 167 QIFFTKLEEKLSPIIKPQNVLDLIPKQIKGNILEIINKKDFNQKDKYIAELDLHLLDRNVEDLSGGELQRFALLMSII 246  
gi 50906945 157 QKYFTRLEEDKMKATMKPQYLDHPIKSVTGVKVDLLSKKDERHMKNLCDTLELNQVLDLDRVDSALSGGELQRFATAAAM 236  
gi 23479131 167 QIFFTKLEEKLSPIIKPQNVLDLIPKQIKGNILEIINKKDKLNQKDKYIMKLELDHLLDRNVEDLSGGELQRFALLMSII 246  
gi 2492577 160 QBYFEKLNKGVKAHKKVQYVDLIPKAVKGVIELLKADETGKLEEVVKALELENVLEREIQHLSGGELQRVATAAAYL 239  
Feature 1 #####  
1YQT\_A 175 R.[1].ATFYFFDEPSSYLDIRQRLNAARAIIRLS.[5].VLVVEHDLAVLDYLSDIHVYVYEGPVGYGIFSPKQGRTRNG 250  
query 247 G.[2].TNVYMFDEPSSYLDIKQRISMAKIHKLV.[5].IIVVEHDLSDYLDYVCCLVGKAGAYGVVTCPPFSVREG 323  
gi 50906945 237 E.[1].ADVYMFDEPSSYLDIKQRISMAKIIRLS.[5].VIVVEHDLSDYLDYVCCLVGKAGAYGVVTCPPFSVREG 312  
gi 23479131 247 G.[2].TNVYMFDEPSSYLDIKQRISMAKIIRLS.[5].IIVVEHDLSDYLDYVCCLVGKAGAYGVVTCPPFSVREG 323  
gi 2492577 240 R.[1].GDYFFDEPSSYLDIKQRISNAARAIIRLS.[5].VVVVEHDLSDYLDYVCCLVGKAGAYGVVTCPPFSVREG 311  
Feature 1  
1YQT\_A 251 INEFLRGLYKLDENVFRFRPEIKFT 274  
query 324 INIFLDGFVPTDNLRIRESLNFK 347  
gi 50906945 313 INIFLDGFVPTDNLRIRESLNFK 347  
gi 23479131 324 INVFLDGFVPTDNLRIRESLNFK 347  
gi 2492577 312 INEYLYGELREINRFRKEPIIFE 335  
>PF11\_0317 PFSMCI  
Feature 1 #####  
1W1W\_D 4 LVGLELSNFKSYRGVTKVGFGE.[2].FTSIIIGPNSGKSNMMDAISFVLG.[4].HLRSNLIKDLIYRGV.[21].AYV 94  
query 291 IKYIIVSNFNKSYEDENIIGPFS.[1].FTSIIIGPNSGKSNMMDAISFVLG.[4].YLRVKNLRLIYHKE.[11].CVV 370  
gi 54658074 31 IKKLIIEFNKSYNGRHIIGPFS.[2].LTCIVGPNSSGKSNLMDALSFALG.[4].DMRSTNLKDLIYRPE.[29].AEV 129  
gi 46227810 31 IKKLIIEFNKSYNGRHIIGPFS.[2].LTCIVGPNSSGKSNLMDALSFALG.[4].DMRSTNLKDLIYRPE.[29].AEV 129  
gi 50729186 13 LKLLMVKDFKSWRGEQLIGPFM.[1].FNCCIIGPNSGKSNMMDAISFVLG.[4].NLRVKSRELIHGAH.[8].ASV 89  
Feature 1 #  
1W1W\_D 95 KAFYQKGNKLV.[25].YSIFLENENILIKAKNLFVQGDVEQIAAQSP.[ 263]. 425  
query 371 KIILECNENKLV.[25].YMNFLRKNRIETKTKTLIFQGDLEDIINKKP.[1092]. 1530  
gi 54658074 130 SLVFTLQFENN.[28].YINKLADYNILVKARNFLVQGDVEDVAQRAP.[1088]. 1288  
gi 46227810 130 SLVFTLQFENN.[28].YINKLADYNILVKARNFLVQGDVEDVAQRAP.[1088]. 1288  
gi 50729186 90 KIVYCEEDGEE.[25].YISELEKIGILVKARNLIFQGTVESIAMKCP.[1078]. 1235  
Feature 2 #####  
1W1W\_D 4 .[157].SP.[161].PLKRFKDEMYLSGGEKTVAAALLFAINS.[3].SPFFVLDEVDAAALDITNVQRIAYI.[8]. 388  
query 1540 .[168].MP PMKRYFEISELSGGEKTSALALIFSIQK.[3].NSFIIILDEVDANMDPLKIQSLTRYL.[5]. 1771  
gi 54658074 31 .[168].AP.[989].PSKRFRDIQQLSGGEKTVAAALLFAINS.[3].SPFFVLDEVDAAALDITNVQRIAYI.[8]. 1251  
gi 46227810 31 .[168].AP.[989].PSKRFRDIQQLSGGEKTVAAALLFAINS.[3].SPFFVLDEVDAAALDITNVQRIAYI.[8]. 1251  
gi 27805177 4 .[143].EP.[972].PGRKFRSMDNLSGGEKATAALALFAINS.[3].APFFILDEVDAAALDITNVQRIAYI.[8]. 1185  
Feature 2 #####  
1W1W\_D 389 QFIVISLKNMTEFKSDALGVYRQQ.[2].NSSKIITLTL 425  
query 1772 QVIVISLKEKFFSKSLSLIGVYKKN.[2].KCSKTIITLTL 1808  
gi 54658074 1252 QSIVISLKDRLFSQADTLIGVYKKN.[2].QTSSTMTLTL 1288  
gi 46227810 1252 QSIVISLKDRLFSQADTLIGVYKKN.[2].QTSSTMTLTL 1288  
gi 27805177 1186 QIIVISLKEKFFSKADALGVYRQQ.[3].MVSHTLTL 1223  
>PF11\_0249 PFSMCI  
Feature 1 #####  
gi 50287189 36 GSIVKIRLENFVTV N YTEFNLSPLNMIIGPNSGKSTYVCAVCLGLAG.[5].GRSKQVEDFIKNGQ 103  
query 89 GAIIEMLTYNMMVF S.[1].PITLRANKGINLAAANASGKSSICALVFLGLY.[5].SRNKELINFKKG 157  
gi 23508440 89 GAIIEMLTYNMMVF.[1].G PITLRANKGINLAAANASGKSSICALVFLGLY.[5].SRNKELINFKKG 157  
gi 56474241 15 GSIIRIKMERFLTY D SVEVFPKGLNVIIGPNSGKSSICALVFLGLY.[5].GRSKDLKDFVKIGE 82  
gi 19069725 7 GNIVSMELLENQTF K KMSLGFCSNFNIAGPNSGKSSIANAMVLFVGG.[5].GRKTVGVEYRFG 74  
Feature 1 #  
gi 50287189 104 .[2].SKIEIVLKDDPN I.[66].IQLDNLQCFLQSERVEEFKLRPEKLL.[ 874]. 1085  
query 158 .[2].SFIETLKCDEE.[40].N LNLNLTITFMPQENVSKFRLNPEELF.[1016]. 1255  
gi 23508440 158 .[2].SFIETLKCDEE K.[40].LNLNLTITFMPQENVSKFRLNPEELF.[1015]. 1254  
gi 56474241 83 .[2].AVIEVELFNGIT R.[38].IMIDNLQCFLQSERVEEFKLRPEKLL.[ 851]. 1013  
gi 19069725 75 .[2].AKIEVVVWIKG E.[35].KNIGNLQCFLQSERVEEFKLRPEKLL.[ 859]. 1010  
Feature 1 #####  
gi 9755638 21 .[ 903].VKFRESGQLQVLSHHQSGGERSVSTIILYVSLQDLTNCFFRVVDEINQGMDFINERKMFQQLVRA.[ 7]. 996  
query 21 .[1044].VKFKKNAFLLLSISHQSGGERSLTTMLYLSIQKLTNGFVYVDEINQGLDHEINQKIFQLLSCL.[27]. 1225  
gi 50933027 38 .[ 903].VKFRQTGQLQVLSAHQSGGERSVSTIILYVSLQDLTNCFFRVVDEINQGMDFINERKMFQQLVRA.[ 7]. 1013  
gi 23508440 89 .[1044].VKFKKNAFLLLSISHQSGGERSLTTMLYLSIQKLTNGFVYVDEINQGLDHEINQKIFQLLSCL.[27]. 1225  
gi 27227807 22 .[ 910].VKFRQTGQLQVLSAHQSGGERSVSTIILYVSLQDLTNCFFRVVDEINQGMDFINERKMFQQLVRA.[ 7]. 1004

# Anexos

```
Feature 1 #
gi 9755638 997 QCFLLPKLLPELEYS.[1].ACSIILNIMNGPYI 1026
query 1226 QYFILTFPQIKNIVFK DITVHYLFGNGFV 1254
gi 50933027 1014 QCFLLPKLLPDLEYS.[1].ACSIILNIMNGPWI 1043
gi 23508440 1226 QYFILTFPQIKNIVFK DITVHYLFGNGFV 1254
gi 27227807 1005 QCFLLPKLLPDLEYS.[1].ACSIILNIMNGPWI 1034
>PFE1255c PfsMCG
Feature 1 #####
gi 3874427 42 VASIHLLKNFMCHANLLIEFDVA.[3].CFYIGGPNNGSGKSALFAAMNMLG.[7].RGNVQYAIKIDGT.[2].AKITIT 118
query 228 IIKLRIRNLFNHNLELTFNSY KNIIIGKNGRGSKSAIAQAVAVGLG.[7].RDINLANIYKDYD.[7].CSIEIF 306
gi 6323415 82 IKKVILRNFMCHHEFLELGSR LNFIVGNNGSGKSAILTAITIGLG.[7].RGSCLKDLIREGC.[2].AKIILH 155
gi 46443321 106 IEKLTLLKNFMCHDSFELKLGPO LNFIIIGRNGSGKSAILTGISVGLG.[7].RGSRTIRDLIKDGC.[2].SRITVV 179
gi 49526325 80 IKKLTLLHFMCHRNFDVDELGP LNFIVGKNGSGKSAILTAITIGLG.[7].RGSCLKDLITAGC.[2].SRITTY 153
Feature 1
gi 3874427 119 LTNEGLNA.[1011]. 1137
query 307 LSNSGNNA.[1018]. 1332
gi 6323415 156 LDNSKYGA.[ 947]. 1110
gi 46443321 180 LKNEGSDA.[ 939]. 1126
gi 49526325 154 LSNSGIGA.[ 949]. 1110
Feature 1 # #####
gi 3874427 42 .[148].MSQDRS.[846].KKPVCDLKGLSGGERSFVTAALVMSL.[5].QPFRLMDEFVMDMMN.[3].VMDLLVE 1099
query 1600 .[148].INQDTS NNVFMEINSLSGGERSITQALLASF.[5].SSFFIMDEFVMDMMN.[3].VMDLLVE 1811
gi 3875345 28 .[148].MSQDRS.[853].KKRVRDLKGLSGGERSFVTAALVMSL.[5].QPFRLMDEFVMDMMN.[3].VMDLLVE 1092
gi 5880616 22 .[139].MSQDKA.[795].SNVVRDTKGLSGGERSFSTLCFALAL.[5].APFRAMDEFVMDAVS.[3].SLDALVD 1019
gi 10171716 22 .[139].MSQDKS.[797].SNVVRDTKGLSGGERSFSTLCFALAL.[5].APFRAMDEFVMDAVS.[3].SLDALVD 1021
Feature 1 #
gi 3874427 1100 M.[8].QFIFFTPO GIKELNRV.[1].GLQIF.[ 7]. 1137
query 1812 F.[7].QYFFITPH.[1].EITELFLD.[1].AKQK.[ 7]. 1849
gi 3875345 1093 L.[8].QFIFFTPO GIKELNMV.[1].GLQV.[ 7]. 1130
gi 5880616 1020 F.[6].QWMITPH DISMVKSH.[1].RIKQ.[ 7]. 1055
gi 10171716 1022 F.[6].QWMITPH DISMVKSH.[1].RIKQ.[ 7]. 1057
>MALL3P1.96 PfsMCG
Feature 1 #####
gi 468040 1 MKVEELIIDGFKSYATRVTITDWDPOFNAITGLNGSGKSNILDAICFVLGIASMSTVRASSLQDLIYKRG.[6].ASVTI 81
query 1 MYIEEIIIDGFKSYPTKTVIGPFHPQFNAITGLNGSGKSNVLDIAICFVMGINNLLIRVNRDLDELIVKQG.[6].GSVTI 81
gi 23487793 1 MHIEEIIIDGFKSYPTKTVIGPFHPQFNAITGLNGSGKSNVLDIAICFVMGINNLLIRVNRDLDELIVKQG.[6].GSVTI 81
gi 23619130 1 MYIEEIIIDGFKSYPTKTVIGPFHPQFNAITGLNGSGKSNVLDIAICFVMGINNLLIRVNRDLDELIVKQG.[6].GSVTI 81
gi 54656795 1 MYIEEIIIDGFKSYQKRTVIGRPNKFNATGLNGSGKSNILDSICFVLGITNLSQIRINKLEELVYKSG.[6].ASVSI 81
Feature 1 #
gi 468040 82 VFDNTDKSNSPIG.[6].ISVTRQVVLGGTSKYLINGHRAPQSVLQQLFQSVQLNINNPFLIMQGITKVINM 156
query 82 KFNNEKPSPLQE.[7].ITITRQIVLGGRRNRYLLNSHNAKPKDISDFQSLKLNINNPFLIMQGITKVINM 157
gi 23487793 82 KFNNEKPSPLQE.[7].ITITRQIVLGGRRNRYLLNSHNAKPKDISDFQSLKLNINNPFLIMQGITKVINM 157
gi 23619130 82 KFNNEKPSPLQE.[7].ITITRQIVLGGRRNRYLLNSHNAKPKDISDFQSLKLNINNPFLIMQGITKVINM 157
gi 54656795 82 IFNDDKSNSSPL.[6].ITVTRQIATGGRNRYLLNGNVKPIETINFFHSVQLNVNNSHFLIMQGRITKVINM 156
Feature 4 #####
gi 13449986 1 .[119].KLAQPSQVQNLFHSV QLVNPNPHFLIMQGRITKVINM.[918].GKVVQSLSELSGGQSRLLALSLSI 1098
query 927 .[120].LLAMYQINIEYFQAI.[3].LLNNAQAKLSIVDGLANGIEM.[ 4].NNWKSLELSGGQSRLLALSLSI 1114
gi 6522529 1 .[119].KLAQPNQVQNLFHSV QLVNPNPHFLIMQGRITKVINM.[913].GDVWQSLSELSGGQSRLLALSLSI 1093
gi 23487793 1 .[120].HNAPKDISDFQSL KLVNPNPHFLIMQGITKVINM.[942].NNWKSLELSGGQSRLLALSLSI 1123
gi 23619130 1 .[120].HNAPKDISDFQSL KLVNPNPHFLIMQGITKVINM.[933].NNWKSLELSGGQSRLLALSLSI 1114
Feature 4 ##### #
gi 13449986 1099 LALLLFPKAPLYILDEVAALDLSHTQNIQIRMIHAFPHSQFIVVSLKEGMFNNANVLFRTKFDVGVSTVQ 1169
query 1115 LALLKVRTVPMYILDEIDAALDLNHTQNIQIDMIRTQFPHSQFIIIVSLKEGMFNSHADVLFKMRFDIGISTVN 1185
gi 6522529 1094 LALLLFPKAPYIILDEVAALDLSHTQNIQIRMIKSHFPHSQFIVVSLKEGMFNSHADVLFRTKFDVGVSTVQ 1164
gi 23487793 1124 LAILKVRTVPMYILDEIDAALDLNHTQNIQIDMIRTQFPHSQFIIIVSLKEGMFNSHADVLFKMRFDIGISTVN 1194
gi 23619130 1115 LALLKVRTVPMYILDEIDAALDLNHTQNIQIDMIRTQFPHSQFIIIVSLKEGMFNSHADVLFKMRFDIGISTVN 1185
>PFD0685c PfsMCG
Feature 1 #####
gi 46229806 33 IKELKICGFKTYRDETTISFHPG CNCIVGLNGSGKSNILAAIQFLLSDSF.[5].E RRALLHEGLG 98
query 3 IKQIRLKGFRTYKNETTIDFTRG INCIVGNGSGKSNILAAIEFILDVDC E.[1].KQIYLHEGIG 64
gi 23510124 3 IKQIRLKGFRTYKNETTIDFTRG INCIVGNGSGKSNILAAIEFILDVDC.[4].I.[2].HEGIGNAVRN 69
gi 41018255 3 VKQIIIQGFKSYKQDVTIEPFSP.[1].HNVIVGRNGSGKSNFFAAIRFVLSDAY.[6].E RQALLHEGSG 70
gi 40739558 3 VQRGIIQGFKSYKQDVTIEPFSP.[1].HNVIVGRNGSGKSNFFAAIRFVLSDAY.[6].E RQALLHEGSG 70
Feature 1 #
gi 46229806 99 .[5].AYVELSLDNIGRRL.[11].RIFRSSSQKNEWQVMGKNISKKDFDSILESCGIRSNPNFYIVRQGVKVAELATM 181
query 65 .[5].CYVEIIFDENSEKYF.[ 9].IKKVLNEMKCEIFVNDKNISKQVVELLESGLCINNLYNIKQGGIILSNM 145
gi 23510124 70 CYVEIIFDENSEKYF.[ 9].IKKVLNEMKCEIFVNDKNISKQVVELLESGLCINNLYNIKQGGIILSNM 145
gi 41018255 71 .[5].AYVEIIFDENSEDERF.[ 8].LRRTIGLKKDEYTLDRKNATKNDVMNLLSAGFSRSNPNFYIVPQGRVLTALNM 150
gi 40739558 71 .[5].AYVEIIFDENSEDERF.[ 8].LRRTIGLKKDEYTLDRKNATKNDVMNLLSAGFSRSNPNFYIVPQGRVLTALNM 150
Feature 1
gi 46229806 182 .[1001].QAGN.[91]. 1277
query 146 KDEE.[93]. 242
gi 23510124 146 .[ 931].DEKM.[92]. 1172
gi 41018255 151 .[ 948].KHDD.[93]. 1195
gi 40739558 151 .[ 952].KHDD.[93]. 1199
Feature 2 ##### #
gi 27805841 3 .[141].INQMATA.[955].KQEMREMQQLSGGQSLVALALIFAQKCDPAPPYLFDEIDQALDAQHRKAVSDMIME 1164
query 927 .[143].INITSND DEKMTYTIQELSGGERSIVAICLFLCLNKIDNFSFFFDEIDAALDTIHRDNLSLLKE 1135
gi 54792531 3 .[141].INQMATA.[954].KQEMREMQQLSGGQSLVALALIFAQKCDPAPPYLFDEIDQALDAQHRKAVSDMIME 1163
gi 26801170 3 .[141].INQMATA.[954].KQEMREMQQLSGGQSLVALALIFAQKCDPAPPYLFDEIDQALDAQHRKAVSDMIME 1163
gi 23510124 3 .[136].IILKLSNM.[931].DEKMTYTIQELSGGERSIVAICLFLCLNKIDNFSFFFDEIDAALDTIHRDNLSLLKE 1135
Feature 2
gi 27805841 1165 L.[4].QFITTFRPELLESAD.[1].FYGVKFRNKVSHID 1200
query 1136 L.[5].QFIITFRPELLESAD.[1].MYIVKIVDRESYIS 1172
gi 54792531 1164 L.[4].QFITTFRPELLESAD.[1].FYGVKFRNKVSHID 1199
gi 26801170 1164 L.[4].QFITTFRPELLESAD.[1].FYGVKFRNKVSHID 1199
gi 23510124 1136 L.[5].QFIITFRPELLESAD.[1].MYIVKIVDRESYIS 1172
>PFE0450w PfsMCG
Feature 1 #####
gi 50258035 244 LTIHKLVLVNFKSYAGRQEIQPFHKSFAIVGPNNGSGKSNIDALLFVFGYRASKMRQKLSLHNSA.[7].CSVEVW 325
query 63 IIEKLVLENFKSYSGVKGIVGPFYKFSFIVGPNNGSGKSNIDAMLFVFGRRAKKIRQNKLSLHNSK.[7].TKVSIH 144
gi 46229789 70 LTIHKLVLVLENFKSYGGSKVIGPFHKSFTAIVGPNNGSGKSNIDAMLFVFGRRAKKIRQNKLSLHNSK.[7].ASVAVH 151
gi 54659708 21 LIHKLVLVLENFKSYGGSKVIGPFHKSFTAIVGPNNGSGKSNIDAMLFVFGRRAKKIRQNKLSLHNSK.[7].ASVAVH 102
gi 23491225 66 IIEKLVLENFKSYSGIKIIGPFYKFSFIVGPNNGSGKSNIDAMLFVFGRRAKKIRQNKLSLHNSK.[7].TKVSIY 147
```



# Anexos

---

Feature 1  
gi 50258035 326 FR.[1157]. 1484  
query 145 FK.[1294]. 1440  
gi 46229789 152 FK.[1176]. 1329  
gi 54659708 103 FK.[1175]. 1279  
gi 23491225 148 FK.[1294]. 1443

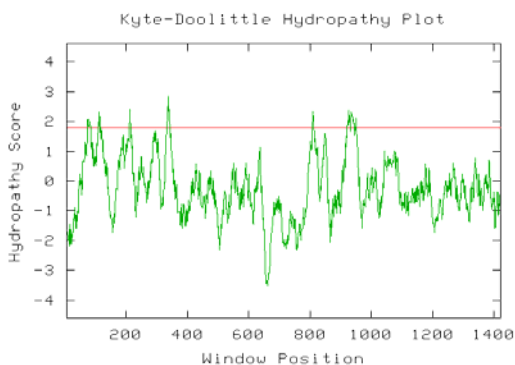
Feature 2  
gi 27545259 81 .[1099].PKKSWKKIYNLSGGKTLSSLALVLFALHHPKTPLYFMDEIDAALDFKNVSIIVACYIYEQTKNAQFIIISLR 1251  
query 286 .[1283].PKKSWKHIQNLSGGKTLSSLALVLFALHHPKTPLYFMDEIDAALDFKNVSIISHYIQTTRNAQFIVISLR 1640  
gi 6807671 82 .[1099].PKKSWKKIFNLSGGKTLSSLALVLFALHHPKTPLYFMDEIDAALDFKNVSIIVAFYIYEQTKNAQFIIISLR 1252  
gi 21739524 82 .[1041].PKKSWKKIFNLSGGKTLSSLALVLFALHHPKTPLYFMDEIDAALDFKNVSIIVAFYIYEQTKNAQFIIISLR 1194  
gi 23491225 66 .[1283].PKKSWKHIQNLSGGKTLSSLALVLFALHHPKTPLYFMDEIDAALDFKNVSIISHYIKTKTNDQAQFIVISLR 1420

Feature 2  
gi 27545259 1252 NMFEMADRLIGIYKTHNPTKNV 1274  
query 1641 NQMFELCDRMIGIYKTNNDITKCI 1663  
gi 6807671 1253 NMFETSDRLIGIYKTYNITKSV 1275  
gi 21739524 1195 NMFETSDRLIGIYKTYNITKSV 1217  
gi 23491225 1421 NQMFELCDRMVGIYKTNNDITKCI 1443

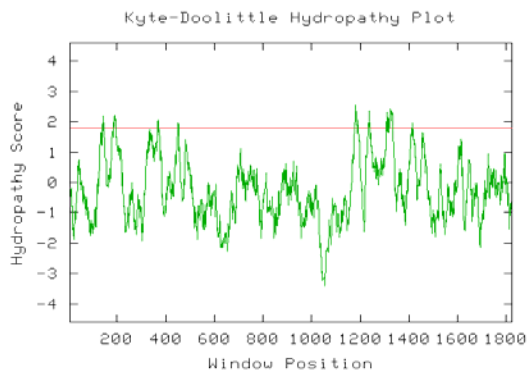
ANEXO 5

Perfis de hidrofobicidade calculados com base no algoritmo Kyte e Doolittle para cada uma das 22 sequências que apresentaram características compatíveis com as proteínas da super-família ABC.

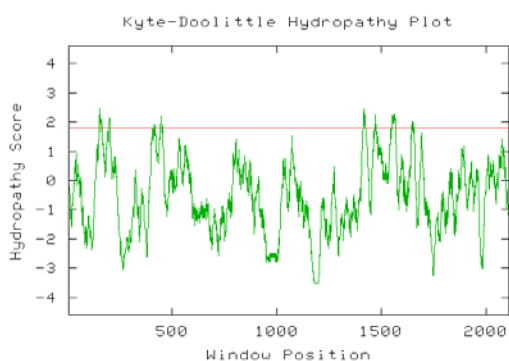
**PFE1150w Pgh1**



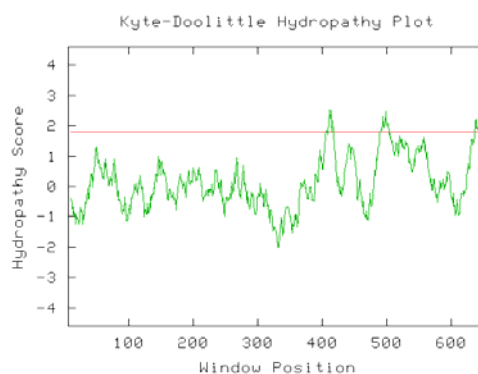
**PFA0590w PfMRP1**



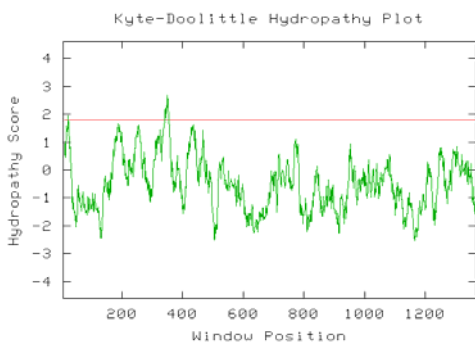
**PFL1410c PfMRP2**



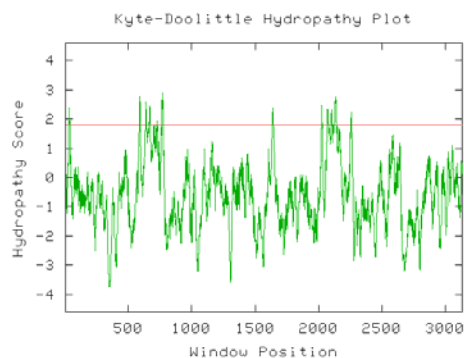
**PF14\_0244**



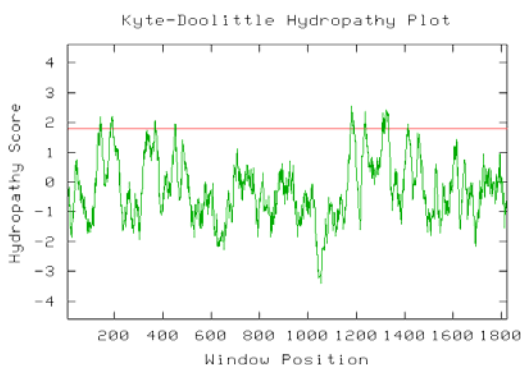
**PfMDR PfC0125w**



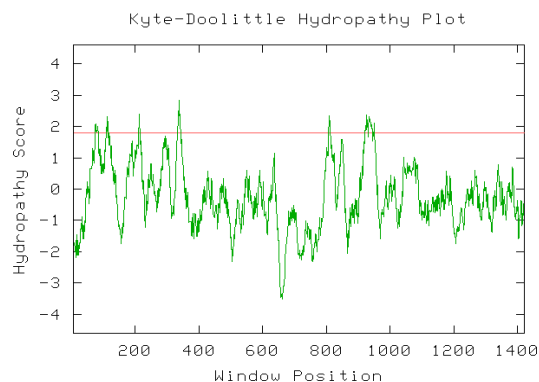
**PFC0875w**



**PFA0590w PfMRP1**

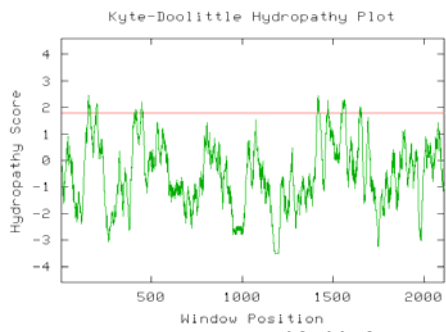


**PFE1150w Pfmdr1**

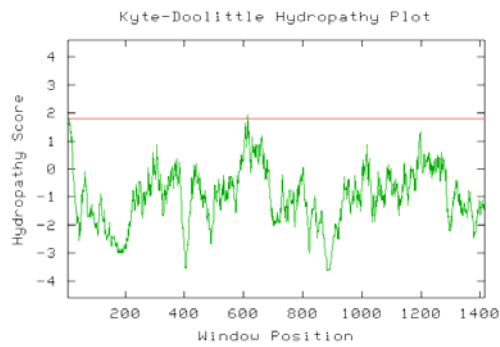


# Anexos

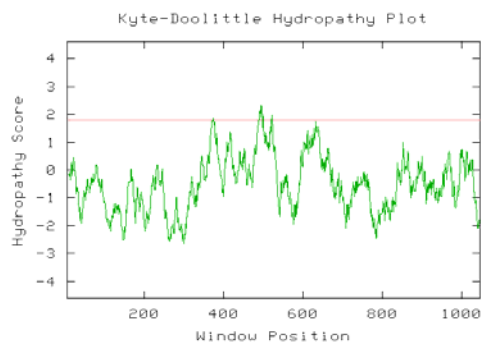
**PFL1410c PfMRP2**



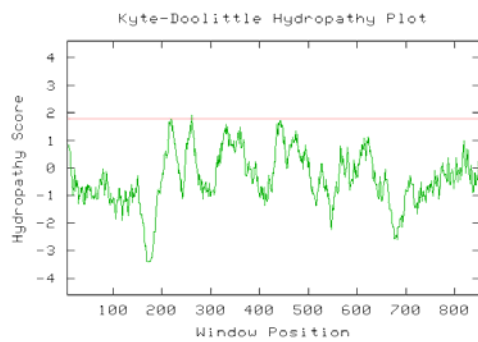
**PF08\_0078**



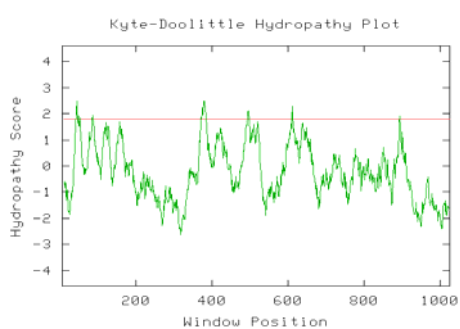
**PF13\_0271**



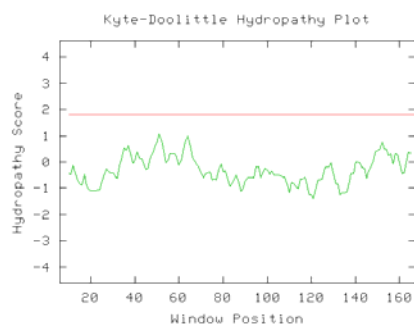
**PFL0495c**



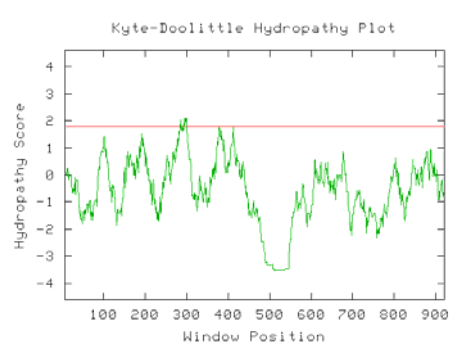
**PF14\_0455 Pgh2**



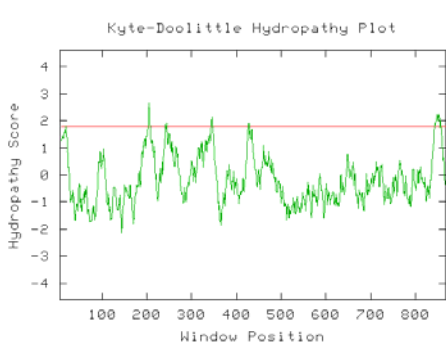
**PF14\_0321**



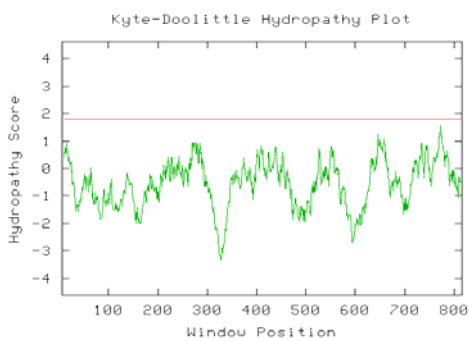
**PF13\_0218**



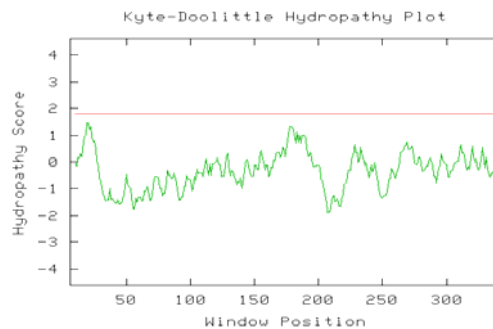
**PF11\_0466**



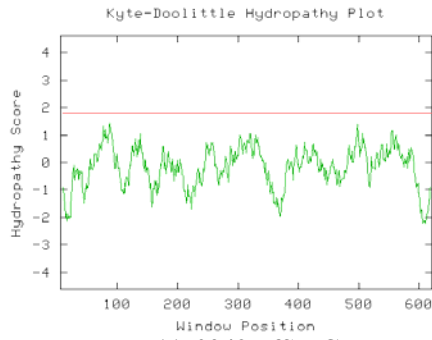
**PF11\_0225 PfgCN20**



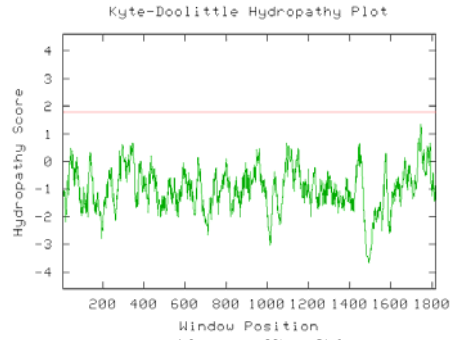
**PF14\_0133**



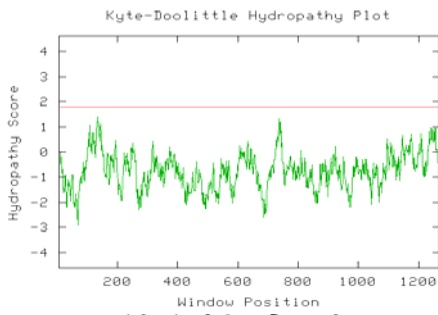
**MAL13P1.344 BCE**



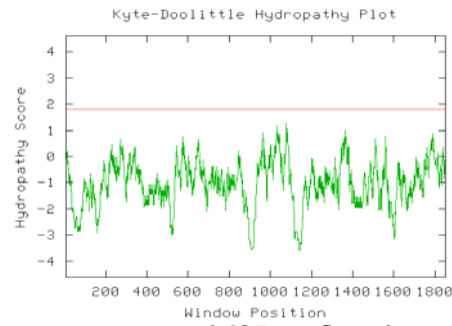
**PF11\_0317 PfSMC1**



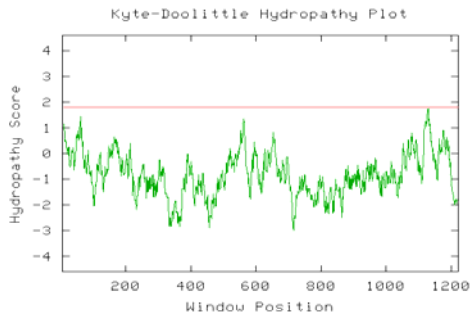
**PF11\_0249 PfSMC5**



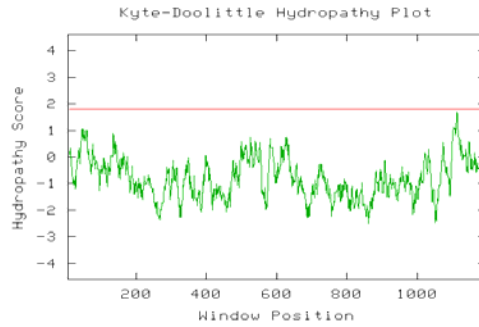
**PFE1255c PfSMC6**



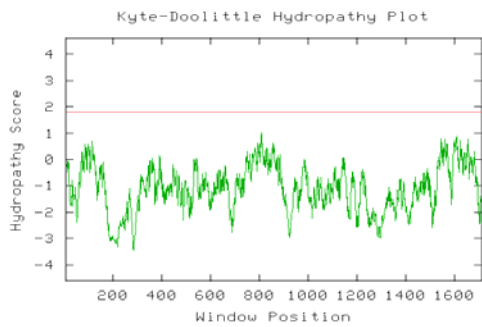
**MAL13P1.96 PfSMC2**



**PFD0685c PfSMC3**



**PFE0450w PfSMC4 ABC1**



# Anexos

## ANEXO 6

### Alinhamento da sequência total de PfMRP1 com cada uma das 6 sequências das proteínas de diferentes organismos que lhe eram mais semelhantes

|        |   |           |
|--------|---|-----------|
| PfMRP1 | <i>Plasmodium falciparum</i>  | 1822 a.a. |
| AtMRP2 | <i>Arabidopsis thaliana</i>   | 1623 a.a. |
| BPT1   | <i>Sacharomyces cerevisiae</i>  | 1559 a.a. |
| YBT1   | <i>Sacharomyces cerevisiae</i>  | 1661 a.a. |
| YCFI   | <i>Sacharomyces cerevisiae</i>  | 1515 a.a. |
| AtMRP1 | <i>Arabidopsis thaliana</i>   | 1622 a.a. |
| MRP1   | <i>Homo sapiens</i>   | 1531 a.a. |
|        |   |           |
| BPT1   | -MSSLEVV D G C P Y G Y R P --- Y P D S G T N A L N P C F I S - V I S A W Q A V F F L L I G S Y Q L W K L Y K N          |           |
| YCFI   | -MAGNLVSWACKLCRSP E G F G P I S F Y G D F T Q C F I D G V I L N L S A I F M I T F G I R D L V N L C K K                 |           |
| AtMRP2 | M G F E F I E W Y C K P V P N G V W T K Q V A N A F G A Y T P C A T D S F V L G I S Q L V L L V L C L Y R I W L A L K D |           |
| AtMRP1 | M G F E P L D W Y C K P V P N G V W T K T V D Y A F G A Y T P C A I D S F V L G I S H L V L L I L C L Y R L W L I T K D |           |
| MRP1   | M A L R G F C S A D G S D P L W D W N V T W N T S N P D F T K C F Q N T V L V W V P C F Y L W A C F P F Y F L Y L S R H |           |
| YBT1   | -M H H V L N S T R P D H R F W F Y D D V T Q Y G R T K Y L N Y Y T P L V L L I F T V L F I T Y N I W K H Y Y Y D V L    |           |
| PfMRP1 | --M T T Y K E N V G I S N K G N K K K K S C Q N I S F L N F L S F D W I R P L I N D L I K G D I Q E L P N I C R N F D   |           |
|        |   |           |
| BPT1   | N K V P P R F K N F P T L P S K I N S R H L T H L T N V C F Q S T L I I C E L A L V S Q S S D R V Y P F I L K K A L Y L |           |
| YCFI   | K H S G I K Y R R N W I I V S R M A L V L L E I A F V S L A S L N I S K E E A E N F T I V S ----- Q Y A                 |           |
| AtMRP2 | H K V E R F C L R S R L Y N Y F L A L L A A Y A T A E P L F R L I M G I S V L D F D G P G L P P F E A F G L G V K A F A |           |
| AtMRP1 | H K V D K F C L R S K W F S Y F L A L L A A Y A T A E P L F R L V M R I S V L D L D G A G F P P Y E A F M L V L E A F A |           |
| MRP1   | D R G Y I Q M T P L N K T K T A L G F L L W I V C W A D L F Y S F W E R --- S R G I F L A P V F L V S P T L L G I T     |           |
| YBT1   | H L K Q K N P I D E L L Y S T D E D E Q S P L I N N N T I T T N Y V D N N C T K D A L K N R H F S L E K L K S V K V N   |           |
| PfMRP1 | V P Y Y A S K L E E N L R D I E V E D S E F Y S E K N S S N E H V L H C N S N D A S E K K V Y N V Y Y H N I L W S I L   |           |
|        |   |           |
| BPT1   | N L L F N L G I S L P T Q Y L A Y F K S T F S M G N Q L F Y Y M F Q I L L Q L F L I L Q R Y Y H G S S N E R L T V I S G |           |
| YCFI   | S T M L S L F V A L A L H W I E Y D R S V V A N T V L L F Y W L F E T F G N F A K L I N I L I R H T Y E G -- I W Y S G  |           |
| AtMRP2 | W G A V M V M I L M E T K I Y I R E L R W Y V R F A V I Y A L V G D M V L L N L V L S V K E Y Y S S Y V L Y L Y T S E V |           |
| AtMRP1 | W G S A L V M T V V E T K T Y I H E L R W Y V R F A V I Y A L V G D M V L L N L V L S V K E Y Y S F K L Y L Y I S E V   |           |
| MRP1   | T L L A T F L I Q L E R R K G V Q S S G I M L T F W L V A L V C A L A I L R S K I M T A L K E D A Q V D L F R D I T F Y |           |
| YBT1   | G E P H G T P E I V R R G F I E K S R I I L E F F L V L S Q V I I H S F I L L H Y V N K N P E F T Q O G T I T G L V E W |           |
| PfMRP1 | K T F K F R I I L I I S F Y I L E T L I V T L G G K F I D Y Y M R I L E G Q K I P V Y I S F L K D F K V F S G L V V V M |           |
|        |   |           |
| BPT1   | Q T A M I L E V L L L F N S V A -----   |           |
| YCFI   | Q T G F I L T L F Q V I T C A S -----   |           |
| AtMRP2 | G A Q V L F G I L L F M H L P N -----   |           |
| AtMRP1 | A V Q V A F G T L L F V Y F P N -----   |           |
| MRP1   | V Y F S L L L I Q L V L S C F S -----   |           |
| YBT1   | C A L F I I V S L R L A N V N Q N F K F I N K Y P G N L W S V S F I N Y L A L F I S M I L P F R S I F I H H I N S P I S |           |
| PfMRP1 | I M F F H L F F E A L L H F Y F H L F T I N -----   |           |
|        |   |           |
| BPT1   | ----- I F I Y D L C I F E P I N ----- E L S E Y Y K K N G W Y P P -- V H V L S Y I T F I W M N K L I                    |           |
| YCFI   | ----- I L L E A L P K K P L M P H Q H I H Q T L T R R K P N P Y D S -- A N I F S R I T F S W M S G L M                  |           |
| AtMRP2 | ----- L D T Y P G Y M P V R S E T V D D Y E Y E E I S D G Q Q I C P E K H A N I F D K I F F S W M N P L M               |           |
| AtMRP1 | ----- L D P Y P G Y T P V G T E N S E D Y E Y E E L P G G E N I C P E R H A N L F D S I F F S W L N P L M               |           |
| MRP1   | ----- D R S P ----- L F S E T I H D P N P C P E S S A S F L S R I T F W W I T G L I                                     |           |
| YBT1   | R K Y Y I S Q I S I N L A L F L L L F F A R I R N N F A I I Y K T D S W I T P S P E P V T S I A G F I C W A W L D S F V |           |
| PfMRP1 | ----- L K V S L M Y F L Y K I N L C S N N N H L Q N P D A F Y N T Y R K F S S Q T E I D E I S R D F L S I G K           |           |
|        |   |           |
| BPT1   | V E T Y R N K K I K D P N Q L P L P P V D L N I K S I S K E F K A N W E L E K W L N R N -----                           |           |
| YCFI   | K T G Y -- E K Y L V E A D L Y K L P R N F S S E E L S Q K L E K N W E N E L K Q K S N P -----                          |           |
| AtMRP2 | T L G S -- K R P L T E K D V W Y L D T W D Q T E T L F T S F Q H S W D K E L Q K P Q -----                              |           |
| AtMRP1 | T L G S -- K R P L T E K D V W H L D T W D K T E T L M R S F Q K S W D K E L E K P K -----                              |           |
| MRP1   | V R G Y -- R Q P L E G S D L W S L N K E D T S E Q V V P V L V K N W K E C A K T R K Q P V K V V Y S S K D P A Q P K    |           |
| YBT1   | W K A H -- K V S I K V K D I W L M M Q D Y S F V V K K F R Y F V D H K V K R K R -----                                  |           |
| PfMRP1 | N A S S S S S G I K N N N K N I D N N K F V E N D Y I I N F I K S T K K M E K D S L N E N -----                         |           |



# Anexos

BPT1 ILGQLPCMSGSRDSIPPK-----LIIRSSSVAYCSQESWIMNASVRENILFGHKFDQ  
YCFI MLGDLFRVKG-----FATVHGSAVYVSVQVPWIMNGTVKENILFGHRYDA  
AtMRP2 ILGELPATSDAIVTLR-----GSVAYVPQVSWIFNATVRDNILFGSPFDR  
AtMRP1 MLGELPARSDATVTLR-----GSVAYVPQVSWIFNATVRDNILFGAPFDQ  
MRP1 LLAEMDK-VEGHVAIK-----GSVAYVPQQAWIQNDLRENILFGCQLEE  
YBT1 LLGEMYLLNGKVVVPALEPRQELIVDANGTTNSIAYCSQAAWLLNDTVKNNILFNSPFNE  
PfMRP1 ILGDFNMTHGNLYIEN-----FFKKMPILYVPQNSWLFMGNIRSMILFGNEYNP  
\* . : \* \* : : \*\* . : . . : \* \* \* \* : : \* \* \* \* : :

BPT1 DYYDLTIKACQLLPDLKILPDGDETLVGEKGISLSGGQKARLSLARAVYS-----  
YCFI EFYEKTIKACALTIDLAILMDGDKTLVGEKGISLSGGQKARLSLARAVYA-----  
AtMRP2 EKYERAIDVTSLKHDLELLPGGDLTEIGERGVNISGGQKQRVSMARAVYS-----  
AtMRP1 EKYERVIDVTALQHDLELLPGGDLTEIGERGVNISGGQKQRVSMARAVYS-----  
MRP1 PYYRSVIQACALLPDLEILPSGDRTEIGEKGVNLSGGQKQRVSLARAVYS-----  
YBT1 ARYKAVVEACGLKRDFEILKAGDLTEIGEKGITLSGGQKQRVSLARALYS-----  
PfMRP1 LIYKYTILQSELLNDLSTIEHGMKYIN-DDHNLSKGQKVRICLARALYEHYIHMHLCT  
\* . : \* \* : : \*\* . : . . : \* \* \* \* : : \* \* \* \* : :

BPT1 -----RADIYLL  
YCFI -----RADTYLL  
AtMRP2 -----NSDVYIF  
AtMRP1 -----NSDVCIL  
MRP1 -----NADIYLF  
YBT1 -----NARHVLL  
PfMRP1 DYEKKLIQPNEILDKDLINNKNISSYNNKSKLVNYPFNENYLQKCLMDDNNFYLYLL  
\* . : \* \* : : \*\* . : . . : \* \* \* \* : : \* \* \* \* : :

BPT1 DDILSAVDAEVSKNIEYVLIGKT-----  
YCFI DDPLAAVDEHVARHLIEHVLG-PN-----  
AtMRP2 DDPLSALDAHVG-QQVFKECIKR-----  
AtMRP1 DDPLSALDAHVG-QQVFKECIKR-----  
MRP1 DDPLSAVDAHVG-KHIFENVIGPK-----  
YBT1 DDCLSAVDSHTA-SWIYDNCITGP-----  
PfMRP1 DDIFTSLDPSISKKIFSNLFCEDNISFKDNCFSIISMNKSTLDNFLIEDILDNVQYEVN  
\* \* : : : \* \* . . . .

BPT1 -ALLKNKTIILTNTVVSILKHSQMIYALENGEIVEQGNIEDVMNRKNNTSKLKKLLEEFD  
YCFI -GLLHTKTKVLATNKVSALSIAADSIALLDNGEITQQGTYEIT--KADSPWLKLLNNYG  
AtMRP2 --ELGQKTRVLVTNQLHFLSQVDRIVLVHEGTVKEEGTYEELSSNGPLFQRLMENAG--K  
AtMRP1 --ELGQTRVLVTNQLHFLSQVDKILLVHEGTVKEEGTYEELCHSGPLFQRLMENAG--K  
MRP1 -GMLKNKTRILVTHSMSYLPQVDVIIVMSGGKISEMGSYQELLARDGAFAEFLRTYASTE  
YBT1 -LMEDRTCILVSHNIALTLRNAELVVLLEDGRVKDQGDPIIDMLQKGLFGEDELVKSSILS  
PfMRP1 IFEIQDKTLKYRGNISEYMEKNNLNITKESHWGYSNLNTIDYTRIKLKFDEVELNHVKHSN  
\* . : \* \* : : \*\* . : . . : \* \* \* \* : : \* \* \* \* : :

BPT1 SPIDNGNESDVQTEHRSESEVDEPLQLKVTSETEDEVVTESELELIKANSRRASLATLR  
YCFI ---KKNNGKSNEFGDSESSVRESSIPVEGELEQLQKLNLDLDFGNSDAISLRRASDATLG  
AtMRP2 VEEYSEENGEAEADQTAEQPVANGN-----TNGLQMDGSDDK  
AtMRP1 VEDYSEENGEAEVDQTSVKPVANGN-----ANNLQKDGIETK  
MRP1 QEQDAEENGVTGVSQPGKEAKQOMENGLVTDSDAGQLQRLSSSSSYSGDISRHHNSTAE  
YBT1 RANSANLAAKSSSTLSNLPVKEQ-----QVSVNNSSSHFEAKKL  
PfMRP1 KMIYKEAYFVKGNTESVSFEIDSINKEYIKMKKKNYKKEHMKNKNKNNNNNNNSNKDD  
\* . : \* \* : : \*\* . : . . : \* \* \* \* : : \* \* \* \* : :

BPT1 PR-----  
YCFI SI-----  
AtMRP2 KS-----  
AtMRP1 NS-----  
MRP1 LQ-----  
YBT1 QK-----  
PfMRP1 HININMNDNHRNYNDINLGNSTDDSPVSSLGNEYTLDTYTSNNSDKEEIVKPLYKDTH  
\* . : \* \* : : \*\* . : . . : \* \* \* \* : : \* \* \* \* : :

BPT1 -----PFVGAQLDSVKKTAQKAKEKTEVGRVTKIYLAYIKACG-VLGVVLLFF  
YCFI -----DFG-----DDENIAKREHREQGVKWNIIYLEYAKACN-PKSVCVFI  
AtMRP2 -----KEGNK--GGKSVLIKQEERETGVVSWRVLKRYQDALGGAWVMMMLL  
AtMRP1 -----KEGN-----SVLVKREERETGVVSWKVLERYQNALGGAWVMMMLV  
MRP1 -----KAEAKK--EETWKLMEADKAQTQGVKLSVYWDYMKAIK-LFISFLSI  
YBT1 -----SLRTEAERTEDGKLIEETKEEGVVGLDVYKWKYLFIFGGWKIVSFLA  
PfMRP1 EEFNKSSSMPFVKSSSNMNNPNSFKYEDNSSSFKGISLETYLWYFQVGVFLLTSVVI  
\* . : \* \* : : \*\* . : . . : \* \* \* \* : : \* \* \* \* : :





## Anexos

```

BPT1      ISDIGLFDLRSHLAIIPQDAQAFE-GTVKTNLDPFNRYSEDELKRAVEQAHLKPHLEKML
YCFI      INEIGLYDLRHKLSIIPQDSQVFE-GTVRENIDPINQYTDEAIWRALELSHLKEHVLSMS
AtMRP2    VGKFGMLMDLRKVLGIIPQSPVLFSGTVRFNLDPFGEHNDADLWESLERAHLKDTIRRN
AtMRP1    IGRFGLMDLRKVLGIIPQAPVLFSGTVRFNLDPFSEHNDADLWESLERAHLKDTIRRN
MRP1      IAKIGLHDLRFKITIIPQDPVLFSGSLRMNLDPPFSQYSDEEVWTSLELAHLKDFVLSALP
YBT1      ISGVDLQRLRRSITIIPQDPTLFS-GTIKTNLDPYDEFSDRQIFEALKRVNLISEEQLQQ
PfMRP1    IRTYNRKGEDSIIIGILAQSSFFVFNWNIRTFIDPYNFTDDEIVHALKLNGINLKGNDLY
          : . : * : * . * . : : * * . . . : : : : :
BPT1      HSKPRGD---DSNEEDGNVNDILDVKINENGSNLSVGQRQLLCLARALLN--RSKIIVL
YCFI      N-----DGLDAQLTEGGNLSVGQRQLLCLARAMLV--PSKIIVL
AtMRP2    LG-----LDAEVSEAGENFSVGQRQLLSLRALLR--RSKIIVL
AtMRP1    LG-----LDAEVTEAGENFSVGQRQLLSLARALLR--RSKIIVL
MRP1      DK-----LDHECAEGGENLSVGQRQLVCLARALLR--KTKIIVL
YBT1      GATRETSNEASSTNSENVNKFLLDLSSEISEGGSNLSQQRQLMCLARSLR--SPKIIVL
PfMRP1    KYMHKQDMKS--NYKKIIQTSKVINQSNNDNTILLTNDICIRYLSLVRLYLNRHKYKIIII
          : : : : : : : : : : * * * * * * * * * * : : :
BPT1      DEATAS-----VDMETDKIIQDTIRREFKDRILTIAHRLDITVLDSDKIIIVLD
YCFI      DEATAA-----VDVETDKVVQETIRTAFAKDRILTIAHRLNTIMDSRIIVLD
AtMRP2    DEATAA-----VDVRTDALIQKTIREEFKSCMTMLIIAHLRNTIIDCDKILVLD
AtMRP1    DEATAA-----VDVRTDVLIQKTIREEFKSCMTMLIIAHLRNTIIDCDKILVLD
MRP1      DEATAA-----VDLETDDLIQSTIRTFQFEDCTVLTIAHRLNTIMDYTRVIVLD
YBT1      DEATAS-----IDYSSDAKIQETIRKEFQGSTILTIAHRLRSVIDYDKILVMD
PfMRP1    DEIPIFNLNNSVHDELNSFLIGKAKSFNYIIRNHFPNNTVLIISHHANTLSCCDYIYVLR
          * * . . . . : * * * . * : * * * : : : : * :
BPT1      QGSVREFDSPSKLLSDKTSIFYSLCEKGGYK-----
YCFI      NGKVAEFDSPGQLLSDNKSLFYSLCMEAGLVNEN-----
AtMRP2    SGRVQEFSSPENLLSNEGSSFSKVMQSTGAANAELYRSLVLDNKRAKDD---SHHLQGG
AtMRP1    SGKVQEFSSPENLLSNEGSSFSKVMQSTGTANAELYRSITLENKRTREANGDSDQPLEGG
MRP1      KGEIQEYGAPSDLLQQRGLFYSMKADAGLV-----
YBT1      AGEVKEYDHPYSLLLNKQSAFYSMCEHSGELDILIELAKKAFVEKLNKSKD-----
PfMRP1    KGEITYRCSYEDVKTQSELSHLLEMDD-----
          * : . : : .
BPT1      -----
YCFI      -----
AtMRP2    RKWLASSRWAAAAQFALAASLTSSHNDLQSLEIEDDSSILKRTNDAVVTLRSVLEGGKHK
AtMRP1    RKWQASSRWAAAAQFALAVSLTSSHNDLQSLEIEDDSSILKKTDAVVTLRSVLEGGKHK
MRP1      -----
YBT1      -----
PfMRP1    -----
BPT1      -----
YCFI      -----
AtMRP2    EIAESLEEHNISREGWLSLYRMVEGLAVMSRLARNRMQOPDYNFEGNTFDWDNVEM
AtMRP1    EIEDSLNQSDISREERWPSLYKMWVEGLAVMSRLARNRMQHPDYNLEKGSFDWDNVEM
MRP1      -----
YBT1      -----
PfMRP1    -----

```

**Alinhamento da sequência total de PfMRP2 com cada uma das 6 sequências das proteínas de diferentes organismos que lhe eram mais semelhantes**

|         |  |           |
|---------|--|-----------|
| PfMRP2  | <i>Plasmodium falciparum</i>                                 | 2109 a.a. |
| MRP11   | <i>Arabidopsis thaliana</i>                                  | 1194 a.a. |
| YOR1    | <i>Sacharomyces cerevisiae</i>                               | 1477 a.a. |
| YBT1    | <i>Sacharomyces cerevisiae</i>                               | 1661 a.a. |
| CFTR    | <i>Mus musculus</i>  | 1476 a.a. |
| CFTR    | <i>Dasyopus novemcinctus</i>                                 | 1482 a.a. |
| L259    | <i>Drosophila melanogaster</i>                               | 1290 a.a. |
| MmCFTR  | -----  |           |
| DnCFTR  | -----  |           |
| L259    | -----  |           |
| AtMRP11 | -----  |           |
| YOR1    | -----  |           |
| YBT1    | MHHVNLNSTRPDRFHFYDDVDTQYGRTKYLNYYTPLVLLIFTVLFITYNIWKHYHYDVLH |           |
| PfMRP2  | -----MMRRRSVYNFDQGGKHYLMNH                                   |           |

## Anexos

```

MmCFTR -----
DnCFTR -----
L259 -----
AtMRP11 -----
YOR1 -----
YBT1 LKQKNPIDELLYSSTDEDEQSPLINNTITTTNYVDNNCTKDALKNRHFSLEKLKSVKVG
PfMRP2 ISWLNFSVFNWITQLLRCLKNDDFVLPCEETSSIEHYSTNLNRNVRNIQLRKYNKYNY

MmCFTR -----
DnCFTR -----
L259 -----
AtMRP11 -----
YOR1 -----MTITVGDVAVSETELENKSQNVVLSPKASASSDISTVDVKDTSSSSWD
YBT1 EPHGTPEIVRRGFIEKSRIILEFFLVLSQVVIHSFILLHYVNKNPEFTQQGTITGLVEWC
PfMRP2 KNYCCSKYNDGNKSCSCSTKNHTNKFHKRKEDHFLKSSGITYAVLKTFFKYLSLISFFH

MmCFTR -----MQ
DnCFTR -----MQ
L259 -----MSFI
AtMRP11 -----
YOR1 DKSLLEPTGEYIVDRNKPQTYLNSDDIEKVTESDIFPQKRLFSFLHKKIPEVPQTDDERK
YBT1 ALFIIIVSLRLANVNQNFKFKINKYPGNLWSVSFINYLALFISMILPFRSIFIHINSPISR
PfMRP2 IIHTIFLIFVAVCIEKYVLLIKGGSNVVTLPGFGKNSKVLFGFIVISVIFISQFFDALLC

MmCFTR KSPLEKASFISKLFWSWTPILRKGYRHHLELSDIYQAPSADSADHLESEKLER-----
DnCFTR RSPLEKASVISKLFWSWTRPILRKGYRQRLLELSDIYQIPADSADNLSEKLER-----
L259 HSYIFYTFSRFLFNKYRYTIPIFRKGYRKTLDSTDLYRPLEEQKSDILGNRLCA-----
AtMRP11 -----MKHGSVKQLELENLLTLPPEMDPFTCCENLLR-----
YOR1 IYPLFHTNIIISNMFFWWVLPILRVGYKRTIQPNDLFKMDPRMSIETLYDDFEKNMIYYFE
YBT1 KYYISQISINLALFLLFFARIRNFAI IYKTD SWITPSPEPVTSIAGFICWAWLDSFVW
PfMRP2 YYDFRLRVNMEVTVMYFLYKITLGNFNQNLINRNDIYDDHSEEGKGQHKNCQYD-----

MmCFTR -----EWDREQASK-KNPQLIHALRRCFFWRFLFYGILL
DnCFTR -----EWDRELASK-KNPKLINALRRCFFWRFTFYGIIL
L259 -----SWERELKNDGRSPSLVRALLRVFGWQLGFPGLAI
AtMRP11 -----CWQLQECNNYSTP SLIWSIYGVYGWPYFRLGLLK
YOR1 KTRKKYKRHP EA-----TEEEVMENAKLPKHTVLRALLFTFKKQYFMSIVFA
YBT1 KAHKVSIVKVDIWLMMQDYSFFVVKFRYFVDHKVVKRKRIFSLNLFFFSSNYLVLCQCFW
PfMRP2 -----ENDQNDQNEQSDLRDIRMHDKHVKHND EESKDS

MmCFTR YLGEVTKAVQP VLLGR I IASYPENKVE--RSIAIYLGIGLCLLFIVRTLLLHPAIFGL
DnCFTR YLGEVTKAVQP LLLGR I IASYPDPNKVE--RSIAIYLA VGLCLLFFVVRTLLLHPAIFGL
L259 FVVELGLRTLQPIFLVKLISYFSGEPDA--ANAGFYAYA QIVISAL TVMILPTTFGI
AtMRP11 VFND CIGFAGPLLLNRLIKSFLD-----TQYTFRL
YOR1 ILANCTSGFNPMITKRLIEFVEEKAIFHSMHVNKGIGYAI GACLMFMVNGLTFNHFHTS
YBT1 AFLGVSLSFIPTVLLKRILEYVEDQSSAP--SNLAWFYVTVMFVGRILVAICQAQALFFG
PfMRP2 TNSTTYIKNNNNQMSHINDLSITNMSDVHILSSIKNQDQNNNSNNVSSMDSNTNYMSKTT

MmCFTR HRIGMQMRTAMFSLIYKKT LKLSRV-----LDKISIGQL
DnCFTR HHIGMQMRIA MFSLIYKKT LKLSRV-----LDKISIGQL
L259 HHVCFKMRVAMGSMIFRKALRLTKGA-----LGD TTSGHV
AtMRP11 SKLKLKLRSSIMSVIYRKCLWVNTAN-----RSGFSEGEI
YOR1 QLTGVQAKSILT KAAMKMFNASNYA-----RHCFPNGKV
YBT1 RRVCI RMKSIIISELYTKALRRKISTNKTKPSNEDPQEINDQKSINGDEESTSSANLGA I
PfMRP2 CLTCTGSEFNKEEKDEKKELEEA KKK-----DKEVFDISI
. . . * : . . . :

MmCFTR VSLLSNNLNK FDEGLALAHFIWIAPLQVTL LMGLLWDL LQSAFCG-LGLLIILVIFQAI
DnCFTR VSLLSNNLNK FDEGLALAHFVWIAPLQVTL LMGLLWDL LQSAFSG-LGVLIILACFAQG
L259 VNLSNDIPRLDSAPYTVHYLWVGPLQVLVITYL MYQEIGISAVFG-VLFMLLFMPIQMY
AtMRP11 QTFMSVDADRIVNLCNSLHDLWSLPLQIGIALYLLYTQVKFAFLSG-LAITILLIPVNKW
YOR1 TSFVTDLARIEFALSFQPLAGFPAILAICIVLLIVNLGP IALVG-IGIFFGGFFISLF
YBT1 INLMAIDAFK VSEICGYLHSFLEAFVMTVVALALLYRLLGF AAVG-VLIIVAMLP LNYK
PfMRP2 YNIMFIDTPFLIYFITALIELANMI IKFIMS FMYFYKMGSAAVLNGALLIIIMYGLMFA
. : : . . . : : : . . . . .

```

Anexos

MmCFTR LGKMMVKYRDQRAAK INERLVITSEIIDNIYSVKAYCWESAMEKMIENLREVELKMRKA  
DnCFTR FGRMMMKYRDQRAGK INERLVITSEMIENIQSVKAYCWEEALEKMIENFRQSELRLTRKA  
L259 LGTRTSAIQLKAAERTDNRIRMVNEIISAIQVLKMYAWEQPFEQMVTHAREKEMNTIRQG  
AtMRP11 ISVLIASATEKMMKLDKDERIRKTGELLTNIIRTLKMYGWDNWFADWLKETRATEVTHLATR  
YOR1 AFKLLILGFRIAANIFTDARVTMMREVLNNIKMIKYTWEDAYEKNIQDIRTKEISKVRKM  
YBT1 LAKYIGDLQKKNLAVTDNRIQKLNFAFQAIRIIKYFSWEENFEKDINTIRENELSLLMR  
PfMRP2 FEFSSSLFKLKYLYRDRTRISNMHHILKEFKLMKIFNWESIAFDYVMFRIKEMKICKIR  
: \* : . : : \* : \* : . : \* \* :

MmCFTR AYMRFFTTSSAFFFSGFFVFLSVLPYTVINGIVLRKIFTTIS-FCIVLRMSVTR---QFP  
DnCFTR AYVRYFNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILRKIFTTIS-FCIVLRMAVTR---QFP  
L259 QYIRGFDFARRIVLSRVAIFLSLVGYVILGKVFTPEIAFMITAYYNVLLAAMSI---YVP  
AtMRP11 KYLDAWCVFFWATPTLFLSLCTFGLFALMGHQLDAATVFTCLALFNLSLISPLN---SFP  
YOR1 QLSRNFLIAMAMSLPSIASLVTFAMYKVNKGGRPNGNIFASLSLQVLSLQMF---FLP  
YBT1 SIVWSISSFLWFVTPITIVTAASFAYYIYVQGEVLTTPVAFTALSFLTLLRDLPLD---RLS  
PfMRP2 TYLSSLSNYVNNISVNIIVEVAIFFFYIRSELKSNKTVSFSLLITPLFVYKSLISGVSNFP  
: . . :

MmCFTR TAVQIWDYDFGMIRKIQDFLQKQYKVEYNLMTTGIIMENVTAFWEEGFGELLEKVQQS  
DnCFTR WAVQTWYDSLGAINKIQDFLQKQYKSLEYNLTTDVMETVTAFWEEERFGELFEKAKQN  
L259 SAI IQTAQFLTSIRRVEQFMQSEELGSSDKSEGPSKDTVPGNPPSNNNEADLLKSAISIR  
AtMRP11 WVINGLIDAFISTRVRVSKFLCCLEHS---RDFSIDSGFTSEDLAVCVEDASCTWSSNVEE  
YOR1 IAIGTGIDMIIGLGRLOSLLEAPEDDPNQMIEMKPSPGFDPKLALKMTHCSFEWEDYELN  
YBT1 DMLSFVVQSKVSLDRVQDFLNENDTKKYDQLTIDPNGNR----FAFENSTISWDKDNQD  
PfMRP2 NIINNLIEGAINIKRINKYINYLFNNDMNDYFKNSLNGMKSNTCNFQNGNTNNVNGYVD  
: : : . . :

MmCFTR NGDRKHS-----  
DnCFTR NNNRKIS-----  
L259 DLKAKWD-----  
AtMRP11 DYNLTIK-----  
YOR1 DAIEEAKGEAKDEGKKNK-----  
YBT1 FKLKDLN-----  
PfMRP2 DYVDDYVDDYVDDYVNDYVNDYVDDYMDHMEYNININSKNGCSSKSRKNNKSFKDHFS

MmCFTR -----  
DnCFTR -----  
L259 -----  
AtMRP11 -----  
YOR1 -----KRKDTWGKPSA  
YBT1 -----  
PfMRP2 NHEQGTMQSFYKFLDTHKNKTKQKSDCKKKCSNNQLSKSNNNNVVGESNNSLQDRKGWY

MmCFTR -----SDENNVFSHLCVGNPVLKNINLNIKGEMLAITGSTGSGKTSLLMLIL  
DnCFTR -----NVDNSLFFSNFSLGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMMIM  
L259 -----PNSPDYTLS-----GINLEIKPGSVVAVIGLTGSGKSSLIQAIL  
AtMRP11 -----QVS-----LRVPKGSFVAVIGEVGSGKTSLLNSLL  
YOR1 STNKAKRLDNMLKDRDGPEDLEKTSFRGFKDLNFDIKKGEFIMITGPIGTGKSSLLNAMA  
YBT1 -----IEFKTGKLNVIIGPTGSGKTSLLMALL  
PfMRP2 PKNKHFKDNIVINMKNCYFSSKNNDYILKNINLTLKNNSVVIILGNVSGKTIFFYSLL  
: . . . : \* \* : \* : : :

MmCFTR GELEASEGIIKHSGR-----VSFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYR  
DnCFTR GELEPSEGKIKHSGR-----ISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVCYDEYR  
L259 GELKANSQQLQVNGS-----LSYTSQESWLFSGTVRQNILFGQPMSQR  
AtMRP11 GEMRCVHGSILLNGS-----VAYVPQVPWLLSGTVRENILFGKPFDSKR  
YOR1 GSMRKTGDGKVEVNGD-----LLMCG-YPWIQNASVRDNIIFGSPFNKEK  
YBT1 GEMYLLNGKVVVPALEPRQELIVDANGTTNSIAYCSQAAWLLNDTVKNNILFNSPFNEAR  
PfMRP2 GQFKLSCGSFYLKNYIYKYM-----ILYVPQFNWISLGTIRSMILFGNKYDESI  
\* . : \* . : \* : \* : \* : \* : \* : \* : \*

MmCFTR YKSVVKACQLQDDITKFAEQDNTVLGEGGVTLGGQRARISLARAVYK-----  
DnCFTR YRSVIKACQLVEDISKFAEKDNTVLGEGGITLGGQRARISLARAVYK-----  
L259 YEEVVKKCALERDFDLLPLRDNTIVGERGATLGGQKARISLARAVYR-----  
AtMRP11 YFETLSACALDVIDISLMVGGDMACIGDKGLNLSGGQRARFALARAVYH-----  
YOR1 YDEVVRVCSLKADLDILPAGDMTEIGERGITLGGQKARINLARAVYK-----  
YBT1 YKAVVEACGLKRDFEILKAGDLTEIGEKGITLGGQKQRVSLARALYS-----  
PfMRP2 YYDVIVKSELFHDIISFKKKDMRYIS-DEHSLSKGQKARICLARALYHHYIHMKHMNLKY  
\* . : \* \* : : \* : . \*\* \* : \* . \* : \* : \*



## Anexos

```

MmCFTR -----ISNSSYVVIITSTSFYYIFYIYVGV
DnCFTR -----SANDSSAVIITSTSSFYFLYIYVGV
L259 -----TAAGHGEMEDMESKSMVDVYKYTLI
AtMRP11 -----KGVSHYSTSFYLMVLCIF
YOR1 -----NRPPSFYMGLYSFF
YBT1 -----AQRAIAFISKASHLIDWRGSSQISMASAENQPSSGHSTMYLVLYLII
PfMRP2 KKIGRPLIIVIIIFMLLSIFTDEIKNLILFLASTILKSGDKKDEEILNQQLVYLYNFILL

MmCFTR ADTLLALSFRGLPLVHTLITASKILHRKMLHSILHAPMSTISKLKAGGILNRFKDI
DnCFTR ADTFLALGLFRGLPLVHTLITVSKILHMKMLHSVLQAPMSTLNTLKAGGILNRFKDI
L259 IILSVIMNLSSSFLLFNIAKKASIRLHNTIFNRVTRADMHFFSINKHGSILNRFKDM
AtMRP11 CIINSILTLVRAFSAFAGGLKAAVHVHNALISKLINAPTQFFDQTPSGRILNRFSSDLY
YOR1 VFAAFIFMNGQFTILCAMGIMASKWLNLRVAVKRIILHTPMSYIDTTPPLGRILNRFK
YBT1 GFAQALLGAGKTIILNFVAGINASRIKIFNMILNKVLHSKIRFFDADPTGRIMNRFK
PfMRP2 PSISLLTTLISFMLIAHGIVKSAIKVHTEVLLSILYAPIHAFYSNNLGNINKFITD
          : : . : : : * * : * * . *

MmCFTR LDD-FLPLTIFDFIQLVFIVIGAIIVVSALQPYIFLATVPGLVVIFLLRAYFLHTA
DnCFTR LDD-LLPLTIFDFIQLLLIVIGAVAVVSILKPYIFLATVPVIVAFVLLRAYFLHTS
L259 VDE-VLPVVLVDVMQIALWLAGIIIVIANVNPLLLVPTLMLSVIFYHLRNLYLKT
AtMRP11 IDD-SLPIILNILLANFVGLLGIIVVLSYVQVLFLLLLLPFWYIYSKLQV
YOR1 LDN-ELTESLRLMTSQFANIVGVCVMCIVYLPWFAIAIPFLLVIFVLIADHYQSS
YBT1 IDQ-ELTPYIQGAFYSLIECLSTVILITFITPQFLSVAIVVSILYFVGYFYMAGS
PfMRP2 LDNGLIKRIYKSFYTLFRFLFTFLLLIYMVKYTIIVFPFIMLIIYFFVFNKY
          : * : : : : : : : : : : : : : : :

MmCFTR QLESEGRSPIFTHLVTSLKGLWTLRAFRRQTYFETLFHKALNLHTANWFMYLATL
DnCFTR QLESEARSPIFTHLVTSLKGLWTLRAFGRQPYFEALFHKALNLHTANWFLYLSTL
L259 RVEAINRSPVYSHLAASLNGLTTIRALDAQRVLEKEFDSYQDAHSSAFFMYIST
AtMRP11 RLDVSRSPVYSHLAASLNGLTTIRALDAQRVLEKEFDSYQDAHSSAFFMYIST
YOR1 RLEAVQRSFVYNNLNEVLGMDTIKAYRSQERFLAKSDFLINKMNEAGYLVVVLR
YBT1 RFESISRSPVYSHLAASLNGLTTIRALDAQRVLEKEFDSYQDAHSSAFFMYIST
PfMRP2 RGFLASHAPLCTIYSNTIIGKDVINLYKKNYFLTLYKQKIFDFRNYTIFKWSIT
          : : : : * . : : : : : : : : : :

MmCFTR RIDMIFVLFFIVVTFISILTTGEGE-----GTAGIILTLAMNIMSTLQAVN
DnCFTR RIEMIFVIFFIATVTFISILTTGEGE-----GTVGIILTLAMNIMSTLQAVN
L259 CMNCICVIYISIIITLSFFAFPPGNG-----ADVGLVITQAMGLIDMVQWGV
AtMRP11 RLQLLGSMLVLFVAVMAVLGSGGNFPISFG----TPGLVGLALSAAPLVSL
YOR1 FLDMAIAAFALITLLCVTRAPPIS-----AASVGVLLTYVLQPLGLNLTIL
YBT1 RIDMIGSLVIFGAGLFIILFNINLDS-----GMAGISLTYAISFTEGALW
PfMRP2 YVQLIVLALTFYIIPHFHFKHAKQDHEINYEKEASTIGYCITFSCSLGFVIKSL
          : : : . * : : : : : : : : : :

MmCFTR IDTDSLMSVSRVFKFIDIQTEESMYTQIIKELPREGSSDVLVIKNEHVKKSDI
DnCFTR IDVDSLMSVSRVFKFVDIPTENKPTKSIKLPKDGQLSKVMIENQHVKKDDI
L259 AELENTMTAVERVVEYESIEPEGMLEAPDDKPPK-----TWPEQGE
AtMRP11 TETEKEMVSVERVLQYMDVPQEEVSGPQSL-----DKWPVHGL
YOR1 TQTENDMNSAERLVYATELPLEASYRKPEMTPPE-----SWPSMGE
YBT1 SEVEMNMNSVERVKEYMEIEQEPYNEHKEIPPP-----QWPQDGK
PfMRP2 THEKEMCSTQRLEECCKMIKDEGYSDDNITLQNNDP THEDNNNNN-----
          . : * . . * :

MmCFTR MVVKDLTVKYMD-----
DnCFTR MTKDLTAKYID-----
L259 IIFKELNLRYPN-----
AtMRP11 VEFHNVTMRYIS-----
YOR1 IIFENVDFAYRP-----
YBT1 IEVNDLSLRYAP-----
PfMRP2 NLFKSVPGSYDPNDKENMRKYKTEIVNNTKDMYSIINKDDMLTHSINNKNK
          . . . : *

MmCFTR -----DGNVLENISFISISPGQRVGLLGR
DnCFTR -----GGNAILENISFISISPGQRVGLLGR
L259 -----AKAENVLKSLSFVIQPREKVGIVGR
AtMRP11 -----TLPPALTQISFTIQGGMHVGVIGR
YOR1 -----GLPIVLKKNLNLNLIKSGEKIGICGR
YBT1 -----NLPRVIKNVSFSVDAQSKIGIVGR
PfMRP2 HIDINKIKYGICFERVFSYKKKICVDRKNNKYEVNEKSCLKNINIYALKNQKIGIVGR
          : . . : : * : * :

```



ANEXO 7

Comparação da sequência de a.a. do NBD1 e NBD2 de PfMRP1

Sequencia 1: PfMRP1\_NBD1 682 a.a.

Sequencia 2: PfMRP1\_NBD2 369 a.a.

Sequências (1:2) Score: **17.0732**

```
PfMRP1_NBD1  givnikrlnnyindhlyndiknyfmyrtrynedynvqkcfqenitshddgtshnlkhlknkikkltnmfkyfff 80
PfMRP1_NBD2  -----ikfllcdythekemccvqrleefaklankennsmkkn----- 39

PfMRP1_NBD1  yhkmyhknankqilsqllknndatnkki cfqehknsstynynshhhekeeyenahssstmsnefkekknney 160
PfMRP1_NBD2  -----elnvlttctykekenesd-----kiqaiweyknvslssaisseddekkkygikfnnvy 95

PfMRP1_NBD1  iklencsfqlsydnkqandhilkniinfknslaiiignvsgkksaffhsilgdfmthgnlyienffkkmpilyvpq 240
PfMRP1_NBD2  vsykkkiplngtykyideepsikniinmyalknqkigivksgagkstillsilgliniagqkctvc----- 162

PfMRP1_NBD1  nswlfmgnirsmilfgneynplykytilqsellndlstiehgdmkyinddhnlskgqkvriclaralyehyihmhkict 320
PfMRP1_NBD2  ----- 162

PfMRP1_NBD1  dyekkligpneildkdlinnknissynnkksklnvniipfneyqkclmddnnyfllliddiftslapsiskkfnsnf 400
PfMRP1_NBD2  -----grdrtvnrkgadsilgilqssfvfynnrtrtidpynaftddeivhalk 213

PfMRP1_NBD1  ckednlqfknccsaiismkeldnflidildnvyevni fegqkllkyrgnseyneannlnkeshwgyshnti 480
PfMRP1_NBD2  lnginlgkndlykmhkqdmknykkifctskvingsontiltcdchylslrlylnhkykfilideipifnln-- 291

PfMRP1_NBD1  dytriklfdevelnhvkhshnkmiykeayfvkgnatesvsfeidehkeydkmkknykkehmkknkdnnnnnnsnkdd 560
PfMRP1_NBD2  -----nsvhdehnsfilgkagsfnyirnhfpm----- 320

PfMRP1_NBD1  hininmndhrnyndinlgnpsntddptvgslnmeyldtvtensndkdeivplvktchebfkhsmpfvkssnmin 640
PfMRP1_NBD2  -----tvliqhantlscodiyvrlkqgitycsjedvtcsqllhemdd----- 369

PfMRP1_NBD1  npsnfkyednsesfkgsisletylwyfqvgfvlltsvvi fm 682
PfMRP1_NBD2  ----- 369
```

Comparação da sequência de a.a. do NBD1 e NBD2 de PfMRP2

Sequencia 1: PfMRP2\_NBD1 954 a.a.

Sequencia 2: PfMRP2\_NBD2 414 a.a.

Sequências (1:2) Score: **14.0097**

```
PfMRP2_NBD1  sslfkllkyrdtrismnhilkefkmlkifnwesiafdyvmfrikemkickirtylsslsvnyvnisviveaiff 80
PfMRP2_NBD2  ----- 0

PfMRP2_NBD1  fyirselksnktvsfsslitplfvykslisgvnsfnpiannliiegainkrinkvnyylnndmndyfklslnmksnt 160
PfMRP2_NBD2  -----thwecmcsqrleecskmkkdegssdnitlqndpthednqn 44

PfMRP2_NBD1  cncfngntcnvnyvddyvddyvddyvdyvndyvdyvymchmneyinlnskngcssksrknkcsfskdifsnheg 240
PfMRP2_NBD2  nnnnnnneqdan-----lfsvpgsydpdkgnmrkyktefvn--ntkdmysiinkddmltshsnkn 105

PfMRP2_NBD1  gtmqsfykfldthknktckrksdckkkcsnqlksnannvgesmmslfqdrkgwypknhfkdnivimknicyfskn 320
PfMRP2_NBD2  nkllklytsphidinklyg----icfgrvfsvykkkicvdrknn-----kyeyv 152

PfMRP2_NBD1  dyilkniinltknnsvviilgnvsggkbfiffysllgqfklscsfylknyiykypilyvpqfnwslgtirsmilfqn 400
PfMRP2_NBD2  ekscilkninlyalknqkigivksgagkstmlsilgligtbrg-----ritlegqiktctid 211

PfMRP2_NBD1  kydeslyydvivkseflfdilfsfkdkdmnyisdenslskgqkriclaralyhyahmkhmllyyqknelinekmkki 480
PfMRP2_NBD2  erkmgvlpqsgsfvffhwmtrtfidpykfddeiydafklloqnllyddldsylykqqrqqkkan----- 279

PfMRP2_NBD1  krddnhtagrndntpnnntdnnntsdnnntsnntsdnnntsnntsdnnntsnntsdnnntsnntsdnnntsnntsd 560
PfMRP2_NBD2  -----kntnlwkkksfiqltms----- 297

PfMRP2_NBD1  ernisylylfdldfslapclskdifynlfcdkekighfknsffilsiseilnfsisncilnmqydvliykenst 640
PfMRP2_NBD2  -----islsdeciyrlslvriflfn-----kykllideipvlnfcynkkictn----- 342

PfMRP2_NBD1  lhyegnlvdyikknnivvkedivqtnkqcekksltnegvksmlslnedwnymhrvkkksitqkettknydnndnndn 720
PfMRP2_NBD2  ----- 342

PfMRP2_NBD1  ndnnndnnndnnndnnndnnndnnnnnnnnnnvsvkeilsceiktqdhynnihscktnfekhnnsiyskenetrkih 800
PfMRP2_NBD2  ----- 342

PfMRP2_NBD1  dikyhkfmvlkqfktiyfktiysfntetndeynktvyrkyckviqnyhnclegkkksfrnyksinsyneiliken 880
PfMRP2_NBD2  -----ffctkiksfiyilctffntsvliiahgastls----- 375

PfMRP2_NBD1  kvweqdtvnyndyideyekiknvlcklkynnylscdynsdhfdfneelkfkgnikletfswylkkgirpli 954
PfMRP2_NBD2  --ccdfivvkgvkvkcsykvvqgtelanllqekqln-----w----- 414
```

## Anexos

### Comparação da sequência de a.a. do NBD1 e NBD2 de Pgh1

Sequencia 1: Pgh1\_NBD1 455 a.a.

Sequencia 2: Pgh1\_NBD2 460 a.a.

Sequências (1:2) Score: **22.4176**

```
Pgh1_NBD1 ----- 0
Pgh1_NBD2 ekkenmssgvfafssddemfkdpfqliqeaifynmhtvinygledyfcnliekaidyknkgqkriivnaalwgfssqaql 80

Pgh1_NBD1 -----atpslyelinkplvenndagetlpn- 26
Pgh1_NBD2 finsfaywfgsflikrgtilvddfmkslftfiftgsyagklmslkgdsenaklsfkyypimirkendvrdgggirink 160

Pgh1_NBD1 ---ikkiefkvsvfhydrkdvveiykdlstlkegktyafvgesgqgkstilkllerlydotagdiivndshlkiilk 103
Pgh1_NBD2 nlikgkvdikdvnfrylrbvpyiknlstcdskktcalvgetsgkstfmmllrfydlkdhiilk--amtfdy 238

Pgh1_NBD1 wwrskigvvsqcpillfssisiknnikvslskdleamnyyeenttdtyenkfslisns---mtsnellmkkeyatlk 180
Pgh1_NBD2 qnnnnslylknvnefsngsgsaedytvfnngellddnicvnlrdlrnlfsivsgqepmlfnmsiyeplifgrsdct 318

Pgh1_NBD1 dsdvvdsvkvlindfvsslpdkydtlvgsnaklsggqkqrliaralmtpkilildeatsslknksylvqktinnl 260
Pgh1_NBD2 ledvkrvskfaaidefleslpnkdydtvvgpyklslggqkqrliaralmtpkilildeatsslknksylvqktinnl 398

Pgh1_NBD1 kgnhrtitiahrstiryanctifvlsnrerdnnnnnnndnnnnnnnnkinnessyieqgthdslmknkgiyh 340
Pgh1_NBD2 kdkadktitiahrlasirksekivvfnpdrn-----stfvqshgthdelisaqgiyk 453

Pgh1_NBD1 lmnncdissnkssnngndngsdnkssaykdsdtgndadnmmlsihenenisnrncktaenekeekvpffkrmfrrk 420
Pgh1_NBD2 kyvklak----- 460

Pgh1_NBD1 kkapnnlriiykeifsykkdvtiiffsilvaggly 455
Pgh1_NBD2 ----- 460
```



ANEXO 8

**Alinhamento das sequências de nucleótidos e de a.a. de PfMRP1, resultantes sequenciação e tradução da totalidade dos fragmentos do gene *pfmrp1* dos clones Dd2 e 3D7.** Diferenças pontuais e inserções/deleções identificadas entre os clones (vermelho), nucleótidos e a.a. assinalados, correspondem à sequência de 3D7; Sequências características de proteínas ABC (azul); Hélices transmembranares previstas pelo SOSUI (cinzento); Sequência dos fragmentos a clonar para produção de proteínas recombinantes (verde).

|     |            |             |              |             |             |
|-----|------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
|     | 1          |             |              |             | 50          |
| Dd2 | ATGACGACAT | ATAAAGAAAA  | TGTTGGAATA   | TCAAATAAAG  | GAAATAAAAA  |
| 3D7 | ATGACGACAT | ATAAAGAAAA  | TGTTGGAATA   | TCAAATAAAG  | GAAATAAAAA  |
|     | 51         |             |              |             | 100         |
| Dd2 | AAAAAAAAGT | TGTCAAAAATA | TATCATTTTT   | AAATTTTTTTA | TCCTTTTGATT |
| 3D7 | AAAAAAAAGT | TGTCAAAAATA | TATCATTTTT   | AAATTTTTTTA | TCCTTTTGATT |
|     | 101        |             |              |             | 150         |
| Dd2 | GGATAAGACC | GTTAATAAAT  | GATTTAATAA   | AAGGAGATAT  | TCAAGAACTT  |
| 3D7 | GGATAAGACC | GTTAATAAAT  | GATTTAATAA   | AAGGAGATAT  | TCAAGAACTT  |
|     | 151        |             |              |             | 200         |
| Dd2 | CCTAATATAT | GTCGGAACTT  | CGATGTGCCA   | TATTATGCAT  | CTAAATTAGA  |
| 3D7 | CCTAATATAT | GTCGGAACTT  | CGATGTGCCA   | TATTATGCAT  | CTAAATTAGA  |
|     | 201        |             |              |             | 250         |
| Dd2 | AGAGAATTTA | AGAGATATAG  | AAGTAGAAGA   | CTCCGAATTT  | TACAGTGAAA  |
| 3D7 | AGAGAATTTA | AGAGATATAG  | AAGTAGAAGA   | CTCCGAATTT  | TACAGTGAAA  |
|     | 251        |             |              |             | 300         |
| Dd2 | AAAATTCATC | TAACGAACAT  | GTATTACACC   | ATTGTAATTC  | AAATGATGCA  |
| 3D7 | AAAATTCATC | TAACGAACAT  | GTATTACACC   | ATTGTAATTC  | AAATGATGCA  |
|     | 301        |             |              |             | 350         |
| Dd2 | AGTGAAAAGA | AAGTGTATAA  | TGTTTATTAC   | CATAATATTT  | TATGGTCAAT  |
| 3D7 | AGTGAAAAGA | AAGTGTATAA  | TGTTTATTAC   | CATAATATTT  | TATGGTCAAT  |
|     | 351        |             |              |             | 400         |
| Dd2 | TTTGAAAACA | TTTAAGTTTC  | GAATAATTTT   | AATAATAAGT  | TTTTTATATTT |
| 3D7 | TTTGAAAACA | TTTAAGTTTC  | GAATAATTTT   | AATAATAAGT  | TTTTTATATTT |
|     | 401        |             |              |             | 450         |
| Dd2 | TAGAGACATT | AATTGTTACC  | TTGGGGGGGA   | AATTCATAGA  | TTACTATATG  |
| 3D7 | TAGAGACATT | AATTGTTACC  | TTGGGGGGGA   | AATTCATAGA  | TTACTATATG  |
|     | 451        |             |              |             | 500         |
| Dd2 | CGTATTTTAG | AAGGTCAAAA  | GATTCCTGTA   | TATATTTTCAT | TCTTAAAAGA  |
| 3D7 | CGTATTTTAG | AAGGTCAAAA  | GATTCCTGTA   | TATATTTTCAT | TCTTAAAAGA  |
|     | 501        |             |              |             | 550         |
| Dd2 | TTTCAAAGTA | TTCAGTGGGT  | TAGTGGTAGT   | GATGATAATG  | TTTTTCCATT  |
| 3D7 | TTTCAAAGTA | TTCAGTGGGT  | TAGTGGTAGT   | GATGATAATG  | TTTTTCCATT  |
|     | 551        |             | <b>T571C</b> |             | 600         |
| Dd2 | TGTTTTTTGA | AGCTCTTTTG  | TATTTTTTATT  | TTCATCTCTT  | TACAATAAAT  |
| 3D7 | TGTTTTTTGA | AGCTCTTTTG  | CATTTTTTATT  | TTCATCTCTT  | TACAATAAAT  |
|     | 601        |             |              |             | 650         |
| Dd2 | TTAAAAGTAT | CACTAATGTA  | TTTTTTGTAT   | AAAATTAATT  | TATGCAGTAA  |
| 3D7 | TTAAAAGTAT | CACTAATGTA  | TTTTTTGTAT   | AAAATTAATT  | TATGCAGTAA  |

## Anexos

|     |                    |               |             |            |            |
|-----|--------------------|---------------|-------------|------------|------------|
|     | 651                |               |             |            | 700        |
| Dd2 | TAACAATCAT         | TTACAAAATC    | CAGATGCATT  | TTATAATACA | TATAGAAAAT |
| 3D7 | TAACAATCAT         | TTACAAAATC    | CAGATGCATT  | TTATAATACA | TATAGAAAAT |
|     | 701                |               |             |            | 750        |
| Dd2 | TTTCTTCACA         | AACAGAAATT    | GATGAGATAA  | GCAGAGATTT | TTTAAGTATT |
| 3D7 | TTTCTTCACA         | AACAGAAATT    | GATGAGATAA  | GCAGAGATTT | TTTAAGTATT |
|     | 751                |               |             |            | 800        |
| Dd2 | GGTAAGAAATG        | CATCCTCCTC    | TTCATCAGGA  | ATAAAAAATA | ATAATAAAAA |
| 3D7 | GGTAAGAAATG        | CATCCTCCTC    | TTCATCAGGA  | ATAAAAAATA | ATAATAAAAA |
|     | 801                |               |             |            | 850        |
| Dd2 | TATCGATAAT         | AATAAATTTG    | TGGAAAATGA  | TTATATAATT | AATTTTATAA |
| 3D7 | TATCGATAAT         | AATAAATTTG    | TGGAAAATGA  | TTATATAATT | AATTTTATAA |
|     | 851                |               |             |            | 900        |
| Dd2 | AAAGTACAAA         | GAAAATGGAA    | AAAGATTCAT  | TAAATGAAAA | TAGGAGTTTA |
| 3D7 | AAAGTACAAA         | GAAAATGGAA    | AAAGATTCAT  | TAAATGAAAA | TAGGAGTTTA |
|     | 901                |               |             |            | 950        |
| Dd2 | CCTAATGTGA         | ACATTTATAA    | TATTATGTTT  | TCTGATGTAC | CGTCTGTAAC |
| 3D7 | CCTAATGTGA         | ACATTTATAA    | TATTATGTTT  | TCTGATGTAC | CGTCTGTAAC |
|     | 951                |               |             |            | 1000       |
| Dd2 | ATTTTTTGTT         | ACTTCTTGTA    | TTAATTTGTT  | TAATGTATTT | GTAAAAATTT |
| 3D7 | ATTTTTTGTT         | ACTTCTTGTA    | TTAATTTGTT  | TAATGTATTT | GTAAAAATTT |
|     | 1001               |               |             |            | 1050       |
| Dd2 | TTATGTCTTT         | TTATGTGTTT    | CATATAAAGA  | TTGGGTCCAA | TTCAGTTGGA |
| 3D7 | TTATGTCTTT         | TTATGTGTTT    | CATATAAAGA  | TTGGGTCCAA | TTCAGTTGGA |
|     | 1051               |               |             |            | 1100       |
| Dd2 | ATTGCAATAT         | GGTTGTCCAT    | TGCTTTTATAC | AGTGCAATGA | TACTATTTGA |
| 3D7 | ATTGCAATAT         | GGTTGTCCAT    | TGCTTTTATAC | AGTGCAATGA | TACTATTTGA |
|     | 1101               |               |             |            | 1150       |
| Dd2 | ATTTTTACCA         | AGTTTATTTA    | AAAGTAAATA  | TTTAATTTAT | CGAGATAAAA |
| 3D7 | ATTTTTACCA         | AGTTTATTTA    | AAAGTAAATA  | TTTAATTTAT | CGAGATAAAA |
|     | 1151               |               |             |            | 1200       |
| Dd2 | GAATTGATAA         | CATGCATCAT    | GTATTTAAAAG | AATTCAAAT  | GATAAAAATG |
| 3D7 | GAATTGATAA         | CATGCATCAT    | GTATTTAAAAG | AATTCAAAT  | GATAAAAATG |
|     | 1201               |               |             |            | 1250       |
| Dd2 | TTTAATTGGG         | AATCATTTGC    | TTTTAAATAC  | ATAAATATAT | TTCGAATGAA |
| 3D7 | TTTAATTGGG         | AATCATTTGC    | TTTTAAATAC  | ATAAATATAT | TTCGAATGAA |
|     | 1251               |               |             |            | 1300       |
| Dd2 | AGAAATGAAA         | TATTGTAAAA    | TAAGACTTTA  | TTTGAGTAAC | ATAGGAGTTT |
| 3D7 | AGAAATGAAA         | TATTGTAAAA    | TAAGACTTTA  | TTTGAGTAAC | ATAGGAGTTT |
|     | 1301               | <b>G1309T</b> |             |            | 1350       |
| Dd2 | TTATAAGT <b>GC</b> | AATTTCCCTCT   | GATATAGTTG  | AAGTGGTTAT | ATTCTTTATT |
| 3D7 | TTATAAGT <b>TC</b> | AATTTCCCTCT   | GATATAGTTG  | AAGTGGTTAT | ATTCTTTATT |
|     | 1351               |               |             |            | 1400       |
| Dd2 | TATTTAAAAG         | ATAGATTAAA    | TAAGAAAGAA  | GAAATTAAT  | TTACATCAAT |
| 3D7 | TATTTAAAAG         | ATAGATTAAA    | TAAGAAAGAA  | GAAATTAAT  | TTACATCAAT |

## Anexos

|     |            |            |             |            |             |
|-----|------------|------------|-------------|------------|-------------|
|     | 1401       |            |             |            | 1450        |
| Dd2 | TATTATGCCC | TTATATGTAT | ATAAGATATT  | AATTTCGAAT | GTAGCAAATT  |
| 3D7 | TATTATGCCC | TTATATGTAT | ATAAGATATT  | AATTTCGAAT | GTAGCAAATT  |
|     | 1451       |            |             |            | 1500        |
| Dd2 | TTCCAAACTT | AGTTAATAAT | GTTATGGAAG  | GTATAGTAAA | TATTTAAACGT |
| 3D7 | TTCCAAACTT | AGTTAATAAT | GTTATGGAAG  | GTATAGTAAA | TATTTAAACGT |
|     | 1501       |            |             |            | 1550        |
| Dd2 | TTAAATAAAT | ATATTAATGA | TCATTTTATAT | TATAATGATA | TAAAAAATTA  |
| 3D7 | TTAAATAAAT | ATATTAATGA | TCATTTTATAT | TATAATGATA | TAAAAAATTA  |
|     | 1551       |            |             |            | 1600        |
| Dd2 | TTTTATGTAC | CGTACAAGAT | ATAATGAAGA  | TTATAATATT | GTAGTGGATA  |
| 3D7 | TTTTATGTAC | CGTACAAGAT | ATAATGAAGA  | TTATAATATT | GTAGTGGATA  |
|     | 1601       |            |             |            | 1650        |
| Dd2 | AGACATTTTT | ACAAAATGAA | AATATAACTT  | CTCATGATGA | TGGTACATCA  |
| 3D7 | AGACATTTTT | ACAAAATGAA | AATATAACTT  | CTCATGATGA | TGGTACATCA  |
|     | 1651       |            |             |            | 1700        |
| Dd2 | CATAATTTGA | AACATTTAAA | AAACGTAATA  | AAAAATAAAT | TAACAAATAT  |
| 3D7 | CATAATTTGA | AACATTTAAA | AAACGTAATA  | AAAAATAAAT | TAACAAATAT  |
|     | 1701       |            |             |            | 1750        |
| Dd2 | GTTTAAATAT | TTTTTCTTTT | ATCATAAGAT  | GAATTATCAT | AAGAATATAA  |
| 3D7 | GTTTAAATAT | TTTTTCTTTT | ATCATAAGAT  | GAATTATCAT | AAGAATATAA  |
|     | 1751       |            |             |            | 1800        |
| Dd2 | TAAATAAACA | AATATTATCT | GGTTTACTTA  | AGAACGTAGA | TGATAATACG  |
| 3D7 | TAAATAAACA | AATATTATCT | GGTTTACTTA  | AGAACGTAGA | TGATAATACG  |
|     | 1801       |            |             |            | 1850        |
| Dd2 | AATAAAAAAA | TATGTTTCCA | GGAACATAAA  | AGTAATTCTA | CATATAATTA  |
| 3D7 | AATAAAAAAA | TATGTTTCCA | GGAACATAAA  | AGTAATTCTA | CATATAATTA  |
|     | 1851       |            |             |            | 1900        |
| Dd2 | TAATAGTAGT | CATATACATG | AAAAAAAAGA  | AGAATATGAA | AATATTCACA  |
| 3D7 | TAATAGTAGT | CATATACATG | AAAAAAAAGA  | AGAATATGAA | AATATTCACA  |
|     | 1901       |            |             |            | 1950        |
| Dd2 | ATAGTAGTAA | TAGCACAATG | AGTAATGAAT  | TCAAAGAAAA | AAAAAAGAAT  |
| 3D7 | ATAGTAGTAA | TAGCACAATG | AGTAATGAAT  | TCAAAGAAAA | AAAAAAGAAT  |
|     | 1951       |            |             |            | 2000        |
| Dd2 | AATGAATACA | TTATAAAAT  | AGAAAATTGT  | AGTTTTGGTT | TATCATATGA  |
| 3D7 | AATGAATACA | TTATAAAAT  | AGAAAATTGT  | AGTTTTGGTT | TATCATATGA  |
|     | 2001       |            |             |            | 2050        |
| Dd2 | TAATAAATGT | GATAATGACC | ATATTTTAAA  | AAACATAAAT | TTTAATTTAA  |
| 3D7 | TAATAAATGT | GATAATGACC | ATATTTTAAA  | AAACATAAAT | TTTAATTTAA  |
|     | 2051       |            |             |            | 2100        |
| Dd2 | AAAGGAATTC | ATTAGCAATA | ATTATAGGAA  | ATGTTGGATC | AGGAAAAAGT  |
| 3D7 | AAAGGAATTC | ATTAGCAATA | ATTATAGGAA  | ATGTTGGATC | AGGAAAAAGT  |
|     | 2101       |            |             |            | 2150        |
| Dd2 | GCATTTTTCC | ATTCTATATT | AGGAGATTTT  | AATATGACAC | ATGGTAATTT  |
| 3D7 | GCATTTTTCC | ATTCTATATT | AGGAGATTTT  | AATATGACAC | ATGGTAATTT  |
|     | 2151       |            |             |            | 2200        |
| Dd2 | GTATATTGAA | AATTTTTTCA | AAAAAATGCC  | AATCTTATAT | GTTCCCTCAA  |
| 3D7 | GTATATTGAA | AATTTTTTCA | AAAAAATGCC  | AATCTTATAT | GTTCCCTCAA  |

## Anexos

|     |             |            |                     |            |            |
|-----|-------------|------------|---------------------|------------|------------|
|     | 2201        |            |                     |            | 2250       |
| Dd2 | ATAGTTGGTT  | ATTTATGGGA | AATATTAGAT          | CAATGATTTT | ATTTGGAAAT |
| 3D7 | ATAGTTGGTT  | ATTTATGGGA | AATATTAGAT          | CAATGATTTT | ATTTGGAAAT |
|     | 2251        |            |                     |            | 2300       |
| Dd2 | GAATATAATC  | CATTAATTTA | TAAATATACT          | ATATTACAAA | GTGAATTATT |
| 3D7 | GAATATAATC  | CATTAATTTA | TAAATATACT          | ATATTACAAA | GTGAATTATT |
|     | 2301        |            |                     |            | 2350       |
| Dd2 | GAATGATTTG  | AGTACCATAG | AACATGGAGA          | TATGAAATAT | ATTAATGATG |
| 3D7 | GAATGATTTG  | AGTACCATAG | AACATGGAGA          | TATGAAATAT | ATTAATGATG |
|     | 2351        |            |                     |            | 2400       |
| Dd2 | ATCATAATTT  | AAGTAAAGGA | CAAAAAGTAA          | GAATATGTTT | AGCTAGAGCA |
| 3D7 | ATCATAATTT  | AAGTAAAGGA | CAAAAAGTAA          | GAATATGTTT | AGCTAGAGCA |
|     | 2401        |            |                     |            | 2450       |
| Dd2 | TTATATGAGC  | ATTATATTCA | TATGCACAAA          | TTATGTACAG | ATTATGAAAA |
| 3D7 | TTATATGAGC  | ATTATATTCA | TATGCACAAA          | TTATGTACAG | ATTATGAAAA |
|     | 2451        |            |                     |            | 2500       |
| Dd2 | AAAGCTTATA  | CAACCTAATG | AAATATTAGA          | TAAGGATTTA | ATAAATAATA |
| 3D7 | AAAGCTTATA  | CAACCTAATG | AAATATTAGA          | TAAGGATTTA | ATAAATAATA |
|     | 2501        |            |                     |            | 2550       |
| Dd2 | AAAACATTTT  | TTCATATAAT | AATAAAAAAA          | GTAAATTAGT | TAACTATAAT |
| 3D7 | AAAACATTTT  | TTCATATAAT | AATAAAAAAA          | GTAAATTAGT | TAACTATAAT |
|     | 2551        |            |                     |            | 2600       |
| Dd2 | ATTCCATTCA  | ATGAAAATTA | CCTTCAAAAA          | TGTTTAATGG | ATGATAATAA |
| 3D7 | ATTCCATTCA  | ATGAAAATTA | CCTTCAAAAA          | TGTTTAATGG | ATGATAATAA |
|     | 2601        |            | <b>G2626A</b>       |            | 2650       |
| Dd2 | TTTTTATTTG  | TATTTACTTG | ATGAT <b>G</b> TATT | TACATCTTTA | GATCCTTCCA |
| 3D7 | TTTTTATTTG  | TATTTACTTG | ATGAT <b>A</b> TATT | TACATCTTTA | GATCCTTCCA |
|     | 2651        |            |                     |            | 2700       |
| Dd2 | TATCTAAAAA  | GATATTTTCT | AATTTATTTT          | GTAAAGAAGA | CAATATAAGT |
| 3D7 | TATCTAAAAA  | GATATTTTCT | AATTTATTTT          | GTAAAGAAGA | CAATATAAGT |
|     | 2701        |            |                     |            | 2750       |
| Dd2 | TTTAAAAGATA | ATTGTAGTTT | TATTATCTCA          | ATGAATAAAA | GTACGTTGGA |
| 3D7 | TTTAAAAGATA | ATTGTAGTTT | TATTATCTCA          | ATGAATAAAA | GTACGTTGGA |
|     | 2751        |            |                     |            | 2800       |
| Dd2 | TAATTTTCTT  | ATTGAAGATA | TTCTTGATAA          | TGTTCAATAT | GAAGTAAACA |
| 3D7 | TAATTTTCTT  | ATTGAAGATA | TTCTTGATAA          | TGTTCAATAT | GAAGTAAACA |
|     | 2801        |            |                     |            | 2850       |
| Dd2 | TTTTTGAAAT  | TCAGGATAAA | ACTTTAAAAA          | ATAGAGGAAA | TATATCAGAA |
| 3D7 | TTTTTGAAAT  | TCAGGATAAA | ACTTTAAAAA          | ATAGAGGAAA | TATATCAGAA |
|     | 2851        |            |                     |            | 2900       |
| Dd2 | TATATGGAAA  | AGAACAATTT | AAATATAACT          | AAAGAAAGTC | ACTGGGGTTA |
| 3D7 | TATATGGAAA  | AGAACAATTT | AAATATAACT          | AAAGAAAGTC | ACTGGGGTTA |
|     | 2901        |            |                     |            | 2950       |
| Dd2 | TTCAAACCTTA | AATACAATAG | ATTATACCAG          | AATAAAATTG | TTTGATGAAG |
| 3D7 | TTCAAACCTTA | AATACAATAG | ATTATACCAG          | AATAAAATTG | TTTGATGAAG |
|     | 2951        |            |                     |            | 3000       |
| Dd2 | TGGAACCTTAA | TCATGTTAAA | CATAGTAATA          | AAATGATATA | TAAGGAAGCT |
| 3D7 | TGGAACCTTAA | TCATGTTAAA | CATAGTAATA          | AAATGATATA | TAAGGAAGCT |

## Anexos

|     |             |            |             |            |             |
|-----|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
|     | 3001        |            |             |            | 3050        |
| Dd2 | TATTTTCGTAA | AAGGGAATAC | GGAGAGTGTT  | TCCTTTGAAA | TTGATAGTAT  |
| 3D7 | TATTTTCGTAA | AAGGGAATAC | GGAGAGTGTT  | TCCTTTGAAA | TTGATAGTAT  |
|     | 3051        |            |             |            | 3100        |
| Dd2 | AAATAAGGAG  | TATATTAAGA | AAATGAAAAA  | GAAAAATTAT | AAAAAGGAGC  |
| 3D7 | AAATAAGGAG  | TATATTAAGA | AAATGAAAAA  | GAAAAATTAT | AAAAAGGAGC  |
|     | 3101        |            |             |            | 3150        |
| Dd2 | ATATGAATAA  | AAATAATAAG | GACAACAATA  | ATAATAATAA | TAATAGTAAC  |
| 3D7 | ATATGAATAA  | AAATAATAAG | GACAACAATA  | ATAATAATAA | TAATAGTAAC  |
|     | 3151        |            |             |            | 3200        |
| Dd2 | AAGGACGACC  | ATATTAATAT | TAATATGAAT  | GATAACCATA | GAAACTATAA  |
| 3D7 | AAGGACGACC  | ATATTAATAT | TAATATGAAT  | GATAACCATA | GAAACTATAA  |
|     | 3201        |            |             |            | 3250        |
| Dd2 | TGACATTAAT  | TTGGGGCCTA | ATTCTACAGA  | TGATAGTCCA | ACTGTTTCTT  |
| 3D7 | TGACATTAAT  | TTGGGGCCTA | ATTCTACAGA  | TGATAGTCCA | ACTGTTTCTT  |
|     | 3251        |            |             |            | 3300        |
| Dd2 | CGTTAGGAAA  | TGAATATACG | CTTGATACCT  | ATACTAGTAA | TAATTCCTGAT |
| 3D7 | CGTTAGGAAA  | TGAATATACG | CTTGATACCT  | ATACTAGTAA | TAATTCCTGAT |
|     | 3301        |            |             |            | 3350        |
| Dd2 | AAGGAAGAAA  | TTGTAAAACC | TTTATATAAA  | GATACACATG | AAGAATTCAA  |
| 3D7 | AAGGAAGAAA  | TTGTAAAACC | TTTATATAAA  | GATACACATG | AAGAATTCAA  |
|     | 3351        |            |             |            | 3400        |
| Dd2 | TAAAAGTTCA  | TCAATGCCTT | TTGTCAAAAAG | TTCAAGTAAT | ATGATAAATA  |
| 3D7 | TAAAAGTTCA  | TCAATGCCTT | TTGTCAAAAAG | TTCAAGTAAT | ATGATAAATA  |
|     | 3401        |            |             |            | 3450        |
| Dd2 | ATCCAAGTAA  | TTTTAAATAT | GAAGATAACT  | CATCCAGTTT | TAAGGGTTCC  |
| 3D7 | ATCCAAGTAA  | TTTTAAATAT | GAAGATAACT  | CATCCAGTTT | TAAGGGTTCC  |
|     | 3451        |            |             |            | 3500        |
| Dd2 | ATAAGTTTAG  | AAACGTATTT | ATGGTATTTT  | CAACAGGTTG | GATTTGTTTT  |
| 3D7 | ATAAGTTTAG  | AAACGTATTT | ATGGTATTTT  | CAACAGGTTG | GATTTGTTTT  |
|     | 3501        |            |             |            | 3550        |
| Dd2 | ATTAAC TTCA | GTAGTAATAT | TTATGC TTAT | ATCTATTTTT | ACAGATGAAA  |
| 3D7 | ATTAAC TTCA | GTAGTAATAT | TTATGC TTAT | ATCTATTTTT | ACAGATGAAA  |
|     | 3551        |            |             |            | 3600        |
| Dd2 | TAAAGTTTGT  | CTTTTTAACT | ATGATGAGTA  | TTATTTCTAA | AAATAATAAA  |
| 3D7 | TAAAGTTTGT  | CTTTTTAACT | ATGATGAGTA  | TTATTTCTAA | AAATAATAAA  |
|     | 3601        |            |             |            | 3650        |
| Dd2 | GAACATTCAG  | ACACAATATT | ACAAAAGCAA  | GTAAGATATT | TGGAATATTT  |
| 3D7 | GAACATTCAG  | ACACAATATT | ACAAAAGCAA  | GTAAGATATT | TGGAATATTT  |
|     | 3651        |            |             |            | 3700        |
| Dd2 | TGTAATATTA  | CCAATAATAT | CATTAGTAAC  | ATCAGGTATA | TGTTTTTCTA  |
| 3D7 | TGTAATATTA  | CCAATAATAT | CATTAGTAAC  | ATCAGGTATA | TGTTTTTCTA  |
|     | 3701        |            |             |            | 3750        |
| Dd2 | TGATCATATA  | TGGAAATATT | ACATCAGCAA  | TAAAAGTACA | TAATAATATA  |
| 3D7 | TGATCATATA  | TGGAAATATT | ACATCAGCAA  | TAAAAGTACA | TAATAATATA  |
|     | 3751        |            |             |            | 3800        |
| Dd2 | TTATATAGCA  | TATTAAATGC | ACCATTGTAT  | ATATTTTATA | ATAATAATTT  |
| 3D7 | TTATATAGCA  | TATTAAATGC | ACCATTGTAT  | ATATTTTATA | ATAATAATTT  |

## Anexos

|     |             |                     |            |            |            |
|-----|-------------|---------------------|------------|------------|------------|
|     | 3801        |                     |            |            | 3850       |
| Dd2 | AGGGAATATA  | ATAAATCGAT          | TTATTATTGA | TATATCTGCT | TTTGATTATG |
| 3D7 | AGGGAATATA  | ATAAATCGAT          | TTATTATTGA | TATATCTGCT | TTTGATTATG |
|     | 3851        |                     |            |            | 3900       |
| Dd2 | GATTTTTAAA  | GAGAATATAT          | AAAGCCTTTT | TCATTTTTTT | TCGTTGTATC |
| 3D7 | GATTTTTAAA  | GAGAATATAT          | AAAGCCTTTT | TCATTTTTTT | TCGTTGTATC |
|     | 3901        |                     |            |            | 3950       |
| Dd2 | TTATCATCCT  | TATTAATTAT          | ATATATGATA | AGAGATTGTA | TTTTTATTTT |
| 3D7 | TTATCATCCT  | TATTAATTAT          | ATATATGATA | AGAGATTGTA | TTTTTATTTT |
|     | 3951        |                     |            |            | 4000       |
| Dd2 | CCCTTTTGTA  | ATTATATTAA          | TATATTTTTT | TGTTTTCAAA | AGATTTTCGA |
| 3D7 | CCCTTTTGTA  | ATTATATTAA          | TATATTTTTT | TGTTTTCAAA | AGATTTTCGA |
|     | 4001        |                     |            |            | 4050       |
| Dd2 | GAGGTTGTAA  | AGAAGCACAA          | AGGCTGTATT | TATCATGTCA | TACTCCTTTA |
| 3D7 | GAGGTTGTAA  | AGAAGCACAA          | AGGCTGTATT | TATCATGTCA | TACTCCTTTA |
|     | 4051        |                     |            |            | 4100       |
| Dd2 | TGTAACATCT  | ATAGTAATGC          | ATTGTCTGGA | AAAAACATTA | TTAATATATA |
| 3D7 | TGTAACATCT  | ATAGTAATGC          | ATTGTCTGGA | AAAAACATTA | TTAATATATA |
|     | 4101        |                     |            |            | 4150       |
| Dd2 | TAAAAAAAAAT | ACATATCATT          | TGGATGTATA | TGAGCATTAT | ATAAACAAAT |
| 3D7 | TAAAAAAAAAT | ACATATCATT          | TGGATGTATA | TGAGCATTAT | ATAAACAAAT |
|     | 4151        | <b>A4167T</b>       |            |            | 4200       |
| Dd2 | TTCGAATTAG  | TTATTTT <b>A</b> TT | AAATGGCTTA | TAAATATTTG | GGCATCTCTT |
| 3D7 | TTCGAATTAG  | TTATTTT <b>T</b> TT | AAATGGCTTA | TAAATATTTG | GGCATCTCTT |
|     | 4201        |                     |            |            | 4250       |
| Dd2 | TATATTAAGA  | TTTTTATATT          | GTTATTAACT | ACTTACATTA | TTATGCATCC |
| 3D7 | TATATTAAGA  | TTTTTATATT          | GTTATTAACT | ACTTACATTA | TTATGCATCC |
|     | 4251        |                     |            |            | 4300       |
| Dd2 | TCATTTATAT  | GCAAGTGGAA          | TAATCAAATT | ATATAAAGAA | AAAAATTATG |
| 3D7 | TCATTTATAT  | GCAAGTGGAA          | TAATCAAATT | ATATAAAGAA | AAAAATTATG |
|     | 4301        |                     |            |            | 4350       |
| Dd2 | TTCGAATTTT  | GAGTACCCTT          | GGATACTGTA | TATCGTTTTT | TGCTAGACTA |
| 3D7 | TTCGAATTTT  | GAGTACCCTT          | GGATACTGTA | TATCGTTTTT | TGCTAGACTA |
|     | 4351        |                     |            |            | 4400       |
| Dd2 | GGTGTATTA   | TAAAAATTCT          | TTTATGTGAT | TATACTCACA | TAGAAAAAGA |
| 3D7 | GGTGTATTA   | TAAAAATTCT          | TTTATGTGAT | TATACTCACA | TAGAAAAAGA |
|     | 4401        |                     |            |            | 4450       |
| Dd2 | AATGTGCTGT  | GTTCAAAGAT          | TAGAAGAATT | TGCTAAAATT | TCTAATAAAG |
| 3D7 | AATGTGCTGT  | GTTCAAAGAT          | TAGAAGAATT | TGCTAAAATT | TCTAATAAAG |
|     | 4451        |                     |            |            | 4500       |
| Dd2 | AAAAATGCTTC | TATGAATAAG          | GAAAATGAAT | TAAATGTAAT | AACAACACAA |
| 3D7 | AAAAATGCTTC | TATGAATAAG          | GAAAATGAAT | TAAATGTAAT | AACAACACAA |
|     | 4501        |                     |            |            | 4550       |
| Dd2 | ACATATAAGG  | AAAAAAATGA          | AAATATCTCG | GATAAGATAT | CTGCAATTGT |
| 3D7 | ACATATAAGG  | AAAAAAATGA          | AAATATCTCG | GATAAGATAT | CTGCAATTGT |
|     | 4551        |                     |            |            | 4600       |
| Dd2 | CGAATATAAAA | AATGTATCGT          | TATCTTCAAT | TATAAATAGT | TCTCAGGATG |
| 3D7 | CGAATATAAAA | AATGTATCGT          | TATCTTCAAT | TATAAATAGT | TCTCAGGATG |

## Anexos

|     |                     |            |            |            |            |
|-----|---------------------|------------|------------|------------|------------|
|     | 4601                |            |            |            | 4650       |
| Dd2 | ATGAATCAAA          | AAAAAAGTAT | GGTATTAAAT | TTGAGAATGT | ATATGTAAGT |
| 3D7 | ATGAATCAAA          | AAAAAAGTAT | GGTATTAAAT | TTGAGAATGT | ATATGTAAGT |
|     | 4651                |            |            |            | 4700       |
| Dd2 | TATAAAAAAA          | AAATTCCTTT | AGTTAATGGT | ACATATAAAT | ACATAGATGA |
| 3D7 | TATAAAAAAA          | AAATTCCTTT | AGTTAATGGT | ACATATAAAT | ACATAGATGA |
|     | 4701                |            |            |            | 4750       |
| Dd2 | AGAACCATCA          | TTAAAAAATA | TTAATATGTA | TGCTTTAAAA | AATCAAAAAA |
| 3D7 | AGAACCATCA          | TTAAAAAATA | TTAATATGTA | TGCTTTAAAA | AATCAAAAAA |
|     | 4751                |            |            |            | 4800       |
| Dd2 | TTGGGATAGT          | AGGAAAATCA | GGCGCAGGAA | AAAGTACTAT | ACTTTTATCT |
| 3D7 | TTGGGATAGT          | AGGAAAATCA | GGCGCAGGAA | AAAGTACTAT | ACTTTTATCT |
|     | 4801                |            |            |            | 4850       |
| Dd2 | ATCTTAGGAT          | TAATTAATAT | TTCACAAGGA | AAAATAACAG | TAGAAGGAAG |
| 3D7 | ATCTTAGGAT          | TAATTAATAT | TTCACAAGGA | AAAATAACAG | TAGAAGGAAG |
|     | 4851                |            |            |            | 4900       |
| Dd2 | AGACATTCGA          | ACATATAATA | GAAAAGGAGA | AGATAGTATT | ATTGGTATTT |
| 3D7 | AGACATTCGA          | ACATATAATA | GAAAAGGAGA | AGATAGTATT | ATTGGTATTT |
|     | <b>C4167T</b>       |            |            |            |            |
|     | 4901                |            |            |            | 4950       |
| Dd2 | TAGC <b>C</b> CAATC | TTCTTTTGTT | TTTTATAAAT | GGAATATAAG | AACTTTTATT |
| 3D7 | TAGC <b>T</b> CAATC | TTCTTTTGTT | TTTTATAAAT | GGAATATAAG | AACTTTTATT |
|     | 4951                |            |            |            | 5000       |
| Dd2 | GATCCATATA          | ATAATTTCAC | AGATGATGAA | ATTGTTCATG | CTCTAAAATT |
| 3D7 | GATCCATATA          | ATAATTTCAC | AGATGATGAA | ATTGTTCATG | CTCTAAAATT |
|     | 5001                |            |            |            | 5050       |
| Dd2 | GAATGGTATA          | AATTTAGGTA | AAAACGATTT | ATATAAATAT | ATGCATAAAC |
| 3D7 | GAATGGTATA          | AATTTAGGTA | AAAACGATTT | ATATAAATAT | ATGCATAAAC |
|     | 5051                |            |            |            | 5100       |
| Dd2 | AAGATATGAA          | ATCAAATTAT | AAAAAAATAA | TACAAACATC | AAAAGTAATA |
| 3D7 | AAGATATGAA          | ATCAAATTAT | AAAAAAATAA | TACAAACATC | AAAAGTAATA |
|     | 5101                |            |            |            | 5150       |
| Dd2 | AACCAATCAA          | ATGATAATAC | TATTCTATTA | ACAAATGATT | GTATAAGATA |
| 3D7 | AACCAATCAA          | ATGATAATAC | TATTCTATTA | ACAAATGATT | GTATAAGATA |
|     | 5151                |            |            |            | 5200       |
| Dd2 | TCTATCTTTA          | GTTAGACTTT | ATTTAAATCG | ACATAAATAT | AAAATCATAT |
| 3D7 | TCTATCTTTA          | GTTAGACTTT | ATTTAAATCG | ACATAAATAT | AAAATCATAT |
|     | 5201                |            |            |            | 5250       |
| Dd2 | TAATAGATGA          | AATTCCTATT | TTTAATTTAA | ACAATTCTGT | TCATGACGAA |
| 3D7 | TAATAGATGA          | AATTCCTATT | TTTAATTTAA | ACAATTCTGT | TCATGACGAA |
|     | 5251                |            |            |            | 5300       |
| Dd2 | TTAAATAGTT          | TTTTAATTGG | TAAAGCAAAG | TCATTTAATT | ATATAATAAG |
| 3D7 | TTAAATAGTT          | TTTTAATTGG | TAAAGCAAAG | TCATTTAATT | ATATAATAAG |
|     | 5301                |            |            |            | 5350       |
| Dd2 | AAATCATTTT          | CCAAATAATA | CAGTCCTAAT | TATTTACAT  | CATGCAAATA |
| 3D7 | AAATCATTTT          | CCAAATAATA | CAGTCCTAAT | TATTTACAT  | CATGCAAATA |
|     | 5351                |            |            |            | 5400       |
| Dd2 | CTTTGTCTTG          | TTGTGACTAT | ATTTATGTAT | TAAGAAAGGG | AGAAATAACT |
| 3D7 | CTTTGTCTTG          | TTGTGACTAT | ATTTATGTAT | TAAGAAAGGG | AGAAATAACT |

## Anexos

5401 5450  
 Dd2 TATCGTTGTA GTTACGAAGA TGTA AAAACG CAATCTGAAT TATCACATTT  
 3D7 TATCGTTGTA GTTACGAAGA TGTA AAAACG CAATCTGAAT TATCACATTT

5451 5469  
 Dd2 GTTAGAAATG GACGACTAA  
 3D7 GTTAGAAATG GACGACTAA

### Sequencia da proteína resultante da tradução do gene *pfmrp1*.

1 50  
 3D7 MTTYKENVGI SNKGNKKKKS CQNISFLNFL SFDWIRPLIN DLIKGDIQEL  
 Dd2 MTTYKENVGI SNKGNKKKKS CQNISFLNFL SFDWIRPLIN DLIKGDIQEL

51 100  
 3D7 PNICRNFVDP YYASKLEENL RDIEVEDSEF YSEKNSSNEH VLHHCNSNDA  
 Dd2 PNICRNFVDP YYASKLEENL RDIEVEDSEF YSEKNSSNEH VLHHCNSNDA

101 150  
 3D7 SEKKVYNVYY HNILWSILKT FKFRILLIIS FYILETLIVT LGGKFIDYYM  
 Dd2 SEKKVYNVYY HNILWSILKT FKFRILLIIS FYILETLIVT LGGKFIDYYM

151 200  
 3D7 RILEGQKIPV YISFLKDFKV FSGLVVMIM FFHLFFEALL **H191Y** HFYFHLFTIN  
 Dd2 RILEGQKIPV YISFLKDFKV FSGLVVMIM FFHLFFEALL **Y**FYFHLFTIN

201 250  
 3D7 LKVSLMYFLY KINLCSNNNH LQNPDAFYNT YRKFSSQTEI DEISRDFLSI  
 Dd2 LKVSLMYFLY KINLCSNNNH LQNPDAFYNT YRKFSSQTEI DEISRDFLSI

251 300  
 3D7 GKNASSSSSG IKNNNKNIDN NKFVENDYII NFIKSTKKME KDSL NENRSL  
 Dd2 GKNASSSSSG IKNNNKNIDN NKFVENDYII NFIKSTKKME KDSL NENRSL

301 350  
 3D7 PNVNIYNIMF SDVPSVTFFV TSCINLNFVF VKIFMSFYVF HIKIGSNSVG  
 Dd2 PNVNIYNIMF SDVPSVTFFV TSCINLNFVF VKIFMSFYVF HIKIGSNSVG

351 400  
 3D7 IAIWLSIALY SAMILFEFLP SLFKSKYLIY RDKRIDNMHH VLKEFKLIK M  
 Dd2 IAIWLSIALY SAMILFEFLP SLFKSKYLIY RDKRIDNMHH VLKEFKLIK M

401 450  
 3D7 FNWESFAFKY INIFRMKEMK YCKIRLYLSN IGVFIS**S**ISS DIVEVVIFFI  
 Dd2 FNWESFAFKY INIFRMKEMK YCKIRLYLSN IGVFIS**A**ISS DIVEVVIFFI

451 500  
 3D7 YLKDRLNKKE EIKFTSIIMP LYVYKILISN VANFPNLVNN VMEGIVNIKR  
 Dd2 YLKDRLNKKE EIKFTSIIMP LYVYKILISN VANFPNLVNN VMEGIVNIKR

501 550  
 3D7 LNNYINDHLY YNDIKNYFMY RTRYNEDYNI VVDKTFLQNE NITSHDDGTS  
 Dd2 LNNYINDHLY YNDIKNYFMY RTRYNEDYNI VVDKTFLQNE NITSHDDGTS

551 600  
 3D7 HNLKHLKNVI KNKLTNMFY FFFYHKMNYH KNIINKQILS GLLKNVDDNT  
 Dd2 HNLKHLKNVI KNKLTNMFY FFFYHKMNYH KNIINKQILS GLLKNVDDNT

601 650  
 3D7 NKKICFQEHK SNSTYNYNSS HIHEKKEEYE NIHNSSNSTM SNEFKKKN  
 Dd2 NKKICFQEHK SNSTYNYNSS HIHEKKEEYE NIHNSSNSTM SNEFKKKN



## Anexos

|     |            |            |             |             |            |            |
|-----|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|
|     | 651        |            |             |             |            | 700        |
| 3D7 | NEYIIKLENC | SFGLSYDNKC | DNDH        | ILKNIN      | FNLKRNSLAI | II         |
| Dd2 | NEYIIKLENC | SFGLSYDNKC | DNDH        | ILKNIN      | FNLKRNSLAI | II         |
|     |            |            |             |             |            | 750        |
| 3D7 | AFFHSILGDF | NMTHGNLYIE | NFFKKMPILY  | VP          | QNSWLFMG   | NIRSMILFGN |
| Dd2 | AFFHSILGDF | NMTHGNLYIE | NFFKKMPILY  | VP          | QNSWLFMG   | NIRSMILFGN |
|     |            |            |             |             |            | 800        |
| 3D7 | EYNPLIYKYT | ILQSELLNDL | STIEHGDMKY  | INDDHN      | LSKG       | QKVRICLARA |
| Dd2 | EYNPLIYKYT | ILQSELLNDL | STIEHGDMKY  | INDDHN      | LSKG       | QKVRICLARA |
|     |            |            |             |             |            | 850        |
| 3D7 | LYEHYIHMHK | LCTDYEKKLI | QPNEILDKDL  | INNKNISSYN  | NKKS       | SKLVNYN    |
| Dd2 | LYEHYIHMHK | LCTDYEKKLI | QPNEILDKDL  | INNKNISSYN  | NKKS       | SKLVNYN    |
|     |            |            |             |             |            | 900        |
| 3D7 | IPFNENYLQK | CLMDDNNFYL | YLLD        | DI          | FTSL       | DPSISKKIFS |
| Dd2 | IPFNENYLQK | CLMDDNNFYL | YLLD        | DV          | FTSL       | DPSISKKIFS |
|     |            |            |             |             |            | 950        |
| 3D7 | FKDNCSFIIS | MNKSTLDNFL | IEDILDNVQY  | EVNIFEIQDK  | TLKYRGNISE |            |
| Dd2 | FKDNCSFIIS | MNKSTLDNFL | IEDILDNVQY  | EVNIFEIQDK  | TLKYRGNISE |            |
|     |            |            |             |             |            | 1000       |
| 3D7 | YMEKNNLNIT | KESHWGYSNL | NTIDYTRIKL  | FDEVELN     | HVK        | HSNKMIYKEA |
| Dd2 | YMEKNNLNIT | KESHWGYSNL | NTIDYTRIKL  | FDEVELN     | HVK        | HSNKMIYKEA |
|     |            |            |             |             |            | 1050       |
| 3D7 | YFVKGNTESV | SFEIDSINKE | YIKKMKKKNY  | KKEHMKNKNNK | DNNNNNNNSN |            |
| Dd2 | YFVKGNTESV | SFEIDSINKE | YIKKMKKKNY  | KKEHMKNKNNK | DNNNNNNNSN |            |
|     |            |            |             |             |            | 1100       |
| 3D7 | KDDHININMN | DNHRNYNDIN | LGPNSTDDSP  | TVSSLGNEYT  | LDTYTSNNSD |            |
| Dd2 | KDDHININMN | DNHRNYNDIN | LGPNSTDDSP  | TVSSLGNEYT  | LDTYTSNNSD |            |
|     |            |            |             |             |            | 1150       |
| 3D7 | KEEIVKPLYK | DTHEEFNKSS | SMPFVKSSSN  | MINNPSNFKY  | EDNSSFKGS  |            |
| Dd2 | KEEIVKPLYK | DTHEEFNKSS | SMPFVKSSSN  | MINNPSNFKY  | EDNSSFKGS  |            |
|     |            |            |             |             |            | 1200       |
| 3D7 | ISLETYLWYF | QQVGFVLLTS | VVIFMLISIF  | TDEIKFVFLT  | MMSIISKNNK |            |
| Dd2 | ISLETYLWYF | QQVGFVLLTS | VVIFMLISIF  | TDEIKFVFLT  | MMSIISKNNK |            |
|     |            |            |             |             |            | 1250       |
| 3D7 | EHSDTILQKQ | VRYLEYFVIL | PIISLVTSGI  | CFSMIIYGNI  | TSAIKVHNNI |            |
| Dd2 | EHSDTILQKQ | VRYLEYFVIL | PIISLVTSGI  | CFSMIIYGNI  | TSAIKVHNNI |            |
|     |            |            |             |             |            | 1300       |
| 3D7 | LYSILNAPLY | IFYNNNLGNI | INRFIIDISA  | FDYGFLKRIY  | KAFFIFFRCI |            |
| Dd2 | LYSILNAPLY | IFYNNNLGNI | INRFIIDISA  | FDYGFLKRIY  | KAFFIFFRCI |            |
|     |            |            |             |             |            | 1350       |
| 3D7 | LSSLLIIYMI | RDCIFIFPFV | IILIIYFFVFK | RFSRGCKEAO  | RLYLSCHTPL |            |
| Dd2 | LSSLLIIYMI | RDCIFIFPFV | IILIIYFFVFK | RFSRGCKEAO  | RLYLSCHTPL |            |
|     |            |            |             |             |            | 1400       |
| 3D7 | CNIYSNALSG | KNIINIYKKN | TYHLDVYEHY  | INNFRISYF   | KWLINIWASL |            |
| Dd2 | CNIYSNALSG | KNIINIYKKN | TYHLDVYEHY  | INNFRISYF   | KWLINIWASL |            |
|     |            |            |             |             |            | 1450       |
| 3D7 | YIKIFILLLT | TYIIMHPHLY | ASGIIKLYKE  | KNYVRILSTL  | GYCISFSARL |            |
| Dd2 | YIKIFILLLT | TYIIMHPHLY | ASGIIKLYKE  | KNYVRILSTL  | GYCISFSARL |            |

## Anexos

|     |  |      |
|-----|--|------|
|     | 1451   | 1500 |
| 3D7 | GVI IKFLLCD YTHIEKEMCC VQRLEE FAKI SNKENASMNK ENELNVITTO |      |
| Dd2 | GVI IKFLLCD YTHIEKEMCC VQRLEE FAKI SNKENASMNK ENELNVITTO |      |
|     | 1501   | 1550 |
| 3D7 | TYKEKNENIS DKISAIVEYK NVSLSSIINS SQDDESKKKY GIKFENVYVS   |      |
| Dd2 | TYKEKNENIS DKISAIVEYK NVSLSSIINS SQDDESKKKY GIKFENVYVS   |      |
|     | 1551   | 1600 |
| 3D7 | YKKKIPLVNG TYKYIDEEPS LKNINMYALK NQKIGIVGKS GAGKSTILLS   |      |
| Dd2 | YKKKIPLVNG TYKYIDEEPS LKNINMYALK NQKIGIVGKS GAGKSTILLS   |      |
|     | 1601   | 1650 |
| 3D7 | ILGLINISQG KITVEGRDIR TYNRKGEDSI IGILAQSSFV FYNWNIRTFI   |      |
| Dd2 | ILGLINISQG KITVEGRDIR TYNRKGEDSI IGILAQSSFV FYNWNIRTFI   |      |
|     | 1651   | 1700 |
| 3D7 | DPYNNFTDDE IVHALKLNIGI NLGKNDLYKY MHKQDMKSNY KKIIQTSKVI  |      |
| Dd2 | DPYNNFTDDE IVHALKLNIGI NLGKNDLYKY MHKQDMKSNY KKIIQTSKVI  |      |
|     | 1701   | 1750 |
| 3D7 | NQSNDNTILL TNDCIRYLSL VRLYLNRHKY KIILIDEIPI FNLNNSVHDE   |      |
| Dd2 | NQSNDNTILL TNDCIRYLSL VRLYLNRHKY KIILIDEIPI FNLNNSVHDE   |      |
|     | 1751   | 1800 |
| 3D7 | LNSFLIGKAK SFNYIIRNHF PNNTVLIISH HANTLSCCDY IYVLRKGEIT   |      |
| Dd2 | LNSFLIGKAK SFNYIIRNHF PNNTVLIISH HANTLSCCDY IYVLRKGEIT   |      |
|     | 1801   | 1822 |
| 3D7 | YRCSYEDVKT QSELSHLEMM DD                                 |      |
| Dd2 | YRCSYEDVKT QSELSHLEMM DD                                 |      |

## Anexos

### ANEXO 9

**Alinhamento das sequências de nucleótidos e de a.a. de PfMRP2, resultantes sequenciação e tradução da totalidade dos fragmentos do gene *pfmrp1* dos clones Dd2 e 3D7.** Diferenças pontuais e inserções/deleções identificadas entre os clones (**vermelho**), nucleótidos e a.a. assinalados, correspondem à sequência de 3D7; Sequências características de proteínas ABC (**azul**); Hélices transmembranares previstas pelo SOSUI (**cinzento**); Sequência dos fragmentos a clonar para produção de proteínas recombinantes (**verde**).

|     |            |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   |     |
|-----|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------------|-------------------|-----|
|     | 1          |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 100 |
| 3D7 | ATGATGAGAC | GGAGAAGCGT | TTACAATTC  | GATCAAGGAA | AACATGGCTA  | TTTAATGAAT | CATATATCTT | GGCTTAATTT | TGTGAGTTTC        | AATTGGATTA        |     |
| Dd2 | ATGATGAGAC | GGAGAAGCGT | TTACAATTC  | GATCAAGGAA | AACATGGCTA  | TTTAATGAAT | CATATATCTT | GGCTTAATTT | TGTGAGTTTC        | AATTGGATTA        |     |
|     | 101        |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 200 |
| 3D7 | CACAACTTTT | AAGATGTCTT | AAGAATGATG | ATTTTGTATT | ACCTTGTATA  | GAAGAAACAA | GTTCCATAGA | ACATTATAGC | ACGAACCTAA        | ATAGGAATGT        |     |
| Dd2 | CACAACTTTT | AAGATGTCTT | AAGAATGATG | ATTTTGTATT | ACCTTGTATA  | GAAGAAACAA | GTTCCATAGA | ACATTATAGC | ACGAACCTAA        | ATAGGAATGT        |     |
|     | 201        |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 300 |
| 3D7 | TCGAAATATT | CAATTAAGAA | AATATAATAA | ATATAATAAA | TATAAGAATT  | ATTGTTGTAG | TAAATATAAT | GATGGTAATA | AAAGTTGTAG        | TTGCTCTACA        |     |
| Dd2 | TCGAAATATT | CAATTAAGAA | AATATAATAA | ATATAATAAA | TATAAGAATT  | ATTGTTGTAG | TAAATATAAT | GATGGTAATA | AAAGTTGTAG        | TTGCTCTACA        |     |
|     | 301        |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 400 |
| 3D7 | AAGAATCATA | CAAATAAAT  | TCATAAAAGA | AAAAAGGAAG | ATCATTTTTT  | AAAAAGTAGT | GGTATTACAT | ATGCAGTTTT | GAAAACATTT        | AAATATTATT        |     |
| Dd2 | AAGAATCATA | CAAATAAAT  | TCATAAAAGA | AAAAAGGAAG | ATCATTTTTT  | AAAAAGTAGT | GGTATTACAT | ATGCAGTTTT | GAAAACATTT        | AAATATTATT        |     |
|     | 401        |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 500 |
| 3D7 | TAAGTTTAAT | TAGTTTCTTT | CATATTATAC | ATACCATATT | TCTAATATTT  | GTTGCTGTGT | GTATTGAGAA | ATATGTCTTG | TTAATCAAAG        | GCGGTTCAAA        |     |
| Dd2 | TAAGTTTAAT | TAGTTTCTTT | CATATTATAC | ATACCATATT | TCTAATATTT  | GTTGCTGTGT | GTATTGAGAA | ATATGTCTTG | TTAATCAAAG        | GCGGTTCAAA        |     |
|     | 501        |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 600 |
| 3D7 | TGTTGTAACT | CTACCATTTG | GATTCAAAAA | TTCTAAAGTG | TTGTTCCGGAT | TTATAGTCAT | TTCAGTAATA | TTCATTAGTC | AGTTTTTTGA        | TGCCCTCCTT        |     |
| Dd2 | TGTTGTAACT | CTACCATTTG | GATTCAAAAA | TTCTAAAGTG | TTGTTCCGGAT | TTATAGTCAT | TTCAGTAATA | TTCATTAGTC | AGTTTTTTGA        | TGCCCTCCTT        |     |
|     | 601        |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 700 |
| 3D7 | TGCTATTATG | ATTTTAGATT | AAGAGTAAAT | ATGGAGGTCA | CCGTTATGTA  | TTTTTTATAC | AAAATAACGT | TAGGCAATTT | CAACAATCAG        | TTGATTAATA        |     |
| Dd2 | TGCTATTATG | ATTTTAGATT | AAGAGTAAAT | ATGGAGGTCA | CCGTTATGTA  | TTTTTTATAC | AAAATAACGT | TAGGCAATTT | CAACAATCAG        | TTGATTAATA        |     |
|     | 701        |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 800 |
| 3D7 | GAAACGATAT | ATATGATGAC | CATAGTGAAG | AGGGAAAGGG | CCAACATAAA  | AATCAATGTC | AATATGATGA | AAATGATCA- | -----             | -----GAA          |     |
| Dd2 | GAAACGATAT | ATATGATGAC | CATAGTGAAG | AGGGAAAGGG | CCAACATAAA  | AATCAATGTC | AATATGATGA | AAATGATCAA | <b>AATGATGAAA</b> | <b>ATGATCAGAA</b> |     |
|     | 801        |            |            |            |             |            |            |            |                   |                   | 900 |
| 3D7 | TGATCAGAAT | GAGCAAAGCG | ATTTACGTGA | TATACGACAT | ATGCATGATA  | AACATGTCAA | ACATAATGAT | GAAGAAAGCA | AAGATTCAAC        | CAACAGTACG        |     |
| Dd2 | TGATCAGAAT | GAGCAAAGCG | ATTTACGTGA | TATACGACAT | ATGCATGATA  | AACATGTCAA | ACATAATGAT | GAAGAAAGCA | AAGATTCAAC        | CAACAGTACG        |     |

## Anexos

|     |            |               |            |            |            |               |             |            |            |            |      |
|-----|------------|---------------|------------|------------|------------|---------------|-------------|------------|------------|------------|------|
|     | 901        |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1000 |
| 3D7 | ACATATATCA | AAAATAATAA    | CAATCAAATG | AGCCACATAA | ACGATTTGTC | AATTACAAAT    | AATATGTCCG  | ATGTACATAT | TTTATCGAGC | ATAAAAAACC |      |
| Dd2 | ACATATATCA | AAAATAATAA    | CAATCAAATG | AGCCACATAA | ACGATTTGTC | AATTACAAAT    | AATATGTCCG  | ATGTACATAT | TTTATCGAGC | ATAAAAAACC |      |
|     | 1001       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1100 |
| 3D7 | AAGATCAGAA | TAACAGTAAT    | AATGTTTCGA | GCATGGATAG | CAACACCAAT | TACATGAGCA    | AAACGACATG  | TTTAACGTGT | ACAGGCTCCG | AATTTAATAA |      |
| Dd2 | AAGATCAGAA | TAACAGTAAT    | AATGTTTCGA | GCATGGATAG | CAACACCAAT | TACATGAGCA    | AAACGACATG  | TTTAACGTGT | ACAGGCTCCG | AATTTAATAA |      |
|     | 1101       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1200 |
| 3D7 | AGAAGAAAAA | GATGAGAAAA    | AAGAACTTTT | AGAAGAAGCG | AAAAAGAAAG | ATAAAGAAGT    | ATTCGATATT  | AGTATATATA | ATATAATGTT | TATAGATACA |      |
| Dd2 | AGAAGAAAAA | GATGAGAAAA    | AAGAACTTTT | AGAAGAAGCG | AAAAAGAAAG | ATAAAGAAGT    | ATTCGATATT  | AGTATATATA | ATATAATGTT | TATAGATACA |      |
|     | 1201       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1300 |
| 3D7 | CCATTTTTAA | TTTATTTTAT    | AACAGCATTA | ATAGAATTAG | CAAATATGAT | AATAAAATTT    | ATAATGTCAT  | TTTATATGTT | TTATTATAAA | ATGGGTAGTG |      |
| Dd2 | CCATTTTTAA | TTTATTTTAT    | AACAGCATTA | ATAGAATTAG | CAAATATGAT | AATAAAATTT    | ATAATGTCAT  | TTTATATGTT | TTATTATAAA | ATGGGTAGTG |      |
|     | 1301       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1400 |
| 3D7 | CAGCTGTATT | AAACGGTGCT    | TTGTTAATTA | TAATAATGTA | TGGATTAATG | TTTGCTTTTG    | AATTTTCATC  | CAGTTTATTT | AAATTGAAAT | ATTTAAAATA |      |
| Dd2 | CAGCTGTATT | AAACGGTGCT    | TTGTTAATTA | TAATAATGTA | TGGATTAATG | TTTGCTTTTG    | AATTTTCATC  | CAGTTTATTT | AAATTGAAAT | ATTTAAAATA |      |
|     | 1401       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1500 |
| 3D7 | TCGTGATACA | AGAATAAGTA    | ATATGCATCA | TATATTAAAA | GAATTCAAAT | TAATGAAAAA    | ATTTAATTGG  | GAATCTATAG | CTTTTGATTA | TGTAATATG  |      |
| Dd2 | TCGTGATACA | AGAATAAGTA    | ATATGCATCA | TATATTAAAA | GAATTCAAAT | TAATGAAAAA    | ATTTAATTGG  | GAATCTATAG | CTTTTGATTA | TGTAATATG  |      |
|     | 1501       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1600 |
| 3D7 | TTTCGAATAA | AAGAAATGAA    | AATATGTAAA | ATCAGAACCT | ATTTAAGTTC | TTTAAGTAAT    | TATGTTAATA  | ATATATCTGT | AAATATTGTA | GAAGTTGCTA |      |
| Dd2 | TTTCGAATAA | AAGAAATGAA    | AATATGTAAA | ATCAGAACCT | ATTTAAGTTC | TTTAAGTAAT    | TATGTTAATA  | ATATATCTGT | AAATATTGTA | GAAGTTGCTA |      |
|     | 1601       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1700 |
| 3D7 | TTTTCTTTTT | TTACATAAGA    | AGTGAATTAA | AGAGTAATAA | AACCGTCAGC | TTCAGTTCTT    | TAATCACACC  | CCTTTTTGTT | TATAAATCTT | TAATTTCTGG |      |
| Dd2 | TTTTCTTTTT | TTACATAAGA    | AGTGAATTAA | AGAGTAATAA | AACCGTCAGC | TTCAGTTCTT    | TAATCACACC  | CCTTTTTGTT | TATAAATCTT | TAATTTCTGG |      |
|     | 1701       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1800 |
| 3D7 | TGTATCTAAT | TTTCCAAATA    | TAATTAATAA | TTTAATAGAA | GGTGTATAA  | ATATTAAGCG    | TATTAATAAA  | TATATAAACT | ATTATTTGTT | TAACAATGAT |      |
| Dd2 | TGTATCTAAT | TTTCCAAATA    | TAATTAATAA | TTTAATAGAA | GGTGTATAA  | ATATTAAGCG    | TATTAATAAA  | TATATAAACT | ATTATTTGTT | TAACAATGAT |      |
|     | 1801       |               |            |            |            |               |             |            |            |            | 1900 |
| 3D7 | ATGAATGATT | ATTTTAAGAA    | TTCATTGAAC | GGTATGAAAA | GTAATACGTG | TAACTTTCAA    | AATGGTAACA  | CCAACAATGT | GAATGGTTAT | GTGGATGATT |      |
| Dd2 | ATGAATGATT | ATTTTAAGAA    | TTCATTGAAC | GGTATGAAAA | GTAATACGTG | TAACTTTCAA    | AATGGTAACA  | CCAACAATGT | GAATGGTTAT | GTGGATGATT |      |
|     | 1901       | <b>A1892G</b> |            |            |            | <b>A1936G</b> | <b>1947</b> |            |            |            | 2000 |
| 3D7 | ATGTGGATGA | TTATGTGGAT    | GATTATGTGG | ATGATTATGT | GAATGATTAT | GTGAATGATT    | ATGTG-----  | -----      | -----      | -----      |      |
| Dd2 | ATGTGGATGG | TTATGTGGAT    | GATTATGTGG | ATGATTATGT | GAATGATTAT | GTGGATGATT    | ATGTGAATGA  | TTATGTGGAT | GATTATGTGA | ATGATTATGT |      |

## Anexos

|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             |             |
|------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
|            | <b>2001</b>       |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | <b>2100</b> |
| <b>3D7</b> | -----             | -----              | -----             | -----             | -GAT        | GATTATATGG | ATCATATGAT  | GGAGTATAAT  | ATAAATATCA | ATAGTAAAAA  | TGGTTGTTC   |
| <b>Dd2</b> | <b>GGATGATTAT</b> | <b>GTGAATGATT</b>  | <b>ATGTGGATGA</b> | <b>TTATGTG</b>    | GAT         | GATTATATGG | ATCATATGAT  | GGAGTATAAT  | ATAAATATCA | ATAGTAAAAA  | TGGTTGTTC   |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | 2101        |
| <b>3D7</b> | TCCAAATCAA        | GAAAGAACAA         | CAAATCATT         | TCAAAAGATC        | ATTTTTCAAA  | TCATGAACAA | GGGACGATGC  | AAAGTTTTTA  | CAAATTTTTG | GATAACACACA | 2200        |
| <b>Dd2</b> | TCCAAATCAA        | GAAAGAACAA         | CAAATCATT         | TCAAAAGATC        | ATTTTTCAAA  | TCATGAACAA | GGGACGATGC  | AAAGTTTTTA  | CAAATTTTTG | GATAACACACA |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | <b>2201</b> |
| <b>3D7</b> | AAAATAAAAC        | AAAACAAAAA         | AGCGATTGTA        | <b>A</b> AAAAAATG | TAGTAATAAT  | CAATTATCCA | AGAGTAACAA  | TAATAATGTT  | GTAGGTGAAA | GTAATAATTC  | <b>2300</b> |
| <b>Dd2</b> | AAAATAAAAC        | AAAACAAAAA         | AGCGATTGTA        | <b>T</b> AAAAAATG | TAGTAATAAT  | CAATTATCCA | AGAGTAACAA  | TAATAATGTT  | GTAGGTGAAA | GTAATAATTC  |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | 2301        |
| <b>3D7</b> | ACTATTTCAA        | GACAGAAAAG         | GGTGGTATCC        | AAAAAATAAA        | CATTTTAAAAG | ATAATATAGT | GATAAAATATG | AAGAATTGTT  | ATTTTTCATC | GAAAAATAAT  | 2400        |
| <b>Dd2</b> | ACTATTTCAA        | GACAGAAAAG         | GGTGGTATCC        | AAAAAATAAA        | CATTTTAAAAG | ATAATATAGT | GATAAAATATG | AAGAATTGTT  | ATTTTTCATC | GAAAAATAAT  |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | 2401        |
| <b>3D7</b> | GATGATTATA        | TATTAATAAA         | TATAAACTTA        | ACATTAATAAA       | ATAATAGTGT  | AGTTATTATA | CTTGGGAATG  | TGGGTTTCAGG | AAAAACCATT | TTCTTCTATT  | 2500        |
| <b>Dd2</b> | GATGATTATA        | TATTAATAAA         | TATAAACTTA        | ACATTAATAAA       | ATAATAGTGT  | AGTTATTATA | CTTGGGAATG  | TGGGTTTCAGG | AAAAACCATT | TTCTTCTATT  |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | 2501        |
| <b>3D7</b> | CATTATTAGG        | TCAATTTAAA         | TTATCATGTG        | GTAGTTTTTA        | TTTAAAAAAT  | TATATATATA | AGTATATGCC  | TATTTTATAT  | GTACCACAAT | TTAATTGGAT  | 2600        |
| <b>Dd2</b> | CATTATTAGG        | TCAATTTAAA         | TTATCATGTG        | GTAGTTTTTA        | TTTAAAAAAT  | TATATATATA | AGTATATGCC  | TATTTTATAT  | GTACCACAAT | TTAATTGGAT  |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | 2601        |
| <b>3D7</b> | ATCCTTAGGT        | ACTATCAGAT         | CTATGATATT        | GTTCCGAAAT        | AAGTATGATG  | AATCTATTTA | TTATGATGTC  | ATCGTAAAAA  | GTGAATTATT | TCATGATATA  | 2700        |
| <b>Dd2</b> | ATCCTTAGGT        | ACTATCAGAT         | CTATGATATT        | GTTCCGAAAT        | AAGTATGATG  | AATCTATTTA | TTATGATGTC  | ATCGTAAAAA  | GTGAATTATT | TCATGATATA  |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | 2701        |
| <b>3D7</b> | ATATCCTTTA        | AGAAAAAGGA         | CATGAGATAT        | ATAAGTGATG        | AACATAGTTT  | GAGTAAAGGA | CAAAAAGCTA  | GGATATGTTT  | AGCTAGAGCA | TTGTATCATC  | 2800        |
| <b>Dd2</b> | ATATCCTTTA        | AGAAAAAGGA         | CATGAGATAT        | ATAAGTGATG        | AACATAGTTT  | GAGTAAAGGA | CAAAAAGCTA  | GGATATGTTT  | AGCTAGAGCA | TTGTATCATC  |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | 2801        |
| <b>3D7</b> | ATTATATACA        | TATGAAACAT         | ATGAATTTAT        | ATTATCAGAA        | AAATGAATTA  | ATAAATGAAA | AAATGAAGAA  | AATATCTTTA  | AAAAGAGATG | ATAATCATAC  | 2900        |
| <b>Dd2</b> | ATTATATACA        | TATGAAACAT         | ATGAATTTAT        | ATTATCAGAA        | AAATGAATTA  | ATAAATGAAA | AAATGAAGAA  | AATATCTTTA  | AAAAGAGATG | ATAATCATAC  |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | 2901        |
| <b>3D7</b> | TGCACAGAGG        | TCTAATGATA         | ACACGCCAAA        | TAATAATAAC        | ACAGATAATA  | ATAACACGTC | AGATAATAAT  | AACACGTCAA  | ATAATAATAA | CACATCAGAT  | 3000        |
| <b>Dd2</b> | TGCACAGAGG        | TCTAATGATA         | ACACGCCAAA        | TAATAATAAC        | ACAGATAATA  | ATAACACGTC | AGATAATAAT  | AACACGTCAA  | ATAATAATAA | CACATCAGAT  |             |
|            |                   |                    |                   |                   |             |            |             |             |            |             | <b>3001</b> |
| <b>3D7</b> | AATAATAACA        | <b>C</b> ATCAGATAA | TAATAACACA        | TCAGATAATA        | ATAACACGTC  | AAATAATAAT | AACACAGATA  | ATAATAACAC  | ATCAAATAAT | AAAAATAGTT  | <b>3100</b> |
| <b>Dd2</b> | AATAATAACA        | <b>CG</b> TCAGATAA | TAATAACACA        | TCAGATAATA        | ATAACACGTC  | AAATAATAAT | AACACAGATA  | ATAATAACAC  | ATCAAATAAT | AAAAATAGTT  |             |

## Anexos

|     |            |            |            |            |            |            |             |            |            |             |        |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|--------|
|     | 3101       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 3200   |
| 3D7 | GTAGTAAAAA | CCTTACAGAA | GAAAGGAATA | TATCTTATCT | TTATCTTTTT | GATGATTTGT | TCACCTCTCT  | AGATCCTTGT | ATATCCAAAG | ATATCTTTTA  |        |
| Dd2 | GTAGTAAAAA | CCTTACAGAA | GAAAGGAATA | TATCTTATCT | TTATCTTTTT | GATGATTTGT | TCACCTCTCT  | AGATCCTTGT | ATATCCAAAG | ATATCTTTTA  |        |
|     | 3201       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 3300   |
| 3D7 | TAATTTATTT | TGTGATAAAG | AAAAGATACA | ACATTTTAAA | AAAAACAGTT | CATTTATTTT | ATCCATAAGC  | GAAATTATAT | TAAATAGTTT | TATTTCAAGT  |        |
| Dd2 | TAATTTATTT | TGTGATAAAG | AAAAGATACA | ACATTTTAAA | AAAAACAGTT | CATTTATTTT | ATCCATAAGC  | GAAATTATAT | TAAATAGTTT | TATTTCAAGT  |        |
|     | 3301       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 3400   |
| 3D7 | AATTGTATTC | TTAACAACAT | GCAATATGAT | GTGTTAATAT | ATAAATTAGA | AAACAGTACA | TTACATTATG  | AGGGCAATTT | AGTAGATTAT | ATAAAAAAAAA |        |
| Dd2 | AATTGTATTC | TTAACAACAT | GCAATATGAT | GTGTTAATAT | ATAAATTAGA | AAACAGTACA | TTACATTATG  | AGGGCAATTT | AGTAGATTAT | ATAAAAAAAAA |        |
|     | 3401       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 3500   |
| 3D7 | ATAATATAGT | AGTAAAAGAA | GATATCGTTC | AAACGAATAA | ACAATGTGAA | AAAAAAAGTT | TAACAAATGA  | ACAAGTCAA  | TCTATGTTAA | GTCTTAATGA  |        |
| Dd2 | ATAATATAGT | AGTAAAAGAA | GATATCGTTC | AAACGAATAA | ACAATGTGAA | AAAAAAAGTT | TAACAAATGA  | ACAAGTCAA  | TCTATGTTAA | GTCTTAATGA  |        |
|     | 3501       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | T3414C |
| 3D7 | AGATTGGAAC | TATATGCACC | GTGTAAAAAA | AAAAAGCATC | ACCCAAAAAG | AAACTACCAA | AAATTATGAT  | AATAATAATG | ATAACAATAA | TGATAATAAT  | 3600   |
| Dd2 | AGATTGGAAC | TATATGCACC | GTGTAAAAAA | AAAAAGCATC | ACCCAAAAAG | AAACTACCAA | AAATTATGAT  | AATAATAATG | ATAACAATAA | TGATAACAAT  |        |
|     | 3601       |            |            | G3550A     |            |            | 3591        |            |            |             | 3700   |
| 3D7 | AATGATAACA | ATAATGATAA | CAATAATGAT | AACAATAATG | ATAACAATAA | TGATAACAAT | AATGATAACA  | ATAATAATAA | TAACAATAAT | AATGTTAATG  |        |
| Dd2 | AATGATAACA | ATAATGATAA | CAATAATGAT | AACAATAATA | ATAACAATAA | TGATAACAAT | AAT-----    | -----AA    | TAACAATAAT | AATGTTAATG  |        |
|     | 3701       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 3800   |
| 3D7 | TTAGTAAGGA | AATACTCTCA | TGTGAAATAA | AAACTCAAGA | TCATTATAAT | AATATTCATT | GTAGTAAAAAC | CAATTTTGAG | AAACATAATA | ATAGTATTTA  |        |
| Dd2 | TTAGTAAGGA | AATACTCTCA | TGTGAAATAA | AAACTCAAGA | TCATTATAAT | AATATTCATT | GTAGTAAAAAC | CAATTTTGAG | AAACATAATA | ATAGTATTTA  |        |
|     | 3801       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 3900   |
| 3D7 | TAGTAAGAAA | GAAAATGAGA | CCAGAAAAAT | ACACAGCGGA | GATATAAAAT | ACCACAAATT | TATGGTTCTT  | AAACAATTTA | AAACAATCTA | TTCTTTTAAA  |        |
| Dd2 | TAGTAAGAAA | GAAAATGAGA | CCAGAAAAAT | ACACAGCGGA | GATATAAAAT | ACCACAAATT | TATGGTTCTT  | AAACAATTTA | AAACAATCTA | TTCTTTTAAA  |        |
|     | 3901       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 4000   |
| 3D7 | ACCATTTACT | CGTTCAATAC | AGAAGAAACT | AATGATGATG | AATATAACAA | AACTTATTAT | AGGAAATATA  | CTAAAGTGAT | CCAGAATTAT | GATAATCATT  |        |
| Dd2 | ACCATTTACT | CGTTCAATAC | AGAAGAAACT | AATGATGATG | AATATAACAA | AACTTATTAT | AGGAAATATA  | CTAAAGTGAT | CCAGAATTAT | GATAATCATT  |        |
|     | 4001       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 4100   |
| 3D7 | GTTTAGAAGG | AAAAAAGAAA | AGTTTTAGAA | ATTATAAAAG | CATTAATAGT | TATAATGAAA | TATTAATTAA  | AGAGAATATG | AAAGTTTGGG | AAGATGATAC  |        |
| Dd2 | GTTTAGAAGG | AAAAAAGAAA | AGTTTTAGAA | ATTATAAAAG | CATTAATAGT | TATAATGAAA | TATTAATTAA  | AGAGAATATG | AAAGTTTGGG | AAGATGATAC  |        |
|     | 4101       |            |            |            |            |            |             |            |            |             | 4200   |
| 3D7 | ATATTATGGA | AATGATTATA | TAGATGAATA | TGAAAAATA  | AAAAAGAATG | TTTTATCTAA | ATTAAAATAT  | AATTATTATA | TATCTTGTGA | TTATAATAAC  |        |
| Dd2 | ATATTATGGA | AATGATTATA | TAGATGAATA | TGAAAAATA  | AAAAAGAATG | TTTTATCTAA | ATTAAAATAT  | AATTATTATA | TATCTTGTGA | TTATAATAAC  |        |

## Anexos

|            |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   |             |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------|
|            | 4201              |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 4300        |
| 3D7        | AGTGATCATT        | TTGATTTTAA        | TGAAGAATTA        | AAATTTAAAG        | GAAATATCAA        | GTTAGAAACA        | TTTTGGTGGT         | ATTTAAAAAA        | AATTGGAAGA         | CCTCTAATTA        |             |
| Dd2        | AGTGATCATT        | TTGATTTTAA        | TGAAGAATTA        | AAATTTAAAG        | GAAATATCAA        | GTTAGAAACA        | TTTTGGTGGT         | ATTTAAAAAA        | AATTGGAAGA         | CCTCTAATTA        |             |
|            |                   | 4301              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 4400        |
| 3D7        | TTGTTATTAT        | TATATTTATG        | TTACTTTCTA        | TATTTACAGA        | TGAAATCAAA        | AATTTAATAT        | TATTTTTAGC         | TAGTACTATA        | TTAAAGAGTG         | GTGATAAGAA        |             |
| Dd2        | TTGTTATTAT        | TATATTTATG        | TTACTTTCTA        | TATTTACAGA        | TGAAATCAAA        | AATTTAATAT        | TATTTTTAGC         | TAGTACTATA        | TTAAAGAGTG         | GTGATAAGAA        |             |
|            |                   | 4401              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 4500        |
| 3D7        | AGATGAAGAA        | ATTTTGAATC        | AACAATTAGT        | TTATTTAAAT        | TATTTTATTT        | TATTACCATC        | AATATCTTTA         | TTAACAACAT        | TAATTTCTTT         | TATGTTAATA        |             |
| Dd2        | AGATGAAGAA        | ATTTTGAATC        | AACAATTAGT        | TTATTTAAAT        | TATTTTATTT        | TATTACCATC        | AATATCTTTA         | TTAACAACAT        | TAATTTCTTT         | TATGTTAATA        |             |
|            |                   | 4501              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 4600        |
| 3D7        | GCACATGGTA        | TTGTTAAATC        | GGCTATTAAA        | GTACATACAG        | AAGTATTGCT        | TAGTATATTA        | TATGCCCTTA         | TACATGCATT        | TTATAGTAAT         | AATTTAGGAA        |             |
| Dd2        | GCACATGGTA        | TTGTTAAATC        | GGCTATTAAA        | GTACATACAG        | AAGTATTGCT        | TAGTATATTA        | TATGCCCTTA         | TACATGCATT        | TTATAGTAAT         | AATTTAGGAA        |             |
|            |                   | <b>4601</b>       |                   |                   |                   |                   | <b>T4579A</b>      | <b>C4591A</b>     |                    |                   | <b>4700</b> |
| <b>3D7</b> | <b>ATATAATTAA</b> | <b>TAAATTTATA</b> | <b>ACAGATGTTA</b> | <b>ATATATTAGA</b> | <b>TAATGGAATT</b> | <b>ATTAAAAGAA</b> | <b>TTTATAAAATC</b> | <b>TTTTTATACA</b> | <b>CTCTTTTCGCT</b> | <b>TTTTATTTAC</b> |             |
| <b>Dd2</b> | <b>ATATAATTAA</b> | <b>TAAATTTATA</b> | <b>ACAGATGTTA</b> | <b>ATATATTAGA</b> | <b>TAATGGAATT</b> | <b>ATTAAAAGAA</b> | <b>TTTATAAAAC</b>  | <b>TTTTTATACA</b> | <b>ATCTTTTCGCT</b> | <b>TTTTATTTAC</b> |             |
|            |                   | 4701              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 4800        |
| 3D7        | ACTCTTTTTA        | TTAATATATA        | TGGTTAAATA        | TACTATTGTT        | ATATTCCAT         | TTATTATGTT        | AATTATATAT         | TTTTTTGTAT        | TTAATAAATA         | TTCGAAAGGA        |             |
| Dd2        | ACTCTTTTTA        | TTAATATATA        | TGGTTAAATA        | TACTATTGTT        | ATATTCCAT         | TTATTATGTT        | AATTATATAT         | TTTTTTGTAT        | TTAATAAATA         | TTCGAAAGGA        |             |
|            |                   | 4801              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 4900        |
| 3D7        | TGTAAAGAAG        | CACAAAGAGG        | ATTTTTAGCA        | TCACATGCAC        | CCTTATGTAC        | AATATATAGT        | AATACTATTA         | TAGGAAAGGA        | TGTTATCAAT         | TTATATAAAA        |             |
| Dd2        | TGTAAAGAAG        | CACAAAGAGG        | ATTTTTAGCA        | TCACATGCAC        | CCTTATGTAC        | AATATATAGT        | AATACTATTA         | TAGGAAAGGA        | TGTTATCAAT         | TTATATAAAA        |             |
|            |                   | 4901              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 5000        |
| 3D7        | AAAATAATTA        | TTTCTTAACA        | TTATATAAAC        | AAAAAATATT        | TGATTTTAGA        | AATTATACTA        | TATTTAAGTG         | GTCAATAACT        | ATATGGGCAT         | CTTTTACGCT        |             |
| Dd2        | AAAATAATTA        | TTTCTTAACA        | TTATATAAAC        | AAAAAATATT        | TGATTTTAGA        | AATTATACTA        | TATTTAAGTG         | GTCAATAACT        | ATATGGGCAT         | CTTTTACGCT        |             |
|            |                   | 5001              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 5100        |
| 3D7        | ACAATTAATT        | GTTCTGGCGC        | TAACCTTCTT        | TTATATCATA        | TATCCACATT        | TCTTTTTTAA        | ACACGCAAAA         | CAAGACCATG        | AAATCAACTA         | TGAAAAAGAA        |             |
| Dd2        | ACAATTAATT        | GTTCTGGCGC        | TAACCTTCTT        | TTATATCATA        | TATCCACATT        | TCTTTTTTAA        | ACACGCAAAA         | CAAGACCATG        | AAATCAACTA         | TGAAAAAGAA        |             |
|            |                   | 5101              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 5200        |
| 3D7        | GCTAGTACGA        | TAGGTTATTG        | TATTACCTTT        | TCATGTAGCC        | TTGGTTTTGT        | TATAAAAAGC        | TTATTGTATG         | ACTACACCCA        | TGTAGAAAAG         | GAAATGTGTA        |             |
| Dd2        | GCTAGTACGA        | TAGGTTATTG        | TATTACCTTT        | TCATGTAGCC        | TTGGTTTTGT        | TATAAAAAGC        | TTATTGTATG         | ACTACACCCA        | TGTAGAAAAG         | GAAATGTGTA        |             |
|            |                   | 5201              |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |                   | 5300        |
| 3D7        | GTACACAAAG        | ATTAGAAGAA        | TGCTCCAAGA        | TGATTTAAAGA       | CGAAGGTTAT        | TCTGATGATA        | ATATAACTTT         | GCAAAAATAAT       | GACCCTACCC         | ACGAAGATAA        |             |
| Dd2        | GTACACAAAG        | ATTAGAAGAA        | TGCTCCAAGA        | TGATTTAAAGA       | CGAAGGTTAT        | TCTGATGATA        | ATATAACTTT         | GCAAAAATAAT       | GACCCTACCC         | ACGAAGATAA        |             |

## Anexos

|     |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|     | 5301       |            | 5400       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | TAATAATAAT | AATAATAATA | ATAATAATGA | GCAGGATGCA | AATTTATTTA | AATCTGTTCC | TGGTTCGTAT | GATCCGAATG | ATAAAGAAAA | TATGAGAAAA |
| Dd2 | TAATAATAAT | AATAATAATA | ATAATAATGA | GCAGGATGCA | AATTTATTTA | AATCTGTTCC | TGGTTCGTAT | GATCCGAATG | ATAAAGAAAA | TATGAGAAAA |
|     | 5401       |            | 5500       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | TACAAAACAG | AAATTGTTAA | TAATACAAAA | GATATGTATT | CTATTATAAA | TAAGGATGAT | ATGTTAACAC | ATTCAATTAA | TAATAAGAAT | AATAAATTAA |
| Dd2 | TACAAAACAG | AAATTGTTAA | TAATACAAAA | GATATGTATT | CTATTATAAA | TAAGGATGAT | ATGTTAACAC | ATTCAATTAA | TAATAAGAAT | AATAAATTAA |
|     | 5501       |            | 5600       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | AAAAATTATA | TACCAGTCCT | CATATAGATA | TTAATAAAAT | AAAGTATGGT | ATCTGTTTCG | AAAGAGTATT | TGTTAGCTAT | AAAAAGAAAA | TTTGTGTTGA |
| Dd2 | AAAAATTATA | TACCAGTCCT | CATATAGATA | TTAATAAAAT | AAAGTATGGT | ATCTGTTTCG | AAAGAGTATT | TGTTAGCTAT | AAAAAGAAAA | TTTGTGTTGA |
|     | 5601       |            | 5700       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | TAGAAAAAAT | AATAAATATG | AATATGTAAA | TGAAAAATCA | TGCTTAAAAA | ATATCAATAT | ATATGCTTTA | AAAAATCAGA | AAATTGGTAT | CGTAGGAAAA |
| Dd2 | TAGAAAAAAT | AATAAATATG | AATATGTAAA | TGAAAAATCA | TGCTTAAAAA | ATATCAATAT | ATATGCTTTA | AAAAATCAGA | AAATTGGTAT | CGTAGGAAAA |
|     | 5701       |            | 5800       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | TCAGGAGCAG | GAAAAAGTAC | TATGATACTA | TCTATTCTAG | GTTTAATAGG | TACTACTAGA | GGAAGAATTA | CTATTGAAGG | ACAAGATATA | AAAACCTTAA |
| Dd2 | TCAGGAGCAG | GAAAAAGTAC | TATGATACTA | TCTATTCTAG | GTTTAATAGG | TACTACTAGA | GGAAGAATTA | CTATTGAAGG | ACAAGATATA | AAAACCTTAA |
|     | 5801       |            | 5900       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | CGTTAGATGA | AAGAAAAAAT | ATGATTGGTG | TATTACCACA | ATCATCTTTT | GTATTTTTTC | ATTGGAATAT | TAGAACATTT | ATAGATCCAT | ATAAAGATTT |
| Dd2 | CGTTAGATGA | AAGAAAAAAT | ATGATTGGTG | TATTACCACA | ATCATCTTTT | GTATTTTTTC | ATTGGAATAT | TAGAACATTT | ATAGATCCAT | ATAAAGATTT |
|     | 5901       |            | 6000       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | TACTGATGAT | GAAATTGTTG | ATGCTTTCAA | ATTAATAGGA | ATTAATTTAA | GTTATGATGA | TTTAGATAAA | TATATTTATA | AACAACAACG | ACAACAACAA |
| Dd2 | TACTGATGAT | GAAATTGTTG | ATGCTTTCAA | ATTAATAGGA | ATTAATTTAA | GTTATGATGA | TTTAGATAAA | TATATTTATA | AACAACAACG | ACAACAACAA |
|     | 6001       |            | 6100       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | AAAAAAAAAA | ATAAAAATAC | ACATAATTTA | TGGAAAAAAA | AAAGTTTTAT | TGATTTAACG | AACTCTATAT | CTTTATCAGA | TGAATGTATT | AGATATTTAT |
| Dd2 | AAAAAAAAAA | ATAAAAATAC | ACATAATTTA | TGGAAAAAAA | AAAGTTTTAT | TGATTTAACG | AACTCTATAT | CTTTATCAGA | TGAATGTATT | AGATATTTAT |
|     | 6101       |            | 6200       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | CATTAGTACG | TCTTTTTTTA | AATAGACATA | AATATAAACT | CATTTTAATC | GATGAAATAC | CTGTACTTAA | TTTCTGTTAT | AATACCAAAA | AATTAACCAA |
| Dd2 | CATTAGTACG | TCTTTTTTTA | AATAGACATA | AATATAAACT | CATTTTAATC | GATGAAATAC | CTGTACTTAA | TTTCTGTTAT | AATACCAAAA | AATTAACCAA |
|     | 6201       |            | 6300       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | CTTCTTTACA | ACAGATATTA | AATCTTTTGA | TTATATTATT | AGAACATTCT | TTCAAAATAC | TACAGTCCTC | ATTATTGCTC | ATGATGCAAG | TACACTCTCA |
| Dd2 | CTTCTTTACA | ACAGATATTA | AATCTTTTGA | TTATATTATT | AGAACATTCT | TTCAAAATAC | TACAGTCCTC | ATTATTGCTC | ATGATGCAAG | TACACTCTCA |
|     | 6301       |            | 6400       |            |            |            |            |            |            |            |
| 3D7 | TGTTGTGATT | TTATTTACGT | TATCGCAAAG | GGAGAAGTTG | TATACAAATG | TAGTTATAAA | GATGTTAAAA | CACAAACCGA | ATTAGCTAAC | TTGCTTCAAG |
| Dd2 | TGTTGTGATT | TTATTTACGT | TATCGCAAAG | GGAGAAGTTG | TATACAAATG | TAGTTATAAA | GATGTTAAAA | CACAAACCGA | ATTAGCTAAC | TTGCTTCAAG |



## Anexos

6401                    6417  
 3D7    AAAAAACAATT    AAATTGA  
 Dd2    AAAAAACAATT    AAATTGA

### Sequência de aminoácidos resultante da tradução do gene *pfmrp2* para os clones 3D7 e Dd2.

|     |            |            |  |
|-----|------------|------------|--|
|     | 1          |            | 100  |
| Dd2 | MMRRRSVYNF | DQGKHGYLMN | HISWLN   |
| 3D7 | MMRRRSVYNF | DQGKHGYLMN | HISWLN   |
|     |            |            |  |
|     | 101        |            | 200  |
| Dd2 | KNHTNKFHKK | KKEDHFLKSS | GITYAVL  |
| 3D7 | KNHTNKFHKK | KKEDHFLKSS | GITYAVL  |
|     |            |            |  |
|     | <b>201</b> |            | <b>MRP2A                    300</b>                          |
| Dd2 | CYYDFRLRVN | MEVTVMYFLY | KITLGNF  |
| 3D7 | CYYDFRLRVN | MEVTVMYFLY | KITLGNF  |
|     |            |            |  |
|     | 301        |            | VFDISIYNI                    400                             |
| Dd2 | TYIKNNNNQM | SHINDLSITN | NMSDVH   |
| 3D7 | TYIKNNNNQM | SHINDLSITN | NMSDVH   |
|     |            |            |  |
|     | 401        |            | 500  |
| Dd2 | PFLIYFITAL | IELANMIIKF | IMSFYMF  |
| 3D7 | PFLIYFITAL | IELANMIIKF | IMSFYMF  |
|     |            |            |  |
|     | 501        |            | 600  |
| Dd2 | FRIKEMKICK | IRTYLSSLSN | YVNNISV  |
| 3D7 | FRIKEMKICK | IRTYLSSLSN | YVNNISV  |
|     |            |            |  |
|     | <b>601</b> |            | <b>G631D                    N646D                    700</b> |
| Dd2 | MNDYFKNSLN | GMKSNTCNFQ | NGNTNNV  |
| 3D7 | MNDYFKNSLN | GMKSNTCNFQ | NGNTNNV  |
|     |            |            |  |
|     | <b>701</b> |            | <b>I714K                    MRP2B                    800</b> |
| Dd2 | SKSRKNNKSF | SKDHFSNHEQ | GTMQSFY  |
| 3D7 | SKSRKNNKSF | SKDHFSNHEQ | GTMQSFY  |
|     |            |            |  |
|     | 801        |            | 900  |
| Dd2 | DDYILKNINL | TLKNNSVVI  | LGNVSGK  |
| 3D7 | DDYILKNINL | TLKNNSVVI  | LGNVSGK  |
|     |            |            |  |
|     | 901        |            | 1000   |
| Dd2 | ISFKKKDMRY | ISDEHSLSKG | QKARICLA   |
| 3D7 | ISFKKKDMRY | ISDEHSLSKG | QKARICLA   |

## Anexos

|                      |            |            |            |             |            |            |            |            |            |               |
|----------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------|
| <b>T980T</b>         |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>1100</b>   |
| <b>1001</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            |               |
| Dd2                  | NNNTSDNNNT | SDNNNTSNNN | NTDNNNTSNN | KNSCSKNLTE  | ERNISYLYLF | DDLFTSLDPC | ISKDIFYNLF | CDKEKIQHFK | KNSSFILSIS | EIILNSFISS    |
| 3D7                  | NNNTSDNNNT | SDNNNTSNNN | NTDNNNTSNN | KNSCSKNLTE  | ERNISYLYLF | DDLFTSLDPC | ISKDIFYNLF | CDKEKIQHFK | KNSSFILSIS | EIILNSFISS    |
| <b>1101</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>D1138D</b> |
| Dd2                  | NCILNNMQYD | VLIYKLENST | LHYEGLVDY  | IKKNNIVVKE  | DIVQTNKQCE | KKSLTNEQVK | SMLSLENDWN | YMRVKKKSI  | TQKETTNYD  | NNNDNNNDNN    |
| 3D7                  | NCILNNMQYD | VLIYKLENST | LHYEGLVDY  | IKKNNIVVKE  | DIVQTNKQCE | KKSLTNEQVK | SMLSLENDWN | YMRVKKKSI  | TQKETTNYD  | NNNDNNNDNN    |
| <b>1201</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>1300</b>   |
| <b>N1184D</b>        |            |            |            |             |            |            |            |            |            |               |
| Dd2                  | NDNNNDNNND | NNNNNNNDNN | N-----NNNN | NVNVSKKELS  | CEIKTQDHYN | NIHCSKTNFE | KHNNSIYSKK | ENETRKHSG  | DIKYHKFMVL | KQFKTIYSFK    |
| 3D7                  | NDNNNDNNND | NNNNNNNDNN | NDNNNNNNNN | NVNVSKKELS  | CEIKTQDHYN | NIHCSKTNFE | KHNNSIYSKK | ENETRKHSG  | DIKYHKFMVL | KQFKTIYSFK    |
| <b>1301</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>1400</b>   |
| Dd2                  | TIYSFNTEET | NDDEYNKTY  | RKYTKVIQNY | DNHCLEGGKK  | SFRNYKSINS | YNEILIKENM | KVWEDDYYG  | NDYIDEYEKI | KKNVLSKLY  | NYIISCDYNN    |
| 3D7                  | TIYSFNTEET | NDDEYNKTY  | RKYTKVIQNY | DNHCLEGGKK  | SFRNYKSINS | YNEILIKENM | KVWEDDYYG  | NDYIDEYEKI | KKNVLSKLY  | NYIISCDYNN    |
| <b>1401</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>1500</b>   |
| Dd2                  | SDHFDNEEL  | KFKGNIKLET | FWWYLKIGR  | PLIIVIIIFM  | LLSIFTDEIK | NLILFLASTI | LKSGDKKDEE | ILNQQLVYLN | YFILLPSISL | LTTLISFMLI    |
| 3D7                  | SDHFDNEEL  | KFKGNIKLET | FWWYLKIGR  | PLIIVIIIFM  | LLSIFTDEIK | NLILFLASTI | LKSGDKKDEE | ILNQQLVYLN | YFILLPSISL | LTTLISFMLI    |
| <b>1501</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>1600</b>   |
| <b>T1527S I1531L</b> |            |            |            |             |            |            |            |            |            |               |
| Dd2                  | AHGIVKSAIK | VHTEVLLSIL | YAPIHAFYSN | NLGNIIINKFI | TDVNILDNGI | IKRIYKTFYT | IFRFLFTLFL | LIYMVKYTIV | IFPFIMLIY  | FFVFNKYSKG    |
| 3D7                  | AHGIVKSAIK | VHTEVLLSIL | YAPIHAFYSN | NLGNIIINKFI | TDVNILDNGI | IKRIYKSFYT | LFRFLFTLFL | LIYMVKYTIV | IFPFIMLIY  | FFVFNKYSKG    |
| <b>1601</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>1700</b>   |
| Dd2                  | CKEAQRGFLA | SHAPLCTIYS | NTIIGKDVIN | LYKKNNYFLT  | LYKQKIFDFR | NYTIFKWSIT | IWASLYVQLI | VLALTFYII  | YPHFFKHAK  | QDHEINYEKE    |
| 3D7                  | CKEAQRGFLA | SHAPLCTIYS | NTIIGKDVIN | LYKKNNYFLT  | LYKQKIFDFR | NYTIFKWSIT | IWASLYVQLI | VLALTFYII  | YPHFFKHAK  | QDHEINYEKE    |
| <b>1701</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>MRP2C</b>  |
| Dd2                  | ASTIGYCITF | SCSLGFVIKS | LLYDYTHVEK | EMCSTQRLEE  | CCKMIKDEGY | SDDNITLQNN | DPTHEDNAAA | NNNNNNEQDA | NLFKSVPGSY | DPNDKENMRK    |
| 3D7                  | ASTIGYCITF | SCSLGFVIKS | LLYDYTHVEK | EMCSTQRLEE  | CCKMIKDEGY | SDDNITLQNN | DPTHEDNAAA | NNNNNNEQDA | NLFKSVPGSY | DPNDKENMRK    |
| <b>1801</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>1900</b>   |
| Dd2                  | YKTEIVNNTK | DMYSIINKDD | MLTHSINNKN | NKLKLYTSP   | HIDINKIKYG | ICFERVFSY  | KKKICVDRKN | NKYEYVNEKS | CLKNINIYAL | KNQKIGIVGK    |
| 3D7                  | YKTEIVNNTK | DMYSIINKDD | MLTHSINNKN | NKLKLYTSP   | HIDINKIKYG | ICFERVFSY  | KKKICVDRKN | NKYEYVNEKS | CLKNINIYAL | KNQKIGIVGK    |
| <b>1901</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>2000</b>   |
| Dd2                  | SGAGKSTMIL | SILGLIGTTR | GRITIEGQDI | KTLTLDERKN  | MIGVLPQSSF | VFFHWNIRTF | IDPYKFTDD  | EIVDAFKLIG | INLSYDDLK  | YIYKQORQQQ    |
| 3D7                  | SGAGKSTMIL | SILGLIGTTR | GRITIEGQDI | KTLTLDERKN  | MIGVLPQSSF | VFFHWNIRTF | IDPYKFTDD  | EIVDAFKLIG | INLSYDDLK  | YIYKQORQQQ    |
| <b>2001</b>          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | <b>2100</b>   |
| Dd2                  | KKKNKNTNHL | WKKKSFIDLT | NSISLSDECI | RYLSLVRFL   | NRHKYKILI  | DEIPVLNFCY | NTKCLTNFFT | TDIKSFDYII | RTFFQNTTVL | IIAHDASTLS    |
| 3D7                  | KKKNKNTNHL | WKKKSFIDLT | NSISLSDECI | RYLSLVRFL   | NRHKYKILI  | DEIPVLNFCY | NTKCLTNFFT | TDIKSFDYII | RTFFQNTTVL | IIAHDASTLS    |

## Anexos

---

|     |            |           |            |          |      |
|-----|------------|-----------|------------|----------|------|
|     | 2101       |           |            |          | 2138 |
| Dd2 | CCDFIYVIAK | GEVVKCSYK | DVKTQTELAN | LLQEKQLN |      |
| 3D7 | CCDFIYVIAK | GEVVKCSYK | DVKTQTELAN | LLQEKQLN |      |

**ANEXO 10**

Repetições na sequência do gene *pfmrp2* nos clones 3D7 e Dd2 de *P.falciparum* (vermelho alterações pontuais, sublinhados os segmentos que se repetem e a amarelo a endonuclease *BccI* que permite identificar o polimorfismo D631G), as sequências foram truncadas nos locais assinalados nas extremidades

**Posição 779**

|     |     |  |                          |          |
|-----|-----|--|--------------------------|----------|
| 3D7 | 762 | tatgatgaaaatgatca-----gaatgatcagaatgagcaa              | agcgatttacgtgatatacgacat | 822 bps  |
|     | 254 | Y D E N D Q-----N D Q N E Q                            | S D L R D I R H          | 274 a.a. |
| Dd2 | 762 | tatgatgaaaatgatcaaaatgatgaaaatgatcagaatgatcagaatgagcaa | agcgatttacgtgatatacgacat | 840 bps  |
|     | 254 | Y D E N D Q <u>N D E N D Q</u> <u>N D Q N E Q</u>      | S D L R D I R H          | 280 a.a. |

**D631G *BCCl***

**Posição 1947**

|     |      |  |                |                |  |
|-----|------|--|----------------|----------------|--|
| 3D7 | 1869 | tatgtg gatgattatgtggatgattatgtg attatgtg gatgattatgtggatgattatgtg          | aatgattatgtg   | aatgattatgtg   |  |
|     | 623  | Y V D D Y V D <b>D</b> Y V D D Y V D D Y V                                 | N D Y V        | <b>N</b> D Y V |  |
| Dd2 | 1887 | tatgtg gatgattatgtggatgattatgtg gttatgtg gatgattatgtggatgattatgtg          | aatgattatgtg   | gatgattatgtg   |  |
|     | 629  | Y V D D Y V D <b>G</b> Y V D D Y V D D Y V                                 | <u>N D Y V</u> | <u>D D Y V</u> |  |
| 3D7 |      | -----  | gatgat         | 1953 bps       |  |
|     |      | -----  | D D            | 651 a.a.       |  |
| Dd2 |      | aatgattatgtggatgattatgtg aatgattatgtggatgattatgtg aatgattatgtggatgattatgtg | gatgat         | 2043 bps       |  |
|     |      | <u>N D Y V D D Y V</u> <u>N D Y V D D Y V</u> <u>N D Y V D D Y V</u>       | D D            | 681 a.a.       |  |

**Posição 3591**

|     |          |   |           |
|-----|----------|---|-----------|
| 3D7 | 3486 bps | acccaaaaagaaaactaccaaaaattatgataataataatgataacaataatgataataataatgataacaataatgataacaataatgat           |           |
|     | 1162 a.a | T Q K E T T K N Y <u>D N N N</u> <u>D N N N</u> <u>D N N N</u> <u>D N N N</u> <u>D N N N</u> <u>D</u> |           |
| Dd2 | 3576 bps | acccaaaaagaaaactaccaaaaattatgataataataatgataacaataatgataacaataatgataacaataatgataacaataatgat           |           |
|     | 1192 a.a | T Q K E T T K N Y D N N N D N N N D N N N D N N N D N N N D N N N D                                   |           |
| 3D7 |          | aacaataatgataacaataatgataacaataatgataacaataataataacaataataatgttaatgtagtaaggaaataactctca               | 3666 bps  |
|     |          | <u>N N N</u> <b>D</b> <u>N N N</u> <u>D N N N</u> <u>D N N N</u> N N N N N N V N V S K E I L S        | 1222 a.a. |
| Dd2 |          | aacaataataacaataatgataacaataat-----aataacaataataatgttaatgtagtaaggaaataactctca                         | 3741 bps  |
|     |          | N N N <b>N</b> N N N D N N N - - - - N N N N N V N V S K E I L S                                      | 1247 a.a. |

Anexos

ANEXO 11

Repetições na sequência do gene (*pfy-gcs*) e proteína (PFI0925w) que codifica a enzima  $\gamma$ -GCS nos clones 3D7 K1 HB3 e Dd2 de *P.falciparum* ( os a.a. sublinhados correspondem a alterações pontuais)

|     |     |        |                          |                               |                          |                               |
|-----|-----|--------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 3D7 | 810 | caacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa | -----                         |                          |                               |
|     | 270 | Q Q    | Y Q S N L Q Q Q          | -----                         |                          |                               |
| K1  | 810 | caacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      |
|     | 270 | Q Q    | Y Q S N L Q Q Q          | Y Q S N L Q Q Q               | Y Q S N L Q Q Q          | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q        |
| HB3 | 810 | caacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      |
|     | 270 | Q Q    | Y Q S N L Q Q Q          | Y Q S N L Q Q Q               | Y Q S N L Q Q Q          | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q        |
| Dd2 | 810 | caacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      |
|     | 270 | Q Q    | Y Q S N L Q Q Q          | Y Q S N L Q Q <u>R</u>        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q        |
| 3d7 |     |        | -----                    | -----                         |                          |                               |
| K1  |     |        | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      |
|     |     |        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q        |
| HB3 |     |        | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      |
|     |     |        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | <u>C</u> Q S <u>D</u> L Q Q Q |
| Dd2 |     |        | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      |
|     |     |        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q        |
| 3d7 |     |        | -----                    | aatgta                        | 836 bps                  |                               |
|     |     |        | -----                    | N V                           | 282 a.a                  |                               |
| K1  |     |        | -----                    | aatgta                        | 1812 bps                 |                               |
|     |     |        | -----                    | N V                           | 334 a.a                  |                               |
| HB3 |     |        | taccaatcgaatttacaacaacaa | -----                         | aatgta                   | 1836 bps                      |
|     |     |        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | -----                         | N V                      | 342 a.a.                      |
| Dd2 |     |        | taccaatcgaatttacaacaacaa | taccaatcgaatttacaacaacaa      | aatgta                   | 1860 bps                      |
|     |     |        | Y Q S <u>D</u> L Q Q Q   | <u>C</u> Q S <u>D</u> L Q Q Q | N V                      | 350 a.a.                      |

## Anexos

### ANEXO 12

**Isolados de *P. falciparum* agrupados de acordo com as frequências das inserções/deleções nos genes *pfmrp2* e *pfy-gcs* e a susceptibilidade a cada fármaco** CQ - cloroquina; MEQ - mefloquina; QN - quinino; AMQ - amodiaquina; S - sensível; R – resistente; Os número entre parênteses referem-se ao número de isolados que apresentaram infecções mistas, não foram consideramos para o estudo da associação do genótipo à resposta ao fármaco.

|               | Fármaco       | Fenótipo | <i>pfmrp2</i> |      |       |   |       |       |      |       | <i>pfy-gcs</i> |       |       |      |
|---------------|---------------|----------|---------------|------|-------|---|-------|-------|------|-------|----------------|-------|-------|------|
|               |               |          | 779           |      | 1947  |   |       |       | 3591 |       | 1542           |       |       |      |
|               |               |          | 1             | 2    | 1     | 3 | 4     | 5     | 9    | 8     | 1              | 10    | 8     | 9    |
| Tailândia     | MEF<br>(N=47) | S        | 4             | 12   | 10    | 2 | 4     | 1     | 14   | 2     | 1              | 5     | 7     | 3    |
|               |               | R        | 24            | 7    | 12(8) | 1 | 9(8)  | 0     | 5    | 26    | 7(4)           | 6(2)  | 6(2)  | 2(2) |
|               | AMQ<br>(N=10) | S        | 1             | 2    | 1     | 0 | 2     | 0     | 2    | 1     | 0              | 2     | 1     | 0    |
|               |               | R        | 3             | 4    | 3     | 0 | 4     | 0     | 6    | 1     | 0              | 2     | 3     | 2    |
|               | CQ<br>(N=47)  | S        | 0             | 0    | 0     | 0 | 0     | 0     | 0    | 0     | 0              | 0     | 0     | 0    |
|               |               | R        | 29            | 18   | 24(8) | 0 | 15(8) | 1     | 19   | 28    | 11(4)          | 12(2) | 14(2) | 5(2) |
| Angola        | MEF<br>(N=39) | S        | 17            | 7    | 10(2) | 0 | 14(2) | 0     | 10   | 14    | 5(2)           | 9(2)  | 4     | 4    |
|               |               | R        | 10            | 5    | 7(2)  | 0 | 6(2)  | 0     | 8    | 7     | 3(2)           | 6(2)  | 2     | 2    |
|               | QN<br>(N=40)  | S        | 15            | 11   | 13(2) | 0 | 11(2) | 0     | 17   | 11    | 7(2)           | 8(2)  | 5     | 4    |
|               |               | R        | 11            | 3    | 3(2)  | 0 | 9(2)  | 0     | 5    | 7     | 1(2)           | 7(2)  | 2     | 2    |
|               | CQ<br>(N=44)  | S        | 3             | 0    | 0     | 0 | 3     | 0     | 1    | 2     | 0              | 3     | 0     | 0    |
|               |               | R        | 27            | 14   | 17(4) | 0 | 20(4) | 0     | 22   | 19    | 8(4)           | 15(4) | 8     | 6    |
| STP<br>(N=35) | CQ            | S        | 3             | 2    | 3     | 0 | 1     | 1     | 0(1) | 3(1)  | 1              | 1     | 2     | 1    |
|               |               | R        | 17(4)         | 9(4) | 14(3) | 0 | 1     | 10(3) | 7(4) | 20(4) | 4(4)           | 12(4) | 5     | 5    |

\* referente ao clone 3D7; \*\* 5 repetições da sequência NDYVDDYV.

**ANEXO 13**

Isolados agrupados de acordo com a susceptibilidade a cada fármaco e as mutações pontuais nos genes *pfmrp1* e *pfmrp2* (CQ - cloroquina; MEF - mefloquina; QN - quinino; AMQ - amodiaquina; S - sensível; R – resistente).

|               | Fármaco       | Fenótipo | <i>pfmrp1</i> |    |     |    |      |    | <i>pfmrp2</i> |    |
|---------------|---------------|----------|---------------|----|-----|----|------|----|---------------|----|
|               |               |          | 191           |    | 347 |    | 1390 |    | 631           |    |
|               |               |          | H             | Y  | S   | A  | I    | F  | D             | G  |
| Tailândia     | MEF<br>(N=47) | S        | 4             | 13 | 6   | 12 | 0    | 17 | 1             | 15 |
|               |               | R        | 0             | 30 | 0   | 29 | 0    | 30 | 0             | 31 |
|               | AMQ<br>(N=10) | S        | 0             | 3  | 0   | 1  | 0    | 12 | 0             | 3  |
|               |               | R        | 1             | 6  | 2   | 7  | 0    | 25 | 0             | 7  |
|               | CQ<br>(N=47)  | S        | 0             | 0  | 0   | 0  | 0    | 0  | 0             | 0  |
|               |               | R        | 4             | 43 | 6   | 41 | 0    | 47 | 1             | 46 |
| Angola        | MEF<br>(N=39) | S        | 24            | 0  | 24  | 0  | 2    | 23 | 25            | 0  |
|               |               | R        | 15            | 0  | 15  | 0  | 0    | 14 | 14            | 0  |
|               | QN<br>(N=40)  | S        | 27            | 0  | 25  | 0  | 2    | 24 | 26            | 0  |
|               |               | R        | 13            | 0  | 15  | 0  | 0    | 14 | 14            | 0  |
|               | CQ<br>(N=44)  | S        | 0             | 0  | 3   | 0  | 0    | 3  | 3             | 0  |
|               |               | R        | 44            | 0  | 41  | 0  | 2    | 39 | 41            | 0  |
| STP<br>(N=35) | CQ            | S        | 2             | 3  | 5   | 0  | 0    | 4  | 5             | 0  |
|               |               | R        | 5             | 25 | 30  | 0  | 2    | 29 | 30            | 0  |

## Anexos

### ANEXO 14

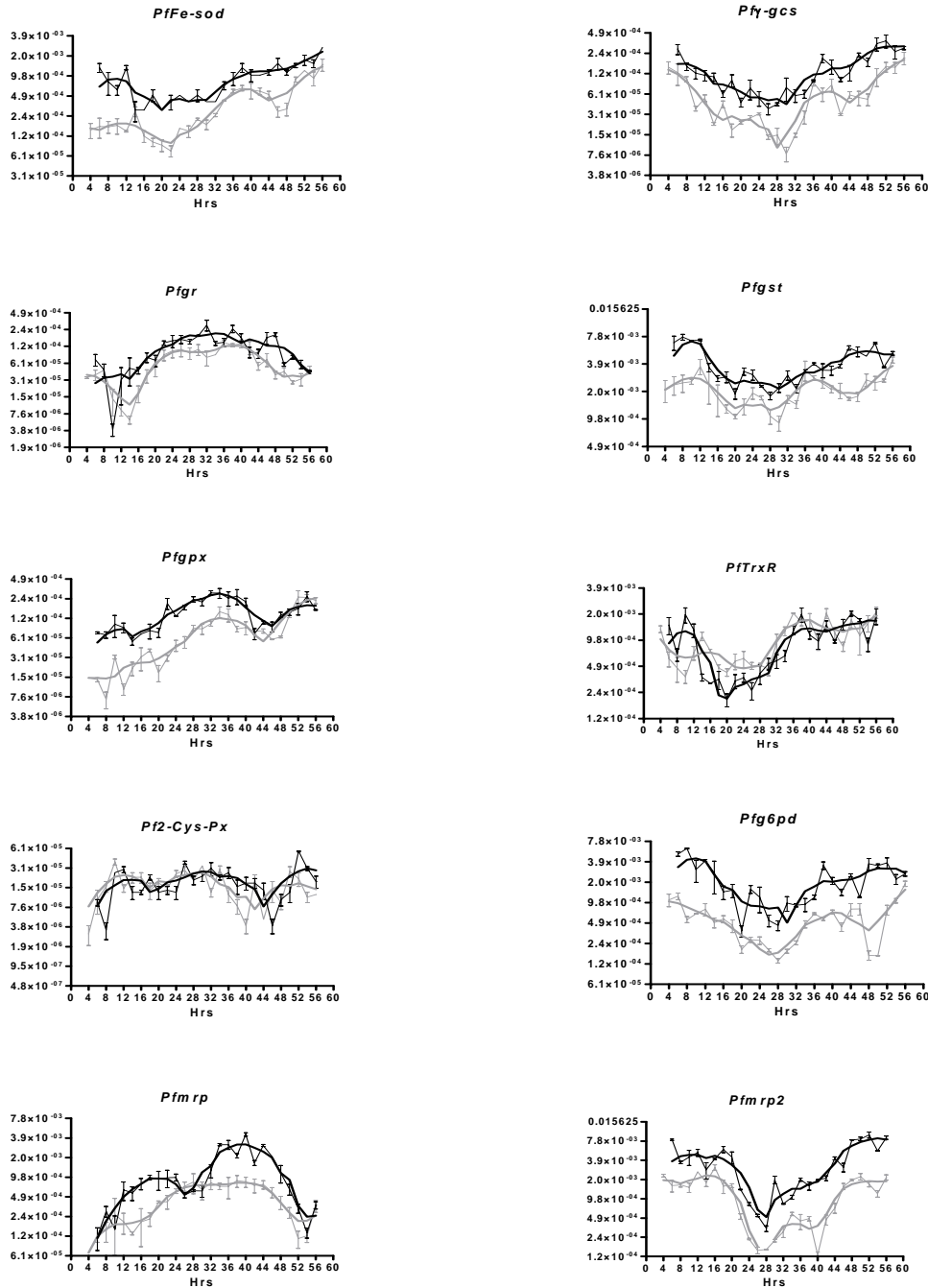
**Número de cópias dos genes *pfmdr1*, *pfmrp* e *pfmrp2* em isolados provenientes da Tailândia e Angola.** MEF - mefloquina, AQ - amodiaquina; QN – quinino; S – sensível; R – resistente; média - média do número de cópias de cada gene; dp - desvio padrão; \* - não foram avaliados os fenótipos dos isolados nesta região, relativos ao fármaco; na – não avaliado o fenótipo do isolado relativamente ao fármaco.

|           | amostra | MEF | AQ | QN  | Nº de cópias dos genes |      |               |      |               |      |
|-----------|---------|-----|----|-----|------------------------|------|---------------|------|---------------|------|
|           |         |     |    |     | <i>pfmdr1</i>          |      | <i>pfmrp1</i> |      | <i>pfmrp2</i> |      |
|           |         |     |    |     | média                  | dp   | média         | dp   | média         | dp   |
| clone     | 3D7     | S   | S  | S   | 1                      | -    | 1             | -    | 1             | -    |
|           | Dd2     | R   | R  | R   | 3,95                   | 0,07 | 0,92          | 0,54 | 0,96          | 0,23 |
| Tailândia | S90     | S   | na | S   | 1,8                    | 0,57 | 1             | 0,01 | 1             | 0,01 |
|           | S151    | S   | R  | S   | 0,9                    | 0,09 | 1,1           | 0,01 | 0,6           | 0,14 |
|           | S152    | S   | R  | S   | 2,0                    | 0,39 | 0,7           | 0,06 | 0,7           | 0,05 |
|           | S157    | S   | S  | S   | 1,5                    | 0,25 | 1             | 0,13 | 0,9           | 0,07 |
|           | S160    | S   | S  | S   | 3,8                    | 0,50 | 1,2           | 0,04 | 0,7           | 0,08 |
|           | CH1     | S   | na | S   | 1,5                    | 0,00 | 1             | 0,05 | 0,6           | 0,11 |
|           | TP7     | S   | R  | S   | 1,9                    | 0,24 | 0,6           | 0,02 | 0,4           | 0,04 |
|           | TP13    | S   | R  | S   | 1,5                    | 0,00 | 1,3           | 0,01 | 0,5           | 0,09 |
|           | TP20    | R   | R  | S   | 2,5                    | 0,01 | 0,6           | 0,06 | 0,8           | 0,01 |
|           | RC17    | R   | R  | S   | 3,4                    | 0,44 | 0,9           | 0,04 | 0,7           | 0,03 |
|           | T115    | R   | na | S   | 2,2                    | 0,01 | 0,4           | 0,01 | 0,4           | 0,01 |
|           | T130    | R   | na | S   | 3,5                    | 0,03 | 0,9           | 0,3  | 0,5           | 0,09 |
|           | TD14    | R   | R  | S   | 2,6                    | 0,23 | 0,4           | 0,08 | 0,5           | 0,07 |
|           | TD8     | R   | na | S   | 5,1                    | 0,83 | 0,8           | 0,01 | 0,4           | 0,11 |
| TD79      | R       | S   | S  | 4,0 | 1,61                   | 0,7  | 0,08          | 0,6  | 0,08          |      |
| Angola    | 16      | S   | *  | R   | 0,8                    | 0,01 | 0,9           | 0,11 | 0,9           | 0,04 |
|           | 17      | R   | *  | R   | 6,3                    | 0,81 | 0,7           | 0,03 | 0,7           | 0,08 |
|           | 18      | R   | *  | R   | 3,0                    | 0,19 | 0,3           | 0,04 | 0,3           | 0,03 |
|           | 19      | R   | *  | R   | 6,2                    | 1,11 | 0,7           | 0,01 | 0,6           | 0,08 |
|           | 20      | R   | *  | R   | 1,1                    | 0,10 | 0,7           | 0,11 | 0,6           | 0,04 |
|           | 21      | S   | *  | na  | 2,3                    | 0,02 | 0,9           | 0,09 | 0,6           | 0,1  |
|           | 22      | R   | *  | S   | 1,1                    | 0,01 | 0,7           | 0,06 | 0,8           | 0,1  |
|           | 23      | R   | *  | S   | 0,8                    | 0,01 | 0,7           | 0,08 | 0,8           | 0,1  |
|           | 24      | S   | *  | S   | 1,0                    | 0,15 | 0,8           | 0,02 | 0,5           | 0,05 |
|           | 25      | R   | *  | R   | 1,4                    | 0,01 | 1,1           | 0,04 | 0,7           | 0,03 |
|           | 26      | R   | *  | S   | 1,2                    | 0,00 | 0,9           | 0,08 | 0,9           | 0,12 |
|           | 27      | S   | *  | S   | 0,8                    | 0,00 | 0,7           | 0,03 | 0,7           | 0,06 |
|           | 28      | S   | *  | S   | 4,9                    | 0,02 | 0,4           | 0,11 | 1             | 0,17 |
|           | 29      | S   | *  | S   | 2,6                    | 0,52 | 0,4           | 0,1  | 0,5           | 0,06 |
| 30        | S       | *   | S  | 3,2 | 0,82                   | 0,6  | 0,19          | 0,9  | 0,23          |      |



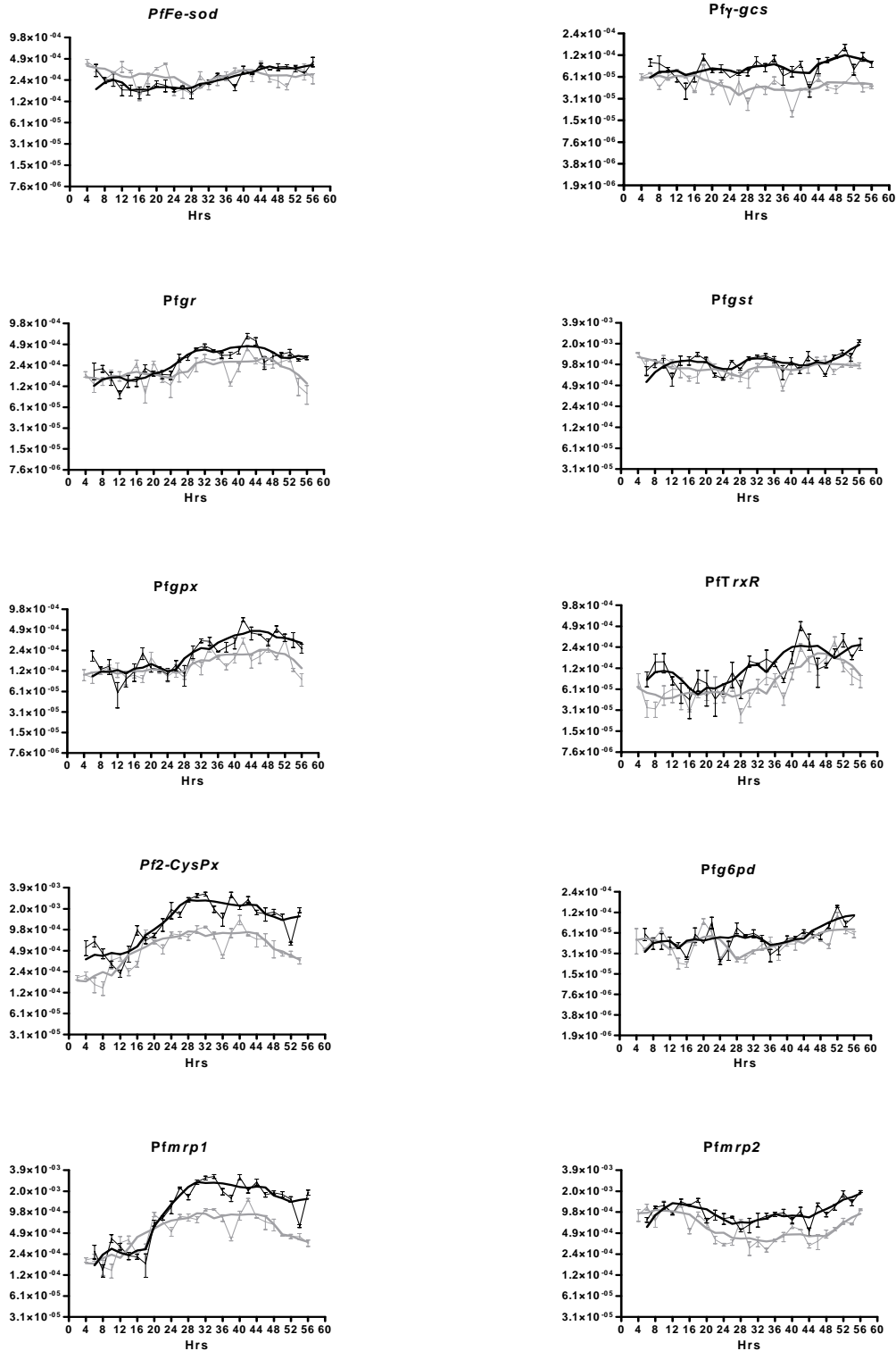
## ANEXO 15

Perfis de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pfγ-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-cysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intraeritrocitário de *P. falciparum* presença e ausência de cloroquina.



Perfil de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pfγ-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-cysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intraeritrocitário do clone 3D7 de *P. falciparum*. No eixo dos Y está representada (escala logarítmica de base 2) a quantidade relativa mRNA de cada gene (em relação ao controlo interno, *pfRNA18S*) determinada segundo a equação  $\Delta C_T = (C_{T,alvo} - C_{T,contolo\ interno})$ ; O eixo dos X, Hrs representa a hora após invasão em que foi efectuada a colheita da amostra. Anel (0-22 h), Trofo. trofozoíto (22-34 h), Esqui. esquizonte (34-42h). Mero. merozoíto (44-46h). As curvas cinzento correspondem ao ensaio na ausência de cloroquina e a preto na presença de cloroquina para o mesmo gene.

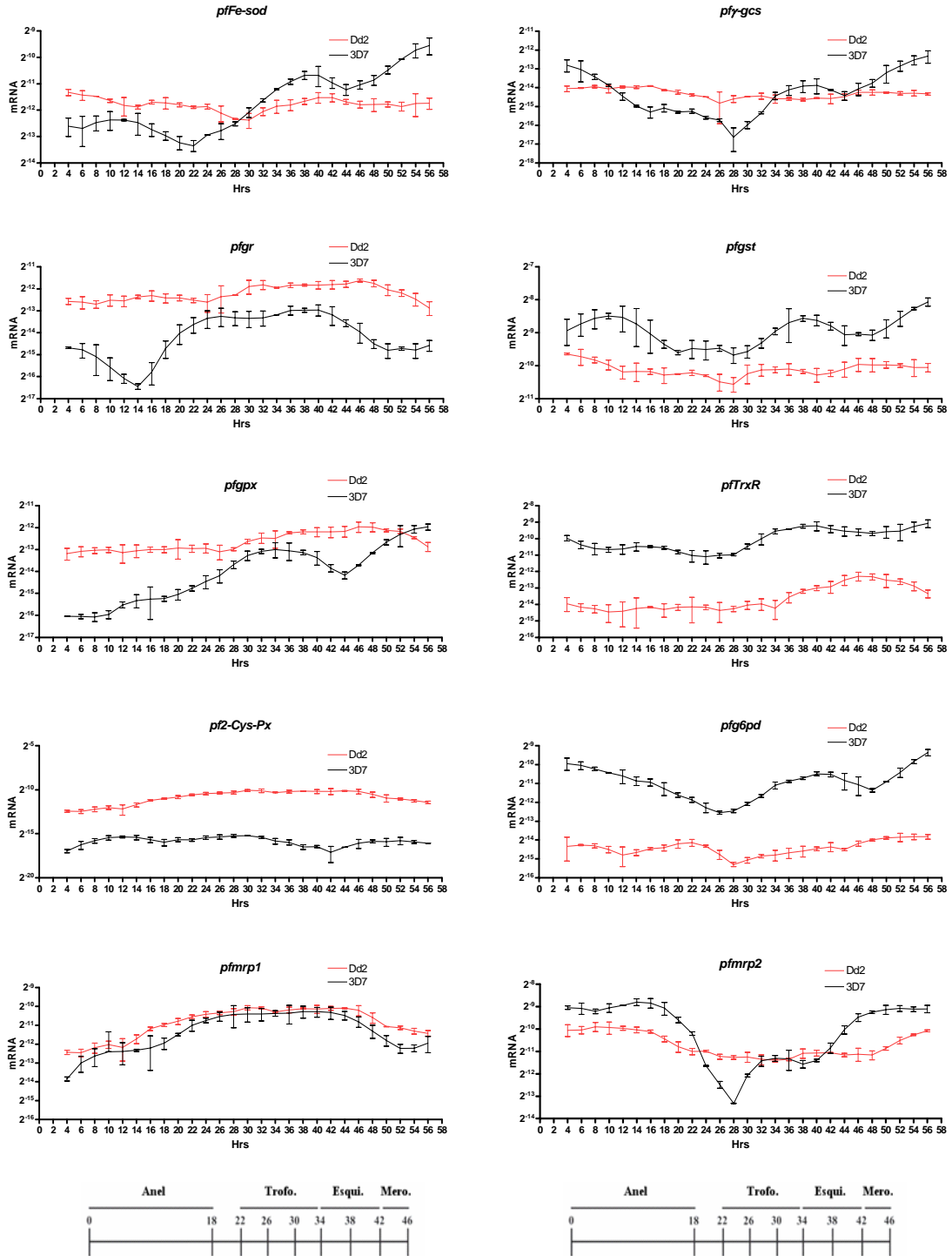
## Anexos



**Perfil de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pfy-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pftrxR*, *pf2-cysPx*, *pfg6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intraeritrocitário do clone Dd2 de *P. falciparum*.** No eixo dos Y está representada (escala logarítmica de base 2) a quantidade relativa mRNA de cada gene (em relação ao controlo interno, *pfRNA18S*) determinada segundo a equação  $\Delta C_T = (C_{T,alvo} - C_{T,contolo\ interno})$ ; O eixo dos X, Hrs representa a hora após invasão em que foi efectuada a colheita da amostra Anel (0-22 h), Trofo. trofozoíto (22-34 h), Esqui. esquizonte (34-42h). Mero. merozoíto (44-46h). As curvas cinzento correspondem ao ensaio na ausência de cloroquina e a preto na presença de cloroquina para o mesmo gene.

ANEXO 16

Perfil de expressão dos genes *pfFe-sod*, *pfγ-gcs*, *pfgr*, *pfgst*, *pfgpx*, *pfTrxR*, *pf2-cysPx*, *pfG6pd*, *pfmrp1* e *pfmrp2* ao longo do ciclo intra-eritrocitário do clone 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*. Nfold expressão de mRNA (amplitude de variação da expressão génica) ao longo do ciclo em escala semilogarítmica. Hrs representa a hora após invasão. Anel (0-22 h), Trofo. trofozoíto (22-34 h), Esqui. esquizonte (34-42h). Mero. merozoíto (44-46h).



**ANEXO 17**

**Correlação entre os perfis de expressão obtidos para os clones 3D7, Dd2 e HB3 dos genes de enzimas de resposta ao stress *pfmrp1* e *pfmrp2*.** Os resultados referentes a HB3 foram retirados de Bozdech Z. *et al*, 2003, Dd2\* e 3D7\* retirados de Linás M., *et al* 2006, os resultados de Dd2\*\* e 3D7\*\* foram determinados durante o presente trabalho. O coeficiente de correlação de *Pearson* foi determinado pela aplicação *GraphPad Prim* 4.0. Na primeira coluna encontram-se as comparações efectuadas com 3D7

| 3D7* (Linás M. <i>et al</i> , 2006)          |          |          |        |          | Dd2* (Linás M. <i>et al</i> , 2006)          |          |          |         |
|--|----------|----------|--------|----------|--|----------|----------|---------|
| <i>pfmrp2</i>                                | Dd2*     | HB3      | 3D7**  | Dd2**    |  | HB3      | 3D7**    | Dd2**   |
| Pearson r                                    | 0,7892   | 0,5825   | 0,6121 | 0,7907   | Pearson r                                    | 0,5902   | 0,8774   | 0,6913  |
| P value                                      | P<0.0001 | P<0.0001 | 0,0011 | P<0.0001 | P value                                      | P<0.0001 | P<0.0001 | 0,0003  |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes      | Yes    | Yes      | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes      | Yes     |
| <b><i>pfmrp1</i></b>                         |          |          |        |          |  |          |          |         |
| Pearson r                                    | 0,868    | 0,6567   | 0,5574 | 0,4831   | Pearson r                                    | 0,8237   | 0,2496   | 0,2344  |
| P value                                      | P<0.0001 | P<0.0001 | 0,0038 | 0,0144   | P value                                      | P<0.0001 | 0,2507   | 0,2816  |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes      | Yes    | Yes      | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | No       | No      |
| <b><i>pf2-CysPx</i></b>                      |          |          |        |          |  |          |          |         |
| Pearson r                                    | 0,8418   | 0,633    | 0,5577 | -0,2728  | Pearson r                                    | 0,3347   | 0,3565   | -0,1007 |
| P value                                      | P<0.0001 | P<0.0001 | 0,007  | 0,2193   | P value                                      | 0,0246   | 0,095    | 0,6474  |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes      | Yes    | No       | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | No       | No      |
| <b><i>pfFe-sod</i></b>                       |          |          |        |          |  |          |          |         |
| Pearson r                                    | 0,7602   | 0,6234   | 0,3416 | -0,4715  | Pearson r                                    | 0,4288   | -0,1064  | -0,2762 |
| P value                                      | P<0.0001 | P<0.0001 | 0,1198 | 0,0268   | P value                                      | 0,0033   | 0,6291   | 0,202   |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes      | No     | Yes      | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | No       | No      |
| <b><i>pfgr</i></b>                           |          |          |        |          |  |          |          |         |
| Pearson r                                    | 0,7292   | 0,7658   | 0,2905 | 0,3396   | Pearson r                                    | 0,8176   | 0,5088   | -0,1987 |
| P value                                      | P<0.0001 | P<0.0001 | 0,0476 | 0,0195   | P value                                      | P<0.0001 | 0,0132   | 0,1759  |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes      | Yes    | Yes      | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes      | No      |
| <b><i>pfgpx</i></b>                          |          |          |        |          |  |          |          |         |
| Pearson r                                    | 0,1135   | 0,727    | 0,4076 | 0,393    | Pearson r                                    | 0,3197   | 0,3884   | 0,07233 |
| P value                                      | 0,2657   | P<0.0001 | 0,0033 | 0,0048   | P value                                      | 0,0018   | 0,067    | 0,6252  |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | No       | Yes      | Yes    | Yes      | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | No       | No      |

## Anexos

| 3D7* (Llinás M. <i>et al</i> , 2006)         |          |               |          |         | Dd2* (Llinás M. <i>et al</i> , 2006)         |          |         |         |
|--|----------|---------------|----------|---------|--|----------|---------|---------|
| <b><i>pfy-gcs</i></b>                        |          |               |          |         |  |          |         |         |
| Pearson r                                    | 0,5904   | 0,3517        | -0,4541  | 0,1671  | Pearson r                                    | 0,5177   | -0,3168 | -0,1613 |
| P value                                      | P<0.0001 | 0,0241        | 0,0013   | 0,2616  | P value                                      | P<0.0001 | 0,1408  | 0,2734  |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes           | Yes      | No      | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | No      | No      |
| <b><i>pfg6pd</i></b>                         |          |               |          |         |  |          |         |         |
| Pearson r                                    | 0,4692   | 0,4381        | -0,2102  | -0,1454 | Pearson r                                    | 0,07132  | -0,1572 | -0,2397 |
| P value                                      | P<0.0001 | 0,0023        | 0,1428   | 0,3136  | P value                                      | 0,4946   | 0,4736  | 0,1008  |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes           | No       | No      | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | No       | No      | No      |
| <b><i>pftrxR</i></b>                         |          |               |          |         |  |          |         |         |
| Pearson r                                    | 0,7881   | 0,7552        | -0,00471 | 0,09809 | Pearson r                                    | 0,597    | 0,4109  | 0,07723 |
| P value                                      | P<0.0001 | P<0.0001      | 0,9741   | 0,498   | P value                                      | P<0.0001 | 0,0041  | 0,9836  |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes           | No       | No      | Is the correlation significant? (alpha=0.05) | Yes      | Yes     | No      |
| <b><i>Pfgst</i></b>                          |          |               |          |         |  |          |         |         |
| Pearson r                                    |          | <b>HB3 a)</b> | 0,3501   | 0,2327  |  |          |         |         |
| P value                                      |          |               | 0,0026   | 0,2853  |  |          |         |         |
| Is the correlation significant? (alpha=0.05) |          |               | Yes      | No      |  |          |         |         |

a) Os resultados são referentes a HB3, retirados de Bozdech Z. *et al*, 2003, visto não existirem disponíveis resultados referentes a pfgst para Dd2 e 3D7 em Llinás M. *et al* , 2006.



## Glossário

---

**Associação terapêutica:** administração simultânea de dois ou mais fármacos, seja em preparações separadas seja numa mesma preparação.

**Clonagem:** Produção de um grupo de células ou organismos geneticamente idênticos (colónias) descendentes de um indivíduo, possuindo exactamente as mesmas características.

**Clone:** Progenia de um único parasita, normalmente obtido por manipulação ou diluições sucessivas de uma mistura de parasitas, originária de um único isolado mantido em laboratório por cultura continua *in vitro* Exemplo: Dd2, 3D7, clones de referência para estudos de resistência aos antimaláricos.

**Diplóide:** Relativo a célula ou organismo que contem duas cópias de cada cromossoma, normalmente uma materna e outra paterna; durante a reprodução ocorre a fusão de duas células haplóides originando o zigoto, diplóide.

**Efeitos secundários ou colaterais:** termo que inclui todos os efeitos usualmente não desejados que se apresentam no Homem como resultado da administração de fármaco ou combinação.

**Enzimas de restrição:** ou endonucleases são enzimas que cortam DNA de cadeia dupla. A enzima introduz uma incisão em cada cadeia da dupla helice sem danificar as bases nitrogenadas, as ligações químicas que estas enzimas interrompem podem ser restabelecidas por ligases.

**Esporogonia:** Fase de desenvolvimento do plasmódio, no seu ciclo de vida, que ocorre no mosquito vector.

**Esquizogonia:** Processo de divisão celular pelo qual o plasmódio se desenvolve nos hepatócitos (esquizogonia tecidual) e nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica).

**Farmacocinética:** Ramo da ciência que estuda a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos.

**Farmacogenética:** Estudo da variação individual ou populacional da absorção e metabolização dos fármacos, ligada a genes.

**Gene:** Segmento de uma molécula de DNA que codifica a síntese de um polipéptido completo.

**Genes homólogos** que codificam proteínas com elevada semelhança ao nível da sequência, e espera-se que possuam idêntica função.

**Genes ortólogos** genes homólogos de sistemas biológicos distintos.

**Genes parálogos** quando codificam proteínas semelhantes mas que ocorrem no mesmo genoma por duplicação de um gene e posterior evolução divergente, assume-se que possuem função distinta ou pelo menos certo grau de especialização.

**Genoma:** Conjunto de material genético de uma célula, isto é conjunto de todos os genes que um dado organismo cotem nos seus cromossomas e nas mitocôndrias (genoma mitocôndrial).

**Haplóide:** Relativo a célula ou organismo que contem uma cópia de cada cromossoma, entre os organismos mais desenvolvidos apenas as células reprodutoras são haplóides, durante a reprodução estas fundem-se dando origem ao zigoto.

**Infecção:** Penetração, desenvolvimento e/ou multiplicação de um organismo num hospedeiro.

**Infectante:** Que pode causar infecção.

## Glossário

---

**Isolado:** Amostra de sangue por *Plasmodium falciparum*, colhido por punção venosa de um indivíduo infectado. Um isolado pode conter mais do que uma população parasitária, geneticamente homogênea, aqui denominada clone.

**Nucleótidos:** Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são formados por sequências de nucleótidos. Um nucleotido é uma associação entre uma base (purina ou pirimidina), uma ribose ou desoxirribose (RNA ou DNA respectivamente) e uma molécula de ácido fosfórico.

**ORF** (open reading frame) sequência de DNA que inicia com uma metionina (ATG) e termina com um codão STOP (TAA, TAG ou TGA).

**Parasitêmia:** Presença de parasitas no sangue.

**Proteína recombinante:** Proteína que contém ligados de forma covalente segmentos provenientes de duas ou peptídeos diferentes.

**Resistência:** Capacidade de uma estirpe de parasitas para sobreviver e se multiplicarem na presença de um agente antimalárico em concentrações que normalmente destroem ou impedem a multiplicação dos parasitas.

**Vectores de clonagem** – Elemento genético auto-replicante denominado vector contendo o gene a ser clonado, de forma a produzir uma "molécula de DNA recombinante. O plasmídeo é seleccionado para uma dada experiência de acordo com as suas características, este deve transportar um ou mais genes que lhe confirmam propriedades particulares, tais como a resistência a certos antibióticos (Cloranfenicol e Ampicilina) que possam servir como indicadores seleccionáveis. Deve conter locais de reconhecimento onde as endonucleases o irão cortar de modo a permitir a inserção de novos genes.